

# Molekulare und kinetische Charakterisierung der Xanthin-Dehydrogenase aus dem phototrophen Bakterium *Rhodopseudomonas capsulata*

Molecular and Kinetic Characterization of Xanthine Dehydrogenase from the Phototrophic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*

Werner Aretz, Herwig Kaspari und Jobst-Heinrich Klemme

Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 168, D-5300 Bonn

Z. Naturforsch. **36 c**, 933–941 (1981); received July 10, 1981

Xanthine Dehydrogenase, Phototrophic Bacteria, *Rhodopseudomonas capsulata*

The structural and kinetic properties of xanthine dehydrogenase (EC 1.2.1.37) from the facultative phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* were studied. The enzyme was fully induced when hypoxanthine or xanthine, but less effectively when uric acid served as nitrogen source during growth. The enzyme was purified about 2300-fold from cells grown photosynthetically with hypoxanthine as N-source by using ammoniumsulfate precipitation, gel filtration, ion-exchange and affinity chromatography. The molecular weight as determined by gel filtration through Sephacryl S-300 was 345000. Subunit analysis by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis suggested a composition of four identical subunits with a molecular weight of 84000. The enzyme contained 2 flavin, 2 molybdenum and 8 iron-sulfur groups per mol. The turnover number with hypoxanthine and NAD as substrates was  $12000 \text{ min}^{-1}$ . Hypoxanthine, 1-methylhypoxanthine, 8-azahypoxanthine, xanthine, 1-methylxanthine, 2-hydroxypurine, 6,8-dihydroxypurine, 5-azacytosine and 5-azauracil served as electron donors. The most effective electron acceptor was NAD. The kinetic constants ( $K_m$ ) were (in  $\mu\text{M}$ ): 52.5 (hypoxanthine); 32.5 (xanthine) and 61.2 (NAD). Various purine compounds inhibited the enzyme competitively in respect to hypoxanthine as substrate. Although reduction of uric acid to xanthine was not detected by using purified enzyme preparations, *in vitro*-experiments with  $^{14}\text{C}$ -labelled uric acid indicated that the enzyme xanthine dehydrogenase participates in uric acid degradation in *Rps. capsulata*. According to their electrophoretic mobilities, the xanthine dehydrogenases isolated from hypoxanthine- and uric acid-grown cells were identical.

## Einleitung

Eine Vielzahl von Bakterien ist befähigt, mit Purinen als Stickstoff-, Kohlenstoff- oder Energiequelle zu wachsen [1]. Zwei Abbauewege, über die eine Verwertung dieser Verbindungen erfolgen kann, sind näher untersucht worden. Im Verlauf des oxidativen Abbaus werden Purine durch die Xanthin-Dehydrogenase (EC 1.2.1.37) zu Harnsäure oxidiert, die anschließend durch die Uricase (EC 1.7.3.3) gespalten wird. In einigen anaeroben Bakterien, wie *Clostridium acidurici* und *C. cylindrosporum* erfolgt demgegenüber ein fermentativer Abbau. Hierbei werden die Purine durch die Xanthin-Dehydrogenase zunächst zu Harnsäure oxidiert und diese anschließend zum Xanthin reduziert, bevor das Purinringsystem gespalten wird [2]. In beiden Fällen nimmt die Xanthin-Dehydrogenase eine zentrale

Stellung ein. In einer vorangegangenen Arbeit [3] wurde berichtet, daß die fakultativ phototrophen Rhodospirillaceen Purine als N-Quelle assimilieren können. Untersuchungen mit *Rhodopseudomonas capsulata* ergaben, daß der Xanthin-Dehydrogenase eine zentrale Rolle beim Purin-Abbau durch fakultativ phototrophe Bakterien zukommt [4].

In der vorliegenden Arbeit werden die Anreicherung, sowie die strukturellen und kinetischen Eigenschaften der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* Stamm AI beschrieben.

## Material und Methoden

### Organismus und Kulturmethoden

Die Untersuchungen wurden mit einem neu isolierten Stamm von *Rhodopseudomonas capsulata* (AI) durchgeführt. Der Organismus war in einem purinhaltigen Nährmedium angereichert worden [3]. Die Zellen wurden bei  $30^\circ\text{C}$  anaerob im Licht (ca. 2000 lx) in vollständig mit Nährlösung gefüllten 50 ml-Schraubdeckelflaschen bzw. 1 l-Steilbrustfla-

**Abkürzungen:** DCPIP, 2,6-Dichlorphenolindophenol; PMS, Phenazinmethosulfat; NBT, Nitroblautetrazoliumchlorid.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Kaspari.

0341-0382/81/1100-0933 \$ 01.00/0

schen angezogen. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung (bezogen auf 1 l): 1 mM Purin; 2,5 g Fruktose; 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 M K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 0,2 g Hefeextrakt; 0,5 ml Spurenelementlösung nach Pfennig und Lippert [5]; 1 mg Nikotinsäure; 1 mg Thiamin-HCl; 0,01 mg Biotin; 0,2 mg *p*-Aminobenzoessäure. Die Kulturmedien wurden sterilfiltriert.

#### Herstellung zellfreier Extrakte

Die für enzymatische Untersuchungen benötigten Zellen wurden gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach Erreichung einer Trübung von  $A_{660} = 0,9-1,2$  (gemessen in 1 cm-Küvetten im „Spectronic 20“-Photometer der Fa. Bausch und Lomb, München) geerntet. Die Zellen wurden zweimal in 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert (1 g Feuchtwicht/2,5 ml Puffer). Der Aufschluß der Zellen erfolgte bei 0–4 °C mit einem Ultraschall-Desintegrator (Schoeller & Co., Frankfurt/M.). Die Beschallzeit betrug 20 Sekunden/ml Zellsuspension. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei  $12000 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt weiterverwendet.

#### Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivität der *Xanthin-Dehydrogenase* (EC 1.2.1.37) wurde spektralphotometrisch bei 30 °C in 3 ml-Reaktionsgemischen gemessen, die 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, 0,33 mM NAD und Extrakt enthielten. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,2 mM Hypoxanthin und Registrierung der NAD-Reduktion bei 340 nm. Fanden andere Elektronendonatoren Verwendung, erfolgte die Messung der Reaktion bei folgenden Wellenlängen: DCPIP bei 660 nm;  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  bei 430 nm; Cytochrom c bei 550 nm; PMS bei 387 nm; NBT bei 535 nm.

Die NAD(P)H-Oxidoreduktase-Aktivität wurde in 3 ml-Reaktionsgemischen mit folgenden Komponenten gemessen: 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3; 0,17 mM NAD(P)H; 0,07 mM DCPIP; Extrakt. Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry et al. [6].

#### Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Analysen wurden in Polyacrylamidgelen in einem Disk-Elektrophoresegerät

(Desaga GmbH, Heidelberg) mit einer Gelkonzentration von 7,5% in den Gelsystemen 1 und 6 und Tris-Glycinpuffer, pH 8,3, nach Maurer [7] durchgeführt. Der Nachweis von Proteinbanden erfolgte mit Coomassie-Blau (0,25%). Aktivitätsbanden wurden durch fünfzehn- bis sechzigminütige Inkubation der Gele in einem 1 l-Reaktionsgemisch folgender Zusammensetzung lokalisiert: 64 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3; 0,5 mM Hypoxanthin; 0,45 mM NAD; 0,1 mg PMS; 1,5 mg NBT. Das Molekulargewicht der Untereinheiten der Xanthin-Dehydrogenase wurde durch Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen [8] bestimmt.

#### Herkunft der Chemikalien und Biochemikalien

NAD, NADH, NADP, NADPH und Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung wurden von der Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, bezogen; Rinderserumalbumin, Protaminsulfat, NBT, PMS, DCPIP, Dextranblau, DEAE-Cellulose und die Chemikalien zur Elektrophorese von der Fa. Serva-Feinbiochemica, Heidelberg; Purin-, Pyrimidinderivate und Allopurinol von Sigma, München; Sephadex G 25, Sephacryl S-300 und 5'AMP-Sepharose von der Fa. Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg. Dünnschicht-Cellulose-Fertigfolien F 1440 PEI/LS 254 wurden von der Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Kassel und  $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Harnsäure}$  von der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen. Alle übrigen Chemikalien stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

#### Ergebnisse und Diskussion

##### Induktion der Xanthin-Dehydrogenase nach Wachstum mit verschiedenen Substraten

Zellen von *Rps. capsulata* AI wurden in Medien mit Purinen oder  $\text{NH}_4\text{Cl}$  angezogen, um den Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Synthese der Xanthin-Dehydrogenase zu studieren. Wie Tab. I zeigt, wird die Xanthin-Dehydrogenase in *Rps. capsulata* in Übereinstimmung mit den meisten bisher untersuchten Xanthin-Dehydrogenasen [9] induziert. Nach Zellanzucht mit Ammonium waren keine, mit Hefeextrakt als zusätzliche N-Quelle nur geringe Xanthin-Dehydrogenase-Aktivitäten nachweisbar, während nach Wachstum mit Hypoxanthin, Xanthin und 6,8-Dihydroxypurin hohe Aktivitäten gemessen werden konnten. Demgegenüber wurde das

Tab. I. Aktivität der Xanthin-Dehydrogenase nach photosynthetischer Anzucht mit verschiedenen Stickstoffquellen. Die Enzymaktivität wurde im Rohextrakt mit Hypoxanthin und NAD bestimmt.

| N-Quelle<br>(1 mM) | Spez. Aktivität (mE/mg Protein)<br>der Xanthin-Dehydrogenase im<br>Kulturmedium |                              |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|                    | ohne<br>Hefeextrakt                                                             | mit Hefeextrakt<br>(0.2 g/l) |
| NH <sub>4</sub> Cl | 0                                                                               | 2,7                          |
| Hypoxanthin        | 27,0                                                                            | 29,0                         |
| Xanthin            | 13,7                                                                            | 14,9                         |
| 6,8-Dihydroxypurin | 13,5                                                                            | n. g.                        |
| Harnsäure          | 2,3                                                                             | 6,2                          |

n. g. = nicht getestet.

Enzym durch Harnsäure nur schwach induziert, obgleich diese Verbindung gut als N-Quelle verwendet wurde [3]. Ein ähnliches Induktionsmuster ist bei der Xanthin-Dehydrogenase in *Closteridium barkeri* beobachtet worden [10]. Weitere Versuche ergaben, daß die Enzymsynthese in *Rps. capsulata* nach Wachstum mit Hypoxanthin durch NH<sub>4</sub>Cl als zusätzliche N-Quelle nicht beeinflußt wurde.

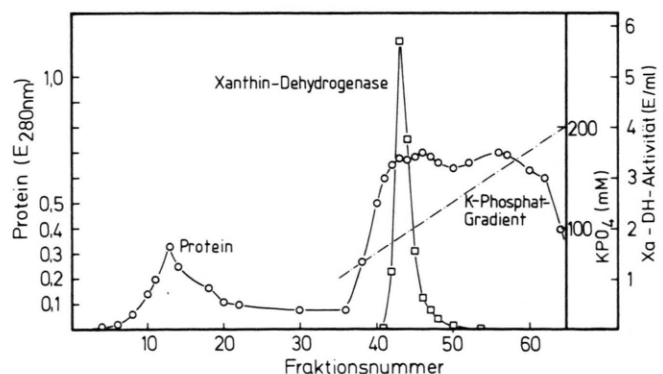
#### Anreicherung der Xanthin-Dehydrogenase

Zur Anreicherung der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* AI wurde der Rohextrakt von Zellen, die in Medien mit Hypoxanthin und Hefeextrakt gewachsen waren, 90 min bei 143 000 × g ultrazentrifugiert. In der löslichen Fraktion fanden sich 87–100% der Gesamtaktivität wieder. Gleichzeitig wurde eine 1,8–2,2fache Anreicherung des Enzyms erzielt.

Durch anschließende Behandlung dieser Fraktion mit einer 1-prozentigen Protaminsulfatlösung (20 Vol.%) wurden die Nucleinsäuren ausgefällt. Der resultierende Überstand wurde bis zu 45% mit Ammoniumsulfat gesättigt und das Präzipitat in 20 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, aufgenommen. Nach Entsalzung der Ammoniumsulfatfraktion über eine Sephadex G 25-Säule erfolgte eine weitere Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose mittels eines linearen Phosphatgradienten. Ein typisches Elutionsdiagramm der Xanthin-Dehydrogenase ist in Abb. 1 dargestellt. Das Enzym wurde in einem engen Bereich zwischen 80 und 110 mM K-Phosphatpuffer eluiert. Das Verfahren resultierte in einer Anreicherung um einen Faktor von etwa 13, der Verlust an Gesamtaktivität lag bei maximal 30%.

Der nächste Anreicherungsschritt bestand in der Abtrennung kontaminierender Proteine durch Gel-filtration. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität nach Ionenaustauschchromatographie wurden durch Ammoniumsulfatfällung (50% Sättigung) eingeeengt, auf eine mit 20 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, äquilibrierte Sephacryl S-300-Säule (1,5 × 90 cm) gegeben und mit dem gleichen Puffer eluiert. Nach dieser präparativen Gelfiltration war die Xanthin-Dehydrogenase in der Regel 200fach angereichert. Zur weiteren Reinigung des Enzyms wurde eine Affinitätschromatographie mit 5'-AMP-Sepharose 4B durchgeführt. Die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* AI, die mit NAD als Elektronenakzeptor reagiert, zeigte eine hohe Affinität zum Gel. Das an die Gelmatrix gebundene Enzym konnte weder mit K-Phosphatpuffer (400 mM) noch mit NaCl (1 M) oder Hypoxanthin (3 mM) eluiert

Abb. 1. Elutionsdiagramm der Xanthin-Dehydrogenase auf DEAE-Cellulose. 37 ml einer entsalzten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fraktion (895 mg Protein) wurden auf eine DE-52-Cellulose-Säule (1,5 × 90 cm) aufgetragen, in einem linearen K-Phosphat-Gradienten, pH 8,3, eluiert und in Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen. Die Durchflußrate betrug 7 ml/Std · cm<sup>2</sup>.



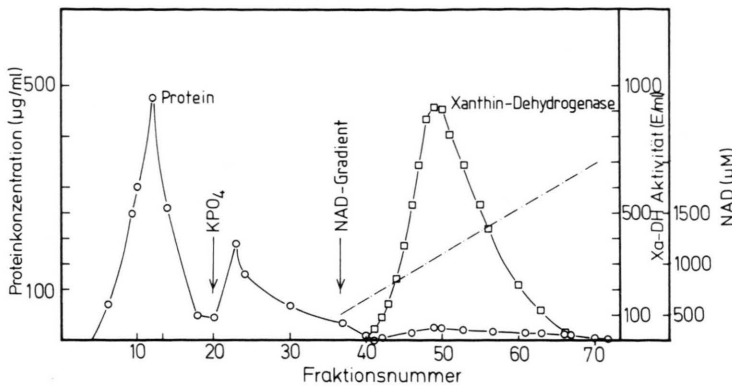


Abb. 2. Elutionsdiagramm der Xanthin-Dehydrogenase auf 5'AMP-Sepharose 4B. 15 ml Eluat einer Sephacryl S-300-Chromatographie (10 mg Protein) wurden auf eine mit 20 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, äquilibrierte 5'AMP-Sepharose 4B-Säule (0,9 × 30 cm) aufgetragen. Eluiert wurde zunächst mit 400 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3, anschließend mit einem linearen Gradienten von NAD in 50 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3. Die Fraktionen bestanden jeweils aus 2 ml; die Durchflußrate betrug 11,5 ml/h · cm<sup>2</sup>.

werden. Wie Abb. 2 zeigt, wurde die Xanthin-Dehydrogenase mit einem NAD-Gradienten (0,5–2 mM) in Bereich von 0,8–1,5 mM eluiert. Mit diesem Verfahren wurde die Xanthin-Dehydrogenase jeweils 1700–2400fach gegenüber dem Rohextrakt angereichert. Ein typischer Anreicherungsang ist in Tab. II zusammengefaßt. Das Enzympräparat wurde nach der Affinitätschromatographie einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Sowohl nach Anfärbung mit Coomassie-Blau als auch nach Aktivitätsfärbung konnte lediglich eine Bande nachgewiesen werden. Das Präparat war also homogen. Die quantitative Auswertung eines mit dem Beckman-Doppelstrahlphotometer Acta M VI aufgezeichneten Densitogramms (Abb. 3) ergab, daß ca. 99% des Gesamtproteins der Xanthin-Dehydrogenase-Bande zuzuordnen waren. Das homogene Enzym konnte bei –18 °C mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust eingefroren werden.

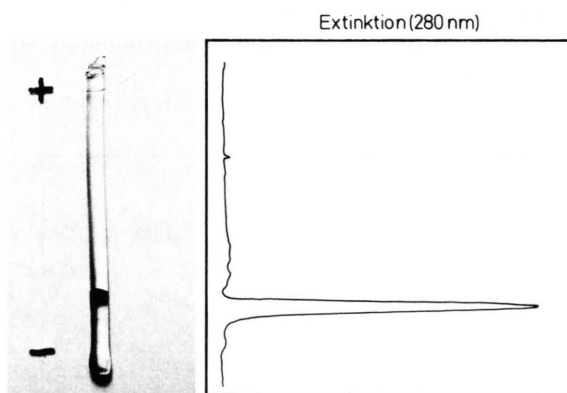


Abb. 3. Densitogramm der Xanthin-Dehydrogenase (rechts) nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau (links). Aufgetragen wurde ein Enzympräparat nach Affinitätschromatographie (18 µg Protein).

### Strukturelle Eigenschaften der Xanthin-Dehydrogenase

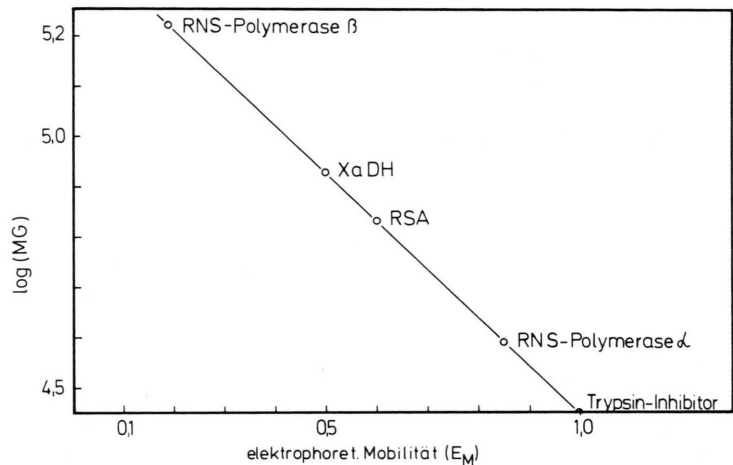
Zur Untersuchung der strukturellen Eigenschaften der Xanthin-Dehydrogenase wurden zunächst Molekulargewichtsbestimmungen an Sephacryl S-300-Säulen (1,5 × 90 cm; Äquilibrierungs- und Elutionspuffer 20 mM K-Phosphat, pH 8,3) durchgeführt. Aus dem Vergleich der Elutionsvolumina verschiedener Eichproteine (Ferritin, Katalase aus Rinderleber, Aldolase aus Kaninchenmuskel, Rindersealbumin und Cytochrom c aus Pferdeherz) mit dem der Xanthin-Dehydrogenase wurde für das Enzym ein Molekulargewicht von 345 000 ermittelt. Im Vergleich zu anderen bakteriellen Xanthin-Dehydrogenasen wie z. B. der aus *C. barkeri* [10] oder der aus *Arthrobacter* S2 [11] mit Molekulargewichten von 530 000 bzw. 146 000 ist das Enzym aus *Rps. capsulata* also durch eine mittlere Größe charakterisiert.

Um Aufschluß über den Enzymaufbau zu gewinnen, wurde das homogene Enzympräparat einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Nach Färbung mit Coomassie-Blau ließ sich nur eine Proteinbande nachweisen. Durch Vergleich der elektrophoretischen Mobilität dieser Bande mit der von Eichpolypeptiden wurde für die Untereinheiten der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* ein Molekulargewicht von 84 200 ermittelt (Abb. 4). Dieser Befund könnte auf der Basis des durch Gel-filtration bestimmten Molekulargewichts von 345 000 auf eine tetramere Zusammensetzung des Enzyms hindeuten, die auch für die Xanthin-Dehydrogenasen aus *C. barkeri* [10] und *Pseudomonas synxantha* A3 [12] diskutiert wird. Einem solchen Aufbau steht jedoch eine für die meisten Xanthin-Dehydrogenasen postulierte dimere Molekularstruktur entgegen.

Tab. II. Anreicherung der Xanthin-Dehydrogenase. Die Fraktionen mit Enzymaktivität von der 5'AMP-Sepharose-Säule wurden durch Ultrafiltration mit einem Sartorius-Druckfiltergerät (SM 16526; Cellulose-Triacetat-Filter mit Abscheidegrad von MG 20000) eingeeengt.

| Fraktion                                                                | Volumen<br>[ml] | Protein<br>[mg] | Gesamt-<br>einheiten | Spez.<br>Aktivität<br>[E/mg Protein] | Anrei-<br>cherung | Aus-<br>beute<br>[%] |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Rohextrakt                                                              | 106             | 4261            | 64,8                 | 0,015                                | —                 | 100                  |
| Ultrazentrifugation                                                     | 79              | 1977            | 64,8                 | 0,033                                | 2,2               | 100                  |
| Protaminsulfatfällung                                                   | 91              | 1899            | 64,8                 | 0,035                                | 2,3               | 100                  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fraktionierung (0–45%) | 19              | 899             | 58,7                 | 0,065                                | 4,3               | 91                   |
| DEAE-Cellulose                                                          | 25              | 48              | 41,4                 | 0,862                                | 57,0              | 64                   |
| Sephacryl S-300                                                         | 15              | 9,7             | 20,4                 | 2,107                                | 139,0             | 32                   |
| 5'AMP-Sepharose 4B                                                      | 1,2             | 0,21            | 7,6                  | 35,900                               | 2362,0            | 12                   |

Abb. 4. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten der Xanthin-Dehydrogenase (XaDH) durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die elektrophoretische Mobilität der Xanthin-Dehydrogenase-Untereinheiten wurde mit der der *E. coli*-RNS-Polymerase ( $\alpha$ -Untereinheit: MG 39000,  $\beta$ -Untereinheit: 165000), des Rinderserumalbumins (RSA; MG 68000) und des Trypsin-Inhibitors aus Sojabohne (MG 28000) verglichen. Die Polyacrylamidkonzentration betrug 5%.



gen [9, 13], die von der Tatsache abgeleitet wird, daß diese Enzyme 2 Molybdän, 2 FAD und 8 Eisenschwefelgruppen pro mol enthalten. Zur weiteren Charakterisierung der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* wurde daher deren molekulare Zusammensetzung untersucht.

Das Absorptionsspektrum des Enzyms ist in Abb. 5 dargestellt. Die oxidierte Form weist ein für Flavine typisches Absorptionsmaximum bei 450 nm auf. Durch Hypoxanthin (60  $\mu$ M) wurde das Enzym innerhalb von 3 min zu 50% reduziert; eine sofortige, vollständige Reduktion erfolgte bei Zugabe von Dithionit. Mit Hilfe der die Reduktion begleitenden Extinktionsänderung konnte der Flavingehalt der Xanthin-Dehydrogenase mit 1,8–2,0 mol pro mol Enzym berechnet werden. Eine Identifizierung des Flavin-Cofaktors erfolgte nicht, allerdings enthalten

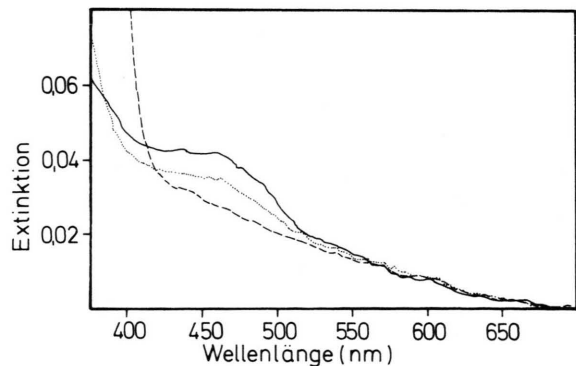


Abb. 5. Absorptionsspektrum der homogenen Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* A1. Das Spektrum des Enzyms (200  $\mu$ g Protein/ml in 20 mM K-Phosphatpuffer, pH 8,3) wurde in oxidiertem (—), in mit 60  $\mu$ M Hypoxanthin partiell reduzierten (· · ·) und in durch Zugabe von festem Dithionit reduzierten Zustand (— · —) aufgenommen ( $d = 1$  cm).

alle bisher untersuchten Xanthin-Dehydrogenasen FAD. Der molare Extinktionskoeffizient der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* (pro 2 Flavon) bei 450 nm wurde mit  $74\,200\text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bestimmt. Ähnliche Werte sind auch für andere homogene Xanthin-Dehydrogenasen berichtet worden [9].

Nach Rajagopalan und Handler [14] gibt das Verhältnis der Extinktion 450/550 nm einen wichtigen Hinweis auf die Redoxkomponenten des Enzyms. Liegt der Quotient bei 3, weist dies auf ein Verhältnis zwischen dem Flavon und Eisen-Schwefel-Gehalt von 1:4 hin. Bei dem Enzym aus *Rps. capsulata* variierte der Wert des Quotienten zwischen 2,8 und 3,1. Bestimmungen des Eisengehaltes mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrophotometrie und des Gehalts an säurelabilen Schwefel nach der Methode von King und Morris [15] bestätigten die aufgrund der obigen Extinktionsquotienten postulierte Zusammensetzung. Es ergaben sich Werte von 8,4 mol Eisen und 10,5 mol säurelabilen Schwefel pro mol Xanthin-Dehydrogenase.

Zur Frage nach weiteren Cofaktoren wurde der Selen- und Molybdängehalt der Xanthin-Dehydrogenase mit Hilfe der Neutronenaktivierungsmethode bestimmt. Selen war nicht nachweisbar. Für Molybdän ergab sich ein Gehalt von 1,4 mol pro mol Enzym. Nach Bray [13] sollen alle Enzym-Präparate mit einem Molybdängehalt, der geringer als der Flavingehalt ist, mit der Demolybdo-Form des Enzyms kontaminiert sein. Unter dieser Voraussetzung enthält die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* also 2 Flavon, 2 Molybdän, 8 Eisen und 10,5 säurelabile Schwefel-Gruppen pro mol Enzym. Die-

ser molekulare Aufbau spricht, im Vergleich zu anderen Molybdän-Eisenschwefel-Flavoproteinen, eher für eine dimere, als für eine tetramere Struktur [9, 13, 16]. Aufgrund dieser Vorstellungen ist zu vermuten, daß die beiden Monomere der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* aus jeweils zwei Untereinheiten bestehen, die sich zwar im Molekulargewicht gleichen (vgl. SDS-Gelelektrophorese), jedoch im molekularen Aufbau unterscheiden. Ein solcher Aufbau stimmt mit den Modellvorstellungen von Coughlan et al. [17] zur Struktur der Monomere der Xanthin-Dehydrogenase aus Hühnerleber überein.

#### Katalytische Eigenschaften der Xanthin-Dehydrogenase

Das pH-Optimum der Xanthin-Dehydrogenase wurde in K-Phosphatlösung im Bereich zwischen pH 5,5 und 9,5 (mit NaOH eingestellt) bestimmt. Das Optimum der Hypoxanthin-Oxidation lag bei pH 8,3.

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Xanthin-Dehydrogenase wurden Testansätze jeweils 5 min bei Temperaturen zwischen 20 °C und 45 °C vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von Enzym gestartet. Dabei konnte bei 37 °C zwar die höchste spezifische Aktivität beobachtet werden, die Umsatzrate war jedoch für höchstens vier Minuten konstant. Oberhalb von 37 °C trat eine Inaktivierung des Enzyms ein. Durch Auftragung der Daten im Arrhenius-Diagramm ließ sich die Aktivierungsenergie für das Enzym mit 19,9 kJ/mol (4,76 kcal/mol) ermitteln. Dieser, verglichen mit anderen Xanthin-Dehydrogenasen niedrige Wert steht im Einklang mit der relativ hohen Wechselzahl. Sie betrug für das homogene Enzym aus *Rps. capsulata* im Standardtest bei 30 °C 12000 mol/mol Enzym · min.

Xanthin-Dehydrogenasen nutzen ein weites Spektrum von Verbindungen als Elektronenakzeptoren bzw. -donatoren [9, 13]. Aktivitätsmessungen zur Substratspezifität des Enzyms aus *Rps. capsulata* ergaben, daß NAD der effektivste Elektronenakzeptor war (Tab. III). Die Umsetzung von DCPIP und Ferricyanid erfolgte deutlich langsamer, die von NADP und O<sub>2</sub> war sehr gering. Cytochrom c, PMS und NBT reagierten nicht mit dem Enzym. Wie bei der Mehrzahl der bisher untersuchten Xanthin-Dehydrogenasen scheint NAD auch bei dem Enzym

Tab. III. Elektronenakzeptoren der Xanthin-Dehydrogenase. Die Enzymaktivitäten wurden mit Hypoxanthin als Elektronendonator bestimmt. Die Messung der O<sub>2</sub>-abhängigen Reaktion erfolgte anhand der Harnsäurebildung aus [2-<sup>14</sup>C]markiertem Xanthin. Der Testansatz enthielt jeweils 2 µg homogenes Enzym pro ml.

| Elektronenakzeptor                    | Konzentration im Testansatz [mM] | Relative Aktivität [%] |
|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| NAD                                   | 0,33                             | 100                    |
| NADP                                  | 0,33                             | 3                      |
| DCPIP                                 | 0,07                             | 31                     |
| K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] | 1                                | 10                     |
| Cytochrom c                           | 0,3                              | 0                      |
| PMS                                   | 0,5                              | 0                      |
| NBT                                   | 0,1                              | 0                      |
| O <sub>2</sub>                        | gesättigt                        | 0,5–1                  |

aus *Rps. capsulata* der physiologische Akzeptor zu sein. Die Xanthin-Dehydrogenasen aus strikt anaeroben Bakterien wie *C. cylindrosporum* und *Veillonella alcalescens* sind allerdings nicht mit NAD, sondern mit Ferredoxin aktiv [18].

Als Elektronendonatoren der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* fungieren eine Reihe von Purinverbindungen (Tab. IV). Im Gegensatz zur Mehrzahl der bisher beschriebenen mikrobiellen Enzyme (Ausnahmen: Xanthin-Dehydrogenasen aus *Ps. synxantha* [12], *Streptococcus cyanogenus* [19], *Aspergillus nidulans* [20] und *C. barkeri* [10]) ist für die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* nicht Xanthin, sondern Hypoxanthin das am besten umgesetzte Substrat. Purin und Allopurinol, die häufig als Substrate von Xanthin-Dehydrogenasen beschrieben worden sind, wurden vom *Rps. capsulata*-Enzym nicht umgesetzt (Tab. IV). 8-Azahypoxanthin, 1-Methylhypoxanthin, 2-Hydroxypurin und 6.8-Dihydroxypurin fungierten – mit unterschiedlicher Effektivität – ebenfalls als Substrate des Enzyms.

Interessanterweise war die Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* nicht in der Lage, eine Reduktion von Harnsäure und Xanthin mit NADH oder NADPH zu katalysieren, obgleich NAD sehr gut als Elektronenakzeptor für die Umkehrreaktion dient.

Allerdings wies das Enzym NADH/NADPH-Oxidoreduktase-Aktivitäten mit DCPIP als Elektronenakzeptor auf (6,8 E/mg Protein mit NADH; 2,5 E/mg Protein mit NADPH).

Pyrimidine wie Cytosin und Uracil dienten nicht als Elektronendonatoren der Xanthin-Dehydrogenase, bemerkenswerterweise aber die entsprechen-

Tab. IV. Purinderivate als Substrate der Xanthin-Dehydrogenase. Die Reaktionsansätze enthielten NAD als Elektronenakzeptor und jeweils 1 µg homogenes Enzym pro ml. Die Konzentration der Elektronendonatoren betrug mit der Ausnahme von Allopurinol (0,1–10 µM) 0,2 mM.

| Elektronendonator   | Relative Aktivität der Xanthin-Dehydrogenase [%] |
|---------------------|--------------------------------------------------|
| Hypoxanthin         | 100                                              |
| 1-Methylhypoxanthin | 10                                               |
| 8-Azahypoxanthin    | 39                                               |
| Xanthin             | 67                                               |
| 1-Methylxanthin     | 10                                               |
| Purin               | 0                                                |
| 2-Hydroxypurin      | 35                                               |
| 6.8-Dihydroxypurin  | 50                                               |
| Allopurinol         | 0                                                |

Tab. V. Hemmung der Xanthin-Dehydrogenase durch Purinderivate. Ein Ansatz mit Hypoxanthin und NAD diente als Kontrolle (= 100% relative Aktivität). 50 µl **Enzymlösung (50fach angereichert; 5,5 µg Protein/ml)**. Die Konzentration der Inhibitoren betrug jeweils 0,25 mM oder 0,2 mM (8-Azaadenin und 8-Azaguanin).

| Purinderivat        | Relative Xanthin-Dehydrogenase-Aktivität [%] |
|---------------------|----------------------------------------------|
| 8-Azahypoxanthin    | 60                                           |
| 1-Methylhypoxanthin | 83                                           |
| Xanthin             | 60                                           |
| 3-Methylxanthin     | 30                                           |
| Harnsäure           | 79                                           |
| Purin               | 92                                           |
| Adenin              | 39                                           |
| 8-Azaadenin         | 0                                            |
| 8-Azaguanin         | 0                                            |

den 5-Azaderivate. Pteridine schließlich, die effektivsten Elektronendonatoren der Xanthin-Oxidase aus Milch [13], wurden von der Xanthin-Dehydrogenase aus *Rps. capsulata* nicht genutzt.

Zur Bestimmung der optimalen Substratkonzentrationen wurden Substratsättigungskurven für Hypoxanthin, Xanthin und NAD (bei konstanter Konzentration des Cosubstrates) aufgenommen. In allen Fällen resultierte eine hyperbolische Sättigungskurve. Die nach Eisenthal und Cornish-Bowden [21] ermittelten  $K_m$ -Werte betrugen (jeweils in µM) 52,5 für Hypoxanthin; 32,5 für Xanthin, und 61,2 für NAD.

Wie aus Tab. V ersichtlich, fungieren Purinderivate – nicht aber das Purin selbst – als Inhibitoren des Enzyms. Um den Hemmechanismus zu charakterisieren, wurde die Konzentration von Harnsäure als Reaktionsprodukt und Substrat der Xanthin-Dehydrogenase (s. u.) im Bereich von 125–1000 µM und die Konzentration von Adenin als nicht hydroxylierbare Verbindung im Bereich von 25–500 µM bei drei verschiedenen Hypoxanthin-Konzentrationen (50, 100 und 200 µM) in Testansatz variiert. Die Auftragung der Reaktionsdaten im Dixon-Diagramm ( $1/v = f[I]$ ) ergab in beiden Fällen einen kompetitiven Hemmtyp, der auch für die anderen Purinverbindungen gelten dürfte. Die apparenten Inhibitor-konstanten ( $K_i$ ) betrugen für Harnsäure 144 µM und für Adenin 50 µM.

#### *Bedeutung der Xanthin-Dehydrogenase für den Harnsäureabbau*

Die geringen spezifischen Aktivitäten der Xanthin-Dehydrogenase nach Anzucht der Zellen mit

Harnsäure als N-Quelle warfen die Frage auf, ob das Enzym überhaupt eine Rolle im Harnsäureabbau spielt. Der Versuch, die eigentliche physiologisch relevante Reaktion der Xanthin-Dehydrogenase, nämlich die Reduktion von Harnsäure zu Xanthin (mit NADH, NADPH und reduzierten Viologenfarbstoffen als Elektronendonatoren) nachzuweisen, blieb ohne Erfolg. Allerdings konnte in Rohextrakten von Zellen, die mit Harnsäure angezogen worden waren, dünnschichtchromatographisch nicht nur ein zeitabhängiger Verbrauch von  $^{14}\text{C}$ -markierter Harnsäure (0,01 mE/mg Protein), sondern auch die damit korrelierende Bildung eines radioaktiv markierten Reaktionsproduktes nachgewiesen werden (Abb. 6). Die Verbindung wurde dünnschichtchromatographisch und durch Erstellung eines UV-Spektrums als Xanthin identifiziert. Da die Reaktion ohne die oben erwähnten Elektronendonatoren ablief, ist unklar, woher die zur Reduktion der Harnsäure in zellfreien Extrakten erforderlichen Reduktionsäquivalente stammen. Die beobachtete Umsetzung macht es jedoch sehr wahrscheinlich, daß am Harnsäureabbau *in vivo* eine Xanthin-Dehydrogenase beteiligt ist.

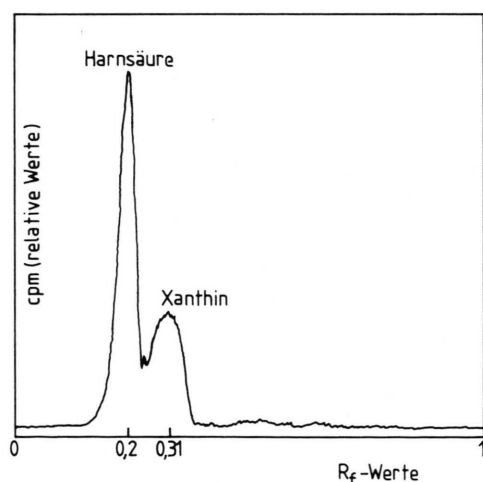


Abb. 6 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Bildung von Xanthin aus Harnsäure. Die 200  $\mu\text{l}$ -Testansätze mit 2 mM  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ markierter Harnsäure, 50 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,5, und Rohextrakt wurden 60 min bei 30 °C inkubiert und mit 50  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure (5%) abgestoppt. Nach Chromatographie auf Anionenaustauscher-Folien F 1440 PEI/LS 254 mit 50 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, als Fließmittel erfolgte der Nachweis mit Hilfe eines Dünnschicht-Scanners.

Tab. VI. Elektrophoretische Mobilität der Xanthin-Dehydrogenase nach Hypoxanthin- bzw. Harnsäure-Anzucht in verschiedenen Gelsystemen. Die Xanthin-Dehydrogenase war nach Hypoxanthin-Anzucht 93fach, die nach Harnsäure-Anzucht 150fach angereichert. Es wurden 30  $\mu\text{g}$  Protein/Röhrchen aufgetragen.

| Gelsysteme<br>(nach Maurer [7]) | $R_F$ -Werte der Xanthin-Dehydrogenase nach |                   |
|---------------------------------|---------------------------------------------|-------------------|
|                                 | Hypoxanthin-Anzucht                         | Harnsäure-Anzucht |
| Nr. 1 (pH 8,3)                  | 0,26                                        | 0,26              |
| Nr. 6 (pH 7,0)                  | 0,18                                        | 0,18              |
| Nr. 6 (pH 4,5)                  | 0,10                                        | 0,10              |

Es war demnach zu klären, ob die NAD-abhängige Xanthin-Dehydrogenase nach Harnsäureanzucht überhaupt identisch mit derjenigen in hypoxanthin-gezogenen Zellen war. Diese Frage stellte sich auch deshalb, weil die beiden Enzymaktivitäten Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ultraschall zeigten. Außerdem war das Enzym nach Harnsäureanzucht nur in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase nachweisbar, während bei Hypoxanthin-Anzucht eine derartige Abhängigkeit des Enzymtiters von der Wachstumsphase nicht bestand. Die Tatsache, daß Bakterien zwei Xanthin-Dehydrogenasen besitzen können, wurde u. a. bei *Ps. putida* und *Escherichia coli* nachgewiesen [22]. Die Biosyntheserate beider Enzyme war von den Wachstumsbedingungen abhängig. Außerdem wurden Unterschiede im Substratspektrum beobachtet. Auch in *Rps. capsulata* war nach Anzucht der Zellen mit Harnsäure bzw. Hypoxanthin ein deutlicher Unterschied im kinetischen Verhalten der Enzyme zu beobachten, so z. B. unterschiedliche Oxidationsraten mit Guanin und 6,8-Dihydroxypurin und unterschiedliche Einflüsse von KCN und Metallionen auf die Enzymaktivität. Da diese Befunde jedoch keine eindeutigen Aussagen erlaubten, wurden die Enzyme nach Harnsäure- bzw. Hypoxanthin-Anzucht partiell angereichert (Ultrazentrifugation,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung, Anionenaustauschchromatographie) und anschließend mittels einer Aktivitätsfärbung nach Gelelektrophorese verglichen (Tab. VI). Da das elektrophoretische Verhalten der Xanthin-Dehydrogenasen aus den beiden Zelltypen identisch war, muß gefolgert werden, daß *Rps. capsulata* nur eine Xanthin-Dehydrogenase synthetisiert.

### Danksagungen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ka

497/1; Kl 236/9) unterstützt. Die Autoren danken Frau E. Stein für die sorgfältige experimentelle Mitarbeit.

- [1] G. D. Vogels u. C. van der Drift, *Bact. Rev.* **40**, 403 (1976).
- [2] W. H. Bradshaw u. H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* **235**, 3620 (1960).
- [3] W. Aretz, H. Kaspari u. J.-H. Klemme, *FEMS Microb. Letters* **4**, 249 (1978).
- [4] W. Aretz, Purinverwertung durch Rhodospirillaceae: Untersuchungen zum Purinabbau in *Rhodopseudomonas capsulata* und Charakterisierung der Xanthin-Dehydrogenase. Dissertation, Universität Bonn 1981.
- [5] N. Pfennig u. K. D. Lippert, *Arch. Microbiol.* **55**, 245 (1966).
- [6] O. H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- [7] H. R. Maurer, Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin 1971.
- [8] K. Weber, J. R. Pringle u. M. Osborn, *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick u. N. O. Kaplan, Hrsg.), **Vol. XXVI**, S. 3, Academic Press, New York 1972.
- [9] M. P. Coughlan, Molybdenum and molybdenum-containing enzymes (M. P. Coughlan, Hrsg.), S. 119, Pergamon Press, Oxford, New York 1980.
- [10] D. Imhoff, *Clostridium barkeri*: Selenabhängiger Nikotinsäure- und Purinabbau sowie taxonomische Neuordnung. Dissertation, Universität Göttingen 1981.
- [11] C. A. Woolfolk u. J. S. Downard, *J. Bacteriol.* **135**, 422 (1978).
- [12] T. Sakai u. H. K. Jun, *Agric. Biol. Chem.* **43**, 753 (1979).
- [13] R. C. Bray, *The enzymes* (P. Boyer, Hrsg.), **Vol. 12**, S. 299, Acad. Press, New York 1975.
- [14] K. V. Rajagopalan u. P. Handler, *J. Biol. Chem.* **239**, 1509 (1964).
- [15] T. King u. R. Morris, *Methods in Enzymology* (R. W. Esterbrook u. M. E. Pullman, Hrsg.), **Vol. X**, S. 634, Acad. Press, New York 1967.
- [16] J. R. Andreesen, *Anaerobes and anaerobic infection* (G. Gottschalk, N. Pfennig u. H. Werner, Hrsg.), S. 31, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1980.
- [17] M. P. Coughlan, S. L. Betcher-Lange u. K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* **254**, 10694 (1979).
- [18] S. T. Smith, K. V. Rajagopalan u. P. Handler, *J. Biol. Chem.* **242**, 4108 (1967).
- [19] T. Ohe u. Y. Watanabe, *J. Biochem.* **86**, 45 (1979).
- [20] N. J. Lewis, P. Hurt, H. M. Sealy-Lewis u. C. Scazzocchio, *Eur. J. Biochem.* **91**, 311 (1978).
- [21] R. Eienthal u. A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* **139**, 715 (1974).
- [22] C. A. Woolfolk u. J. S. Downard, *J. Bacteriol.* **130**, 1175 (1977).