

# Die Phenoloxidasen des Ascomyceten *Podospora anserina*

## V. Eigenschaften der Laccase I nach weiterer Reinigung\*

H. PETER MOLITORIS und KARL ESSER

Institut für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität Bochum

Eingegangen am 1. April 1970

### The Phenoloxidases of the Ascomycete *Podospora anserina*

#### V. Properties of Laccase I after Further Purification

*Summary.* 1. By using an improved method for purification of the laccase I of the wild type of *Podospora anserina*, yield and specific activity of this enzyme have been increased, whereas its stability decreased.

2. Freshly prepared laccase I seems to be homogeneous, according to its behavior in hydroxylapatite-chromatography, in sedimentation-analysis and in disc-electrophoresis.

3. The catalytic, electrophoretic, spectral and molecular properties and the carbohydrate-composition of laccase I have been investigated. Laccase I exhibits a double-pH-optimum for its reaction with dopa (at pH 5.5 and 7.5), the isoelectric point being at pH 4.9. The enzyme is reversibly inhibited by sodium azide ( $K_i = 1.9 \times 10^{-6}$  M) and has absorption-maxima at 280 and 610 nm. The content of nitrogen, copper and carbohydrate is 13.6%, 0.3% and 23% of the dry weight, respectively. Hexosamine, mannose, glucose and galactose have been found in the carbohydrate moiety of the enzyme. The following molecular data were determined: sedimentation coefficient  $s_{20,w}^0 = 14.47 \times 10^{-13}$  sec, diffusion coefficient  $D_{20,w}^0 = 3.06 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec, partial specific volume = 0.701 ml/g, ratio of the frictional coefficient  $f/f_0 = 1.46$ . The molecular weight  $M_{s,D}$  (sedimentation and diffusion) is 390,000. This has been substantiated by finding a molecular weight  $M_w$  of 383,000 using equilibrium sedimentation. One molecule of laccase I contains therefore about 18 atoms of copper.

4. The laccase spectrum of a certain mutant strain is phenocopied if the wild type mycelium is grown in a medium of pH 5 or below.

5. The laccase occurs at different degrees of polymerisation. The respective sedimentation coefficients indicate that, depending on experimental conditions, aggregation to a dimer or dissociation into 4, perhaps 5 subunits, can occur. These subunits can be further split into halves.

6. The relation of the multiple forms of laccase I of the wild type to the laccases of some mutants of this fungus is discussed.

*Zusammenfassung.* 1. Die Laccase I des Wildstammes von *Podospora anserina* wurde nach einer verbesserten Methode gereinigt. Dadurch konnten Ausbeute und spezifische Aktivität des Enzyms gesteigert werden. Die Stabilität nahm dagegen ab.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

2. Das Verhalten der frisch gereinigten Laccase I bei der Chromatographie an Hydroxylapatit, in der Ultrazentrifuge und in der Disc-Elektrophorese spricht für deren molekulare Einheitlichkeit.

3. Die katalytischen, elektrophoretischen, spektralen und molekularen Eigenschaften sowie die Zusammensetzung der Laccase I wurden untersucht. Sie besitzt ein doppeltes pH-Optimum (pH 5,5 und 7,5), der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,9; sie wird durch Natriumazid reversibel gehemmt ( $K_i = 1,9 \cdot 10^{-6}$  M), die Absorptionsmaxima liegen bei 280 und 610 nm. Der Stickstoffgehalt beträgt 13,6%, der Kupfergehalt 0,3%, der Kohlenhydratgehalt 23% der Trockensubstanz. Im Kohlenhydratanteil wurden Hexosamin, Mannose, Glucose und Galactose nachgewiesen. Folgende molekulare Daten wurden ermittelt: Sedimentationskonstante  $s_{20,w}^0 = 14,47 \cdot 10^{-13}$  sec, Diffusionskonstante  $D_{20,w}^0 = 3,06 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec, partielles spezifisches Volumen = 0,701 ml/g, Verhältnis der Reibungskoeffizienten  $f/f_0 = 1,46$ . Das Molekulargewicht liegt bei 390.000 (Sedimentation, Diffusion); dies Ergebnis wird bestätigt durch ein mit Gleichgewichtsedimentation zu 383.000 ermitteltes Molekulargewicht. Ein Laccase-I-Molekül enthält somit etwa 18 Kupferatome.

4. Durch veränderte Anzuchtbedingungen des Wildstamm-Myceles (pH der Nährlösung unter 5) kann das Laccasespektrum einer bestimmten Mutante phänotypisch kopiert werden.

5. Die Laccase kommt in verschiedenen Polymerisationsstufen vor. Aus den gewonnenen Sedimentationskonstanten läßt sich je nach Versuchsbedingungen sowohl Aggregation zu einem Dimer folgern als auch Dissoziation in 4, möglicherweise 5 aktive Untereinheiten, die nochmals in Hälften zerfallen können.

6. Die Beziehungen der Laccase I des Wildtyps und ihrer verschiedenen Polymerisationsstufen zu den Mutanten-Laccasen werden diskutiert.

## Einleitung

In den vorausgegangenen Teilen dieser Veröffentlichungsreihe<sup>1</sup> wurden die im Mycel des Wildstammes und der Mutanten der *Podospora* gebildeten Phenoloxidasen beschrieben (Laccase: Teil I, II, III; Tyrosinase: Teil III, IV). Bei der Isolierung, Reinigung und biochemischen Analyse dieser Phenoloxidasen stellten sich charakteristische qualitative und quantitative Unterschiede zwischen einer höhermolekularen Laccase I und den niedermolekularen Laccasen II und III heraus, die besonders von den Mutanten gebildet werden (s. Teil VI). Für die weitere Untersuchung der molekularen Eigenschaften der Laccase I wurden größere Mengen eines hochgereinigten Enzyms benötigt. In der vorliegenden Arbeit wird eine verbesserte Methode der Aufarbeitung beschrieben, die zu einer höheren Enzymausbeute und einer gesteigerten spezifischen Aktivität (SpA) führte. Das so gereinigte Enzym wurde auf seine katalytischen und molekularen Eigenschaften sowie auf seine Zusammensetzung hin untersucht. Es zeigte, wie zu erwarten, eine Reihe von abweichenden Eigenschaften gegenüber der in Teil II beschriebenen Laccase. Weiterhin

<sup>1</sup> Referenzen der Mitteilungen I—VI am Anfang des Literaturverzeichnisses. Hinweise auf die einzelnen Mitteilungen erfolgen im Text durch die Kennzeichnung Teil I, Teil II usw.

ergaben sich Hinweise auf eine Spaltbarkeit der Laccase I in aktive Unterheiten, die u. a. den immer noch verhältnismäßig geringen Reinigungsfaktor und die geringe Stabilität der Enzymaktivität erklären können. Die Eigenschaften der hier beschriebenen Wildstamm-Laccase sind besonders für den Vergleich mit den niedermolekularen Mutanten-Laccasen (Teil III, VI) von Bedeutung.

## Material und Methoden

### Material

Als Wildstamm verwendeten wir den Stamm  $s_1$ - von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. Einzelheiten über Genetik und Entwicklungsgeschichte dieses Stammes bei Esser (1956a, 1959). Angaben zu der Mutante  $z$  finden sich bei Esser (1956b) und in Teil III, IV und VI.

Viele der in dieser Arbeit verwendeten *Methoden* sind bereits an anderer Stelle mitgeteilt worden: Anzucht der Mycelien, Herstellung der Extrakte, colorimetrische Aktivitätsbestimmung der Phenoloxidasen (Teil I), bisherige Reinigung der Laccase I, Bestimmung der Michaeliskonstanten, des Kohlenhydrat- und Kupfergehaltes (Teil II), analytische Disc-Elektrophorese und serologische Methoden (Teil III, VI bzw. Esser, 1963), Reinigung und Charakterisierung der Tyrosinase (Teil IV).

Folgende *Puffer* wurden verwendet: Phosphat-Puffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Acetat-Puffer (Essigsäure/NaOH), Borat-Puffer (Borsäure/Borax), Tris/HCl-Puffer [Tris(Hydroxymethyl)aminomethan/HCl], Ammoniumacetat-Puffer (Essigsäure/Ammoniak), McIlvain-Puffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /Citronensäure), Britton-Robinson-Puffer(II) (alle in Rauen, 1964).

*Anzucht der Mycelien für vergleichende Untersuchungen.* Unter den bisherigen Anzuchtbedingungen (flüssiges Maisdekoktmedium pH 6–7, Belüftung, 26°C, 4 Tage Kulturdauer) wurde Wildstamm-Mycel in Großfermentern der Farnefabriken Bayer A.G., Wuppertal-Elberfeld (1.000 l), und der Schering A.G., Bergkamen (2.500 l)<sup>2</sup> sowie später in der eigenen Fermenteranlage (300 l, Chemap A.G., Männedorf/Schweiz) angezogen.

### Protein- und Trockensubstanzbestimmungen

Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) und mit der Mikrokjeldahl-Methode bestimmt. Nur für die Routinemessungen des Proteingehaltes während der Aufarbeitungen und für alle SpA-Angaben wurde aus den Extinktionswerten bei 280 und 260 nm der Proteingehalt nach Warburg u. Christian (1941) ermittelt. Den analytischen Daten liegt das Trockengewicht (Vacuumtrockenpistole,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 70°C) zugrunde. Aufbewahrung der Trockensubstanz bei +4°C im Exsikkator.

### Kohlenhydratbestimmung

a) *Qualitativ mit Dünnschichtchromatographie.* Bei Raumtemperatur nach den bei Stahl (1967) beschriebenen Standardmethoden mit Geräten der Firmen Desaga GmbH, Heidelberg, und Camag, Muttens/Schweiz. Als Sorptionsmittel wurde Cellulosepulver CM 300 (Macherey, Nagel & Co., Düren) verwendet. Das Enzym wurde direkt oder nach Hydrolyse (a) 1,0 n HCl, 1 Std, 80°C; b) 1,0 n HCl, 2 $\frac{1}{2}$  Std,

<sup>2</sup> Beiden Firmen sei für ihr Entgegenkommen gedankt.

100°C; c) 3,0 n HCl, 4 Std, 100°C) untersucht. Als Fließmittel dienten (jeweils V/V): n-Butanol-Pyridin-Wasser 6:4:3 (Crumpton, 1959); n-Butanol-Propanol-Wasser 1:2:1 (Svennerholm u. Svennerholm, 1958, verändert); Pyridin-Äthylacetat-Essigsäure-Wasser 12:18:4:7 (Fischer u. Dörfel, 1955, verändert); Phenol, gesättigt mit Wasser + 1% NH<sub>3</sub> + KCN-Spuren (Partridge u. Westall, 1948). Die Chromatogramme wurden mit Silbernitratlösung angefärbt (Trevelyan et al., 1950) und mit Thiosulfat fixiert.

b) *Quantitativ*. Neben der Orcin-Methode wurde der Kohlenhydrat-Gehalt auch mit dem Anthronreagens nach Hörmann u. Gollwitzer (1962) ermittelt. Acylneuraminsäure wurde mit dem Bial-Reagens nach Böhm et al. (1954), Hexosamin direkt oder nach Hydrolyse der Laccase (2 n HCl, 16 Std, 100°C) mit dem Morgan-Elson-Reagens nach Blix (1948) bestimmt.

### Bestimmung des Molekulargewichtes

Alle diesbezüglichen Untersuchungen wurden mit frischer, dialysierter Laccase (0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0) bei  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$  durchgeführt an einer analytischen Ultrazentrifuge Modell E mit Schlierenoptik (Winkel  $70^\circ$ ) bzw. Monochromator (280 nm) und photoelektrischem Scanner (jeweils Beckman Instruments, München).

a) *Aus der Sedimentations- und Diffusionskonstante*. Sedimentationskonstante: Konzentrationsbereich 1,11–6,39 mg/ml: Schlierenoptik, 22 Läufe, 59.780 Upm, Aluminium-Einkanalzelle ( $4^\circ$ ); Konzentrationsbereich 0,21–0,25 mg/ml: Scanner, 3 Läufe, 56.100 Upm, Aluminium-Doppelsektorzelle, Saphirfenster.

Diffusionskonstante: Konzentrationsbereich 1,71–5,20 mg/ml: Schlierenoptik, 11 Läufe, 3.848 Upm, Doppelsektorzelle (Capillartyp mit synthetischer Grenzlinie). Die Sedimentations- und Diffusionskonstanten wurden jeweils auf Standardbedingungen umgerechnet und auf unendliche Verdünnung interpoliert. Das Molekulargewicht  $M_{sD}$  wurde nach der Svedberg-Gleichung errechnet.

b) *Aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen nach Yphantis (1964)*. Konzentrationsbereich 1,70–5,20 mg/ml: Schlierenoptik, 4 Läufe bei 7.447 und 4.059 Upm, 8-Kanal Kel-F Mittelstück, Saphirfenster. Berechnung des Molekulargewichtes  $M_w$  und Korrektur auf unendliche Verdünnung nach Elias (1961).

Das *partielle spezifische Volumen* wurde mit einem digitalen Präzisionsdensitometer (A. Paar KG, Graz/Österreich) nach Stabinger et al. (1967) bei  $25 \pm 0,02^\circ\text{C}$  ermittelt und auf  $20^\circ\text{C}$  umgerechnet<sup>3</sup>.

### Isoelektrischer Punkt

Der *isoelektrische Punkt* wurde durch Ampholine-Elektrofokussierung (Svensson, 1961) mit der LKB-Apparatur 8101 (LKB-Produkte AB, Bromma/Schweden) bestimmt (Aktivitäts- und pH-Messungen von 1,5 ml Fraktionen; pH-Gradienten 3–10, 3–5 und 4–6).

### Hemmkinetik

Art und Ausmaß der Hemmung wurden im normalen Reaktionsansatz colorimetrisch als Geschwindigkeit ( $v$ ) der Dopa-Oxydation mit Natriumazid als Hemmstoff untersucht mit den Variablen: Konzentration des Substrates ( $S$ ), des Hemmstoffes ( $J$ ) und des Enzyms. Die Reversibilität der Hemmung wurde nach Ackermann u. Potter (1949) geprüft, während die weitere Ermittlung des Hemmungstyps nach den in Dixon u. Webb (1964) angegebenen Methoden erfolgte.

<sup>3</sup> Wir danken Herrn Dr. B. Kiekhöfen, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg (Direktor: Prof. Dr. O. Westphal), für seine Hilfe bei der Durchführung der Messungen.

### Bestimmung der Enzymaktivitäten

**Katalasebestimmung.** Die polarographische Bestimmung der Katalase wurde durchgeführt nach der von Wisser (1968) angegebenen Methode mit dem Tetrapolaron (Dr. A. Kuntze GmbH & Co. KG, Düsseldorf-Oberkassel).

Eine *Enzymeinheit* (*E*) entspricht einer Extinktionsänderung von 0,2/min bei 436 nm und 1 cm Lichtweg. Als *Substrat* wurden DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin (= DL-Dopa, reagiert mit Laccase und Tyrosinase), Kaliumferrocyanid und Ascorbinsäure (beide spezifisch für Laccase) verwendet.

Da die Tyrosinase im Verlauf der Reinigung abgetrennt und ihre Abwesenheit durch spezifische Reaktionen nachgewiesen wurde, konnte Dopa als Substrat für die Routine-Aktivitätsbestimmungen der Laccase eingesetzt werden.

p-Kresol, das mit Laccase weiße, als Trübung ausfallende Dikresole und mit Tyrosinase einen roten Farbstoff bildet, wurde als Enzymsubstrat zu Schnelltesten und zur Anfärbung von Enzymbanden nach Disc-Elektrophorese und Immun-Elektrophorese verwendet.

Die *spezifische Aktivität* (SpA) gibt die Anzahl der Enzymeinheiten pro mg Protein an (E/mg Protein, bestimmt nach Warburg u. Christian, 1941).

Falls *Fehlergrenzen* angegeben werden, handelt es sich um den einfachen, mittleren Fehler des Mittelwertes, dem wenigstens 4 unabhängige Messungen zugrunde liegen.

## Versuchsergebnisse und Diskussion

### 1. Reinigung

Die in Teil II angegebene Methodik der Enzymgewinnung wurde wie folgt verändert: Das Mycel wurde vor und nach dem Aufbrechen in der Hughes-Presse bis zur weiteren Verarbeitung in Polyäthylenbeutel unter Stickstoffschutz eingeschweißt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dadurch wurde die normalerweise bei der Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe beobachtete Inaktivierung stark vermindert. Die weiteren Änderungen ergeben sich aus der Tab. 1.

Durch die Zentrifugation bei  $35.000 \times g$  wurden störende Polysaccharide und durch den Einsatz der Molekularsiebsäule ein Großteil von Fremdproteinen und Pigmenten abgetrennt. Dadurch konnte auf zwischengeschaltete Dialysen verzichtet werden, die Zeit- und Aktivitätsverluste gebracht hatten. Anstelle der zwar besser trennenden, aber besonders bei hohen Füllhöhen sehr langsam laufenden Sephadex G-200 Säule kann auch eine BIO-Gel A 0,5-m Säule eingesetzt werden, wodurch Zeit gewonnen wird.

Von der Hydroxylapatit-Säule wurden mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 6 zwei gefärbte Gipfel eluiert, deren zweiter auch geringe Enzymaktivität bei niedriger SpA aufwies. Die Hauptmenge des Enzyms (ca. 90%) kam mit dem 0,4 M Phosphatpuffer als tiefblau gefärbte Lösung von der Säule (vgl. Teil II) und wurde weiterverarbeitet.

Bei den 28 durchgeführten Reinigungen zeigte sich, daß nicht nur die SpA, sondern auch die Enzymausbeute erheblich gesteigert und der Reinigungsfaktor gegenüber dem Rohextrakt von 24 (Teil II) auf 55 erhöht wurde (Tab. 1). Es fiel jedoch auf, daß in den Elutionsdiagrammen der Molekularsieb- und Hydroxylapatit-Säulen die SpA jetzt keine

Tabelle 1. *Typische Reinigung der Laccase I nach dem verbesserten Reinigungsverfahren\**

Nr. Reinigungsschritt	Aktivität (E/kg Feucht- mycel)	Spez. Akt. (E/mg Prot.) <sup>a</sup>	Enzym- ausbeute in % <sub>0</sub>	Reinigung
1 Rohextrakt	59.700	2,7	100	1,0
2 Überstand nach Protaminsulfatfällung <sup>b</sup>	62.800	7,8	105	2,8
3 Überstand nach 1. Ammonsulfatfällung (0–55%) <sup>c</sup>	1.167	0,2	2	—
4 Überstand nach 2. Ammonsulfatfällung (55–75%)	0	0	—	—
5 Überstand nach Zentrifugation (15 Std bei 35.000 × g) des in Puffer <sup>d</sup> gelösten Präzipitats von Schritt 4	38.800	28	65	9,1
6 Gipffaktionen der Sephadex G-200 Säule (87 · 3,5 cm) <sup>e</sup>	29.700	106	50	34,8
7 Gipffaktionen der Hydroxylapatitsäule (10 · 3 cm) <sup>f</sup>	18.000	129	30	42,3
8 nach Dialyse (0,1 M Phosphatpuffer pH 6; mind. 36 Std) und Zentrifugation (30 min, 55.000 × g)	22.200	169	37	55,4
9 Entsprechende Endwerte der Reinigung Teil II	8.842	123,2	15,2	23,7

\* Alle Reinigungsschritte wurden bei + 4°C durchgeführt. Der Rohextrakt wurde aus 1500 g Mycel (Feuchtgewicht) des Wildstammes hergestellt.

<sup>a</sup> Proteinbestimmung nach Warburg u. Christian (1941).

<sup>b</sup> Ansteigen der Aktivität bedingt durch Aktivierung der im Rohextrakt noch enthaltenen Tyrosinase (vgl. Teil IV).

<sup>c</sup> Reversible Inaktivierung durch Ammonsulfat.

<sup>d</sup> 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

<sup>e</sup> Durch Säule mit Bio-Gel A 0,5-m ersetzbar. 0,02 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

<sup>f</sup> Stufengradient, Phosphatpuffer pH 6; 0,02 M; 0,20 M; 0,40 M. Nach Pigment- und Fremdproteinvorgipfeln kommt die Hauptmenge der gereinigten Laccase bei der 0,4 M Pufferstufe von der Säule = Schritt 7.

deutliche Plateauzone mehr zeigt, wie es für ein hochgereinigtes, stabiles Enzym zu erwarten wäre (vgl. Teil II). Auf dieses Phänomen wird noch einzugehen sein (s. S. 290).

## 2. Reinheitskriterien

Frisch gereinigtes Material von eng geschnittenen Elutionsgipfeln zeigte in der Ultrazentrifuge nur einen symmetrischen Gipfel. In der Disc- und Agargel-Elektrophorese wurden nach Anfärben auf Protein (mit Amidoschwarz) und auf Enzymaktivität (mit Dopa oder p-Kresol) nur eine Bande bzw. ein Fleck gefunden.

## 3. Stabilität bei der Aufbewahrung

Für die weiteren Untersuchungen war es von Wichtigkeit, Bedingungen zu finden, unter denen Aktivität und Konfiguration der Laccase I möglichst erhalten bleiben. Optimale Stabilität (Tab.2) wurde erreicht,

Tabelle 2. Stabilität der Laccaseaktivität

Untersuchter Parameter	Variation des Parameters	Optimale Stabilität bei
Temperatur (°C)	+ 60; + 22; + 4; - 18;	- 18
pH-Wert	3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8;	5,0
Enzymkonzentration (mg Trockensubstanz/ml)	0,05; 0,23; 0,5; 2,3;	> 2,3
Phosphatpufferkonzentration (M)	0,02; 0,05; 0,15; 0,40; 0,45;	0,05—0,15
Zusätze bei + 22°C	20% Glycerin; 20% Saccharose; ohne Zusatz	20% Glycerin
+ 4°C	20% Glycerin; 20% Saccharose; 10% Rinderserumalbumin; ohne Zusatz	20% Glycerin
- 18°C	20% Glycerin; 20% Saccharose; 10% Rinderserumalbumin; ohne Zusatz	20% Glycerin

Frisch gereinigte Laccase I wurde unter den angegebenen Bedingungen inkubiert und die Restaktivität in Abständen über einen Zeitraum von mehreren Monaten gemessen. Wenn nicht anders angegeben, wurde in 0,4 M Phosphatpuffer pH 6 bei + 4°C inkubiert. Undialysierte Laccase I, SpA 121—148.

wenn konzentrierte Laccase I in gelöstem Zustand bei möglichst niedriger Temperatur, pH 5 und einer Pufferkonzentration um 0,1 M aufbewahrt wurde. Durch Zusatz von 20% Glycerin konnte das Enzym auch noch bei -20°C in gelöstem Zustand erhalten werden.

Soweit der Glycerinzusatz bei den folgenden Untersuchungen stören konnte, wurde auf ihn verzichtet.

Tabelle 3. Stabilität der Laccaseaktivität in verschiedenen Puffern

Puffer	Restaktivität in % (nach 17 Tagen bei + 4°C)											
	Zusätze											
	keine EDTA		CaCl <sub>2</sub>		MgCl <sub>2</sub>		CaCl <sub>2</sub>		MgCl <sub>2</sub>			
	1 · 10 <sup>-3</sup> M	1 · 10 <sup>-2</sup> M	1 · 10 <sup>-1</sup> M	1 · 10 <sup>-3</sup> M	1 · 10 <sup>-2</sup> M	1 · 10 <sup>-1</sup> M	1 · 10 <sup>-3</sup> M	1 · 10 <sup>-2</sup> M	1 · 10 <sup>-1</sup> M	1 · 10 <sup>-3</sup> M	1 · 10 <sup>-2</sup> M	1 · 10 <sup>-1</sup> M
Phosphat 0,10M pH 6,0	38	73	75	65	—	—	—	—	—	—	—	—
Phosphat 0,10M pH 7,0	20	48	45	16	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetat 0,10M pH 6,2	68	—	—	—	63	62	24	60	71	45	—	—
Tris-HCl 0,10M pH 7,2	45	—	—	—	43	49	29	58	52	45	—	—
Borat 0,10M pH 7,2	71	—	—	—	73	71	61	73	69	58	—	—

Frische Laccase I (in 0,4 M Phosphatpuffer pH 6, SpA = 119) wurde mit dem zu prüfenden Puffer auf 70 E/ml verdünnt und gegen den gleichen Puffer bei mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert (27 Std, + 4°C). Nach Zugabe der Zusätze für die angegebenen Endkonzentrationen wurde mit dem jeweiligen Puffer auf 1,0 ml aufgefüllt und bei + 4°C im Dunkeln unter Luftabschluß inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Restaktivität im üblichen Test mit Dopa geprüft.

Wie aus Tab.3 ersichtlich, wurde in einem weiteren Versuch über die Erhaltung der Enzymaktivität der Einfluß verschiedener Puffer sowie von EDTA und den bivalenten Kationen  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  (zugesetzt als  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ ) geprüft.

Aus den Kontrollen zeigte sich, daß *Boratpuffer* (0,1 M; pH 7,2) für die Erhaltung der Aktivität am günstigsten war.

Ein Zusatz von EDTA in einer Endkonzentration von  $1 \cdot 10^{-3}$  bis  $1 \cdot 10^{-2}$  M verdoppelte die Stabilität bei den Phosphatpuffern gegenüber der Kontrolle (vgl. auch Peisach u. Levine, 1965). Die höchste Restaktivität wurde bei der Kombination 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 mit  $1 \cdot 10^{-2}$  M EDTA gefunden.

$\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  fördern die Erhaltung der polymeren Struktur und der katalytischen Aktivität bei Hämocyanin, einem der Laccase in vieler Hinsicht ähnlichen Kupfer-Glykoprotein (Literatur bei Konings, 1969). Tab.3 zeigt, daß sowohl  $\text{CaCl}_2$  als auch  $\text{MgCl}_2$  zwischen  $1 \cdot 10^{-3}$  und  $1 \cdot 10^{-2}$  M die Stabilität der Laccase I leicht fördern, bei  $1 \cdot 10^{-1}$  M sie jedoch vermindern.

Dem fördernden Einfluß der bivalenten Kationen steht hier möglicherweise bei höheren Konzentrationen der von Peisach u. Levine (1965) und Malkin et al. (1968) beobachtete Hemmeffekt des Chlorid-Ions entgegen.

Wurde das in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 gelöste, tiefblaue Enzym direkt gefriergetrocknet, so blieb die blaue Farbe weitgehend erhalten, die in Analogie zu Befunden von Malmström et al. (1968) dem  $\text{Cu}^{++}$ , Typ 1 der Laccase zuzuschreiben wäre. Wurde das Enzym jedoch, um pufferfreies Material zu erhalten, zuerst in 0,02 M Ammonacetat-Puffer pH 6,52 überführt und dann lyophilisiert, so war das Produkt fast farblos. Beide Arten des gefriergetrockneten Enzyms lösen sich nur unvollständig wieder in Puffer und verlieren dabei einen Großteil ihrer Aktivität. Da bei allen Aufbewahrungsmethoden Aktivitätsverluste aufgetreten waren, wurde für die Messung der Aktivität und biophysikalischer Daten nur frisches Enzym verwendet, während zur Ermittlung analytischer Daten weitgehend gefriergetrocknetes Material eingesetzt wurde.

Aus den Versuchen geht hervor, daß durch die *neue Reinigungsmethode Ausbeute und SpA der Laccase I gesteigert* werden. Die *Stabilität des hochgereinigten Enzyms hat jedoch abgenommen*. Das gleiche fanden Fling et al. (1963) für die hochgereinigte Tyrosinase aus *Neurospora*.

#### 4. Eigenschaften der gereinigten Laccase

In Tab.4 sind eine Reihe von Eigenschaften der Laccase I mit den Vergleichswerten aus Teil II aufgeführt.

Tabelle 4. *Eigenschaften der gereinigten Laccase I*

Zeile	Parameter	Dimension	Ergebnis	Vergleichswerte aus Teil II
<b>a) Aktivitäts-Daten</b>				
1	Spezifische Aktivität <sup>a</sup>	E/mg Protein	150—180	123,2
2	Substratspezifität, Michaeliskonstante $K_m$	Dopa	$3,03 \pm 0,12 \cdot 10^{-3}$	$3,54 \pm 0,13 \cdot 10^{-3}$
3		Kaliumferrocyanid	$1,03 \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$	$5,32 \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$
4		Ascorbinsäure	1,92	$1,47 \pm 0,32 \cdot 10^{-5}$
5		Brenzkathechin	$2,27 \pm 0,44 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \pm 0,23 \cdot 10^{-3}$
Zusätze zum Reaktionsansatz mit Dopa <sup>b</sup>				
6	CuCl (Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ M Cu <sup>+</sup> )		keine Wirkung	
7	CuSO <sub>4</sub> (Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ M Cu <sup>++</sup> )		keine Wirkung	
8	MgCl <sub>2</sub> oder CaCl <sub>2</sub> (Konzentration 0 bis $3,7 \cdot 10^{-3}$ M Kation)	% Hemmung	bis 20	
Hemmung				
9	EDTA (Konzentration 0 bis $3,4 \cdot 10^{-4}$ M)		keine Wirkung	
10	NaN <sub>3</sub> , Dissoziationskonstante $K_1$ des Enzym-Inhibitor-Komplexes			
11	Art der Hemmung	M	$1,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$	
12	Hitzeinaktivierung, Halbwertszeit bei 60°C <sup>a</sup>	min	reversibel, nicht kompetitiv <sup>c</sup> $5,4 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,5$
<b>b) Analytische Daten</b>				
13	Trockensubstanz-Umrechnungsfaktor a (Proteingehalt n. Warburg u. Christian $\times a$ = Trockensubstanzgehalt)		$0,46 \pm 0,01$	$0,90 - 0,95$
14	Proteingehalt der Trockensubstanz (Lowry et al., 1951)	%	$72,8 \pm 3,8$	
15	Stickstoffgehalt der Trockensubstanz (Mikrokjeldahl)	%	$13,6 \pm 0,4$	$7,5 \pm 0,1$
16	Proteingehalt der Trockensubstanz (Mikrokjeldahl Faktor 6,25)	%	$85,1 \pm 2,2$	$46,9 \pm 0,3$
17	Kohlenhydratgehalt der Trockensubstanz (Orcin) <sup>e</sup>	%	$23,7 \pm 0,5$	$12,1 \pm 0,4$
18	Kohlenhydratgehalt der Trockensubstanz (Anthron) <sup>e</sup>	%	$21,5 - 24,5$	
19	Gehalt des Kohlenhydrates an freiem Hexosamin <sup>f</sup>	%	ca. 7	
20	Gehalt des Kohlenhydrates an gebundenem Hexosamin <sup>g</sup>	%	ca. 18—19	
21	Kupfergehalt der Trockensubstanz	%	$0,298 \pm 0,013$	$0,123 \pm 0,004$
<b>c) Spektrale Daten</b>				
22	Absorptionsspektrum Maxima	nm	605—610, 280	605, 280
23	Schultern	nm	290	640, 340, 290
24	Minima	nm	490—510, 250	510, 250

c) <i>Spektrale Daten</i>				
25	Absorptionsverhältnis D 280 nm/D 605 nm	40,43 ± 2,44		44,3 ± 1,5
26	D 280 nm/D 260 nm	1,66 ± 0,01		
27	Extinktionskoeffizient Kupfer ξ 605/mM	1,047 ± 0,078	cm <sup>-1</sup>	1,111 ± 0,114 <sup>h</sup>
28	Extinktionskoeffizient Laccase ξ 605/mM	19,15 ± 1,42	cm <sup>-1</sup>	7,78 ± 0,80
d) <i>Molekulare Daten</i>				
29	partielles spezifisches Volumen V <sub>20</sub>	0,701	ml/g	0,63 <sup>i</sup>
30	Sedimentskonstante s <sub>20,w</sub> <sup>o</sup>	14,47 ± 0,06 · 10 <sup>-13</sup>	sec	16,4 ± 0,06 · 10 <sup>-13</sup> <sup>i</sup>
31	Diffusionskonstante D <sub>20,w</sub> <sup>o</sup>	3,06 ± 0,04 · 10 <sup>-7</sup>	cm <sup>2</sup> · sec <sup>-1</sup>	3,08 ± 0,23 · 10 <sup>-7</sup> <sup>i</sup>
32	Molekulargewicht aus Sedimentation/Diffusion M <sub>s,D</sub>	390.000 ± 3.000	Dalton	361.000
33	Molekulargewicht aus Sedimentationsgleichgewicht M <sub>w</sub>	383.000 ± 6.000	Dalton	
34	Verhältnis der Reibungskoeffizienten f/f <sub>0</sub> <sup>i</sup>	1,46		1,59 <sup>h</sup>
35	Kupferatome pro Enzymmolekül (390.000 Molekulargewicht)	18,3 ± 1,0		7
e) <i>Elektrophoretische Daten</i>				
36	Disc-Elektrophorese (Reaktion mit Amidoschwarz, Dopa oder p-Kresol; anodische Wanderung bei pH 8,3/9,5)	R <sub>f</sub>	0,10—0,11	
37	Isoelektrischer Punkt (Elektrofocussierung im pH-Gradienten) pI	4,9		5,1 <sup>k</sup>

Soweit nicht anders angegeben, wurde die Laccase nach Dialyse gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 untersucht. Alle biophysikalischen Messungen wurden bei 20°C durchgeführt oder auf diese Temperatur korrigiert.

<sup>a</sup> Werte schwanken mit Charge des Mycels, Dauer der Aufarbeitung, Schmalheit der weiterverarbeiteten Aktivitätsgipfel; Maximalwerte über dem angegebenen Bereich.

<sup>b</sup> Normaler Reaktionsansatz mit Dopa (Endkonzentration 1,5 · 10<sup>-3</sup> M) in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6. Zusatz der Substanzen unmittelbar vor Reaktionsbeginn.

<sup>c</sup> doch s. Diskussion im Text (S. 278).

<sup>d</sup> Mit oder ohne vorherige Dialyse gegen 0,10 M Phosphatpuffer pH 6.

<sup>e</sup> Bezogen auf Galactose.

<sup>f</sup> Bezogen auf Glucosamin.

<sup>g</sup> Bezogen auf Glucosamin, Probe hydrolysiert.

<sup>h</sup> Werte berechnet aus den in Teil II angegebenen Daten.

<sup>i</sup> Bestimmt in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6.

<sup>j</sup> Verhältnis des Reibungskoeffizienten *f* des untersuchten Materials zu dem Reibungskoeffizienten *f*<sub>0</sub> einer unhydratisierten Kugel gleicher Masse.

<sup>k</sup> Zonelektrophorese im Dichtegradienten.

## a) Aktivitäts-Daten (Tab.4, Zeile 1–12)

Gegenüber der früher beschriebenen Reinigung ist die *SpA* stark erhöht. Signifikante Unterschiede zeigen auch die *Michaeliskonstanten* für Ascorbinsäure und Kaliumferrocyanid.

Der Zusatz von *EDTA* und ein- und zweiwertigem Kupfer zum Reaktionsgemisch mit Dopa hatte bei sofortiger Messung in den untersuchten Konzentrationen keine Wirkung auf die Aktivität. Der Einfluß der Kupferionen ist offenbar stark vom Substrat abhängig, denn von Peisach u. Levine (1965) und Iwasaki et al. (1967) wurde übereinstimmend gefunden, daß  $\text{Cu}^{++}$  mit Hydrochinon als Substrat die Laccase-Aktivität nicht beeinflusste, während mit Brenzcatechin Aktivitätssteigerung beobachtet wurde. Die mit  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  gefundene 20% Hemmung ist offenbar auf das Chlorid-Ion zurückzuführen (Peisach u. Levine, 1965; Malkin et al., 1968).

*Hemmversuche.* Das niedermolekulare *Natriumazid* erwies sich als wirkungsvoller Hemmstoff der Laccase ( $K_i = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$  M). Da Natriumazid mit Kupfer Komplexe bildet, ist anzunehmen, daß dadurch die katalytische Aktivität der kupferhaltigen Laccase gehemmt wird. Die Hemmung durch Natriumazid ist reversibel. Reversible Hemmung durch Komplexbildung des Hemmstoffes mit dem Kupfer von Phenoloxidasen wurde bereits verschiedentlich festgestellt (Teil IV; Suzuki, 1959; Pomerantz, 1963).

Dies konnte durch einen Versuch bestätigt werden, bei dem das Enzym zwei Tage bei  $+4^\circ\text{C}$  mit  $3,8 \cdot 10^{-3}$  M Natriumazid inkubiert wurde, was zu einer 90% Hemmung führte. Durch Ausfällen des Proteins (80% Sättigung mit Ammonsulfat), Abzentrifugieren und Wiederaufnehmen des Sedimentes in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6, wurde die ursprüngliche Aktivität fast völlig wiedergewonnen. Dadurch wird sowohl die Reversibilität der Hemmung bewiesen als auch die Möglichkeit ausgeschaltet, daß diese auf einer Abspaltung eines Kupfer-Azid-Komplexes beruht.

Ein weiterer Hinweis für die starke Bindung des Kupfers in der Laccase ist die Tatsache, daß es sich auch durch ausgiebige Dialyse nicht entfernen läßt.

Im Gegensatz zum niedermolekularen Natriumazid kommt es mit dem höhermolekularen *EDTA*, offenbar aus sterischen Gründen, nicht zu einer Kupfer-Hemmstoff-Komplexbildung, wodurch die an Laccase u.a. durch Peisach u. Levine (1965), Iwasaki et al. (1967) erhobenen Befunde bestätigt werden.

Die Auswertung der Daten der Hemmversuche mit Natriumazid (Methodik in Dixon u. Webb, 1964) nach Lineweaver-Burk (Abb. 1) oder Hofstee läßt zunächst auf eine nichtkompetitive Hemmung schließen. Die Tatsache jedoch, daß bei der Auftragung nach Dixon keine Geraden resultieren (Abb. 2), weist auf einen gemischten Hemmtyp hin. Folgende Deutung bietet sich an: Für die Bindung des Substrates am Enzym ist ein aktives Zentrum verantwortlich (mit  $\text{Cu}^{++}$ , Typ 1; Pilzlaccase;

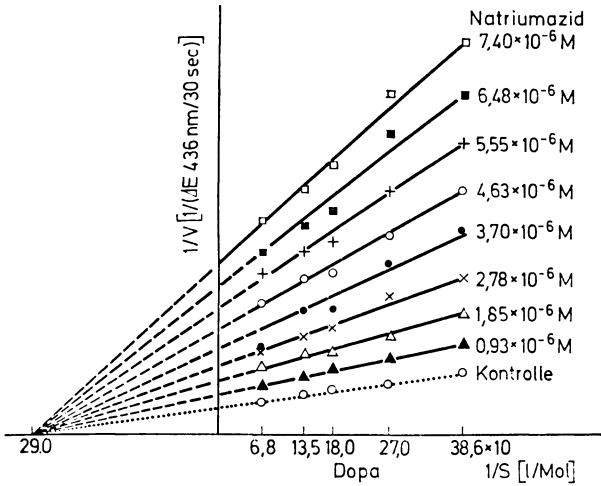


Abb. 1. Hemmung der Dopa-Oxydation der Laccase I durch Natriumazid. Auftragung nach Lineweaver-Burk. Im normalen Reaktionsansatz wurde der Hemmstoff unmittelbar vor dem Enzym zugegeben ( $0,054 \text{ mg Laccase pro Ansatz} = 1,4 \cdot 10^{-10} M$ ).

Frische Laccase, dialysiert gegen  $0,1 M$  Phosphatpuffer pH 6; SpA = 115

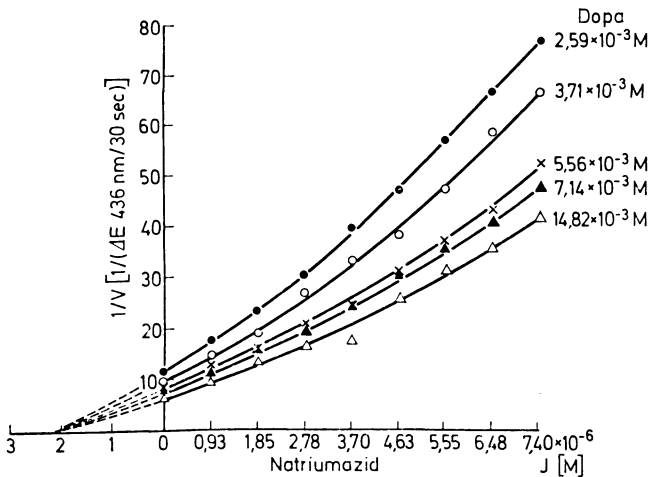


Abb. 2. Hemmung der Dopa-Oxydation der Laccase I durch Natriumazid. Auftragung der Versuchsdaten von Abb. 1 nach Dixon. Nähere Erläuterung im Text

Malmström et al., 1969), während die Komplexbildung des Natriumazids mit dem Enzym-Kupfer an einem zweiten aktiven Zentrum der Laccase stattfindet (mit  $Cu^{++}$ , Typ 2; Pilzlaccase; Malkin et al., 1968).

Für die spezifische katalytische Aktivität der Laccase, nämlich die durch den Elektronenüberträger Kupfer vermittelte Oxydation des Substrates bei gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff, müssen jedoch alle aktiven Zentren zusammenwirken. Dabei ist deren Abstand möglicherweise so gering, daß eine gegenseitige Beeinflussung in einem mehr kompetitiven Sinne resultiert.

Auch Macrae u. Duggleby (1968) und Walker (1969) schließen aus ihren Untersuchungen an Kartoffel- bzw. Apfel- Phenoloxydase auf das Vorhandensein zweier verschiedener aktiver Zentren für die Substrat- bzw. Inhibitorbindung.

Da bei der colorimetrischen Messung der Laccaseaktivität mit Dopa die Bildung des gefärbten Endproduktes einer Mehrschrittreaktion bestimmt wird und weiterhin mehrere aktive Zentren im Enzym vorhanden sind (Malmström et al., 1969), sind auch Zwischenwirkungen nicht auszuschließen, die den Hemmungstyp verschleiern können. Es ist daher vorgesehen, die Hemmkinetik auch an Einschnittreaktionen im Polarographen zu überprüfen.

*Hitzeinaktivierung.* Die Halbwertszeit der Hitzeinaktivierung frisch gereinigter Laccase I entspricht mit 5,4 min dem bereits in Teil II mitgeteilten Wert. Eine logarithmische Auftragung der Restaktivität in % gegen die Inkubationszeit ergibt eine Gerade, entsprechend einem nach einer Reaktion I. Ordnung verlaufenden Aktivitätsverlust (Abb.5, Gerade A). Im Gegensatz dazu steht der Verlauf der Hitzeinaktivierung gealterter Laccase. Darauf wird später noch eingegangen (S. 291).

#### b) Analytische Daten (Tab.4, Zeile 13—21)

Der Proteingehalt wurde zunächst nach Warburg u. Christian (1941) ermittelt. In Parallelversuchen wurde jedoch festgestellt, daß der Trockensubstanzgehalt nur knapp 50% des nach Warburg u. Christian ermittelten Proteingehaltes ausmacht.

Da diese spektrophotometrische Methode ursprünglich für Hefe-Enolase entwickelt wurde, ist ein *Umrechnungsfaktor* erforderlich, der für die frische gereinigte Laccase I 0,46 beträgt (Tab.4). Da aber weiterhin festgestellt wurde, daß das Absorptionsverhältnis  $D^{280}/D^{260}$  beim Stehenlassen der Laccase langsam abnimmt (vor allem Abnahme bei 280 nm), kam diese Methode zur Bestimmung absoluter Proteinwerte nicht mehr in Frage. Wegen der Einfachheit und Schnelligkeit der Methode wurde sie jedoch für Routinebestimmungen der SpA bei den Aufarbeitungen verwendet, wo relative Werte ausreichend waren.

Alle hier angegebenen *analytischen Werte* beziehen sich daher auf Trockensubstanzbestimmungen. Während das Trockengewicht der hier beschriebenen Laccase I nur etwa 50% des Warburg u. Christian-Wertes ausmacht, betrug es bei der Laccase I aus Teil II 90—95% dieses Wertes. Diese Differenz erklärt einen Großteil der Unterschiede in den analytischen Daten gegenüber Teil II, soweit sie auf Protein- oder Trockensubstanzwerten basieren (z.B.  $\xi \frac{605}{\text{mM}}$  Laccase, Kohlenhydrat- und Kupfergehalt etc.).

Der aus der Stickstoffbestimmung (Mikrokjeldahl) ermittelte *Protein-gehalt* liegt bei 85% der Trockensubstanz, der nach Lowry et al. (1951) bestimmte Wert jedoch nur bei 73%, also 12% niedriger.

Die Differenz ist darauf zurückzuführen, daß mit der Methode nach Lowry über den Tyrosin- und Tryptophangehalt nur der Proteinanteil, bei der Kjeldahl-Methode jedoch der Gesamtstickstoff erfaßt wird und damit auch nichtprotein-artige, jedoch stickstoffhaltige Anteile des Enzyms.

Die im Vergleich zur Trockensubstanzmenge niedrigen Proteinwerte erklären sich durch einen Anteil von 24 bzw. 22% (Orcin- bzw. Anthron-methode) Kohlenhydrat, doppelt so viel wie in Teil II berichtet. Der Kohlenhydratgehalt liegt damit innerhalb der Grenzen, die auch bei anderen kupferhaltigen Glykoproteinen mit Oxydaseaktivität gefunden wurden (Literatur s. unten). Er ergänzt sich mit dem Proteingehalt (nach Lowry et al.) auf ca. 100%. Wie bei einem pflanzlichen Protein nicht anders zu erwarten, wurde keine Neuraminsäure gefunden.

Eine vorläufige qualitative Untersuchung verschiedener Laccasehydrolysate mit Dünnschichtchromatographie ergab folgende *Hauptkomponenten des Kohlenhydrates* (in der Reihenfolge abnehmender Konzentration): Hexosamin (wahrscheinlich Glucosamin), Mannose, Glucose, eine schnelle Komponente (Pentose?) und Galactose. Diese Komponenten finden sich auch in der Laccase des Pilzes *Polyporus* (Fähræus u. Reinhammar, 1967). Der Gehalt des Kohlenhydrates an *freiem* Hexosamin wurde nach Blix (1948) zu 7%, an *gebundenem* Hexosamin zu 18% bestimmt.

Der hohe Hexosamingehalt der Laccase erklärt damit auch die Tatsache, daß der Proteinanteil nach Kjeldahl über dem nach Lowry bestimmten Wert liegt; er erreicht jedoch nicht 100% der Trockensubstanz, da der mittlere Stickstoffgehalt des Kohlenhydrates unter dem von Aminosäuren liegt.

Der Kohlenhydratgehalt des gereinigten Enzyms war bei verschiedenen Aufarbeitungen, auch nach Rechromatographie, stets gleich, unabhängig davon, ob das Enzym an Dextrangelen (Sephadex) oder Polyacrylamidgelen (Bio-Gel) chromatographiert wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es sich bei der *Laccase I* um ein *Glykoprotein mit kovalent gebundenem Kohlenhydratanteil* handelt, wie es bereits von anderen Laccasen berichtet wurde (Nakamura, 1958; Mosbach, 1963). Gleiches gilt auch für weitere kupferhaltige Oxydasen wie Ascorbinsäure-Oxydase (Stark u. Dawson, 1962). Coeruloplasmin (Jamieson, 1965), Hämocyanin (Konings, 1969) und Stellacyanin (Peisach u. Blumberg, 1967).

Der *Kupfergehalt* entspricht mit etwa 0,3% der Trockensubstanz dem anderer Laccasen, liegt damit jedoch um mehr als das Doppelte über dem in Teil II berichteten Wert, was sich durch die höhere Reinheit

des Enzyms und den bereits besprochenen Trockensubstanz-Umrechnungsfaktor erklärt.

c) Spektrale Daten (Tab.4, Zeile 22—28)

Die Maxima und Minima im *Absorptionsspektrum* der Laccase I haben sich gegenüber Teil II nicht verändert.

In Analogie zu den Befunden von Malmström et al. (1968) dürfte das Absorptionsmaximum bei 605 nm auf die Anwesenheit des  $\text{Cu}^{++}$  Typ 1 in der Laccase I zurückzuführen sein. Der z. B. beim Stehenlassen des Enzyms, bei der Gefriertrocknung oder der Reaktion mit Substrat beobachtete Verlust der blauen Farbe ist demnach mit einer Reduktion dieses  $\text{Cu}^{++}$ -Ions verbunden.

Die in Teil II bei 340 nm und 640 nm beobachteten Schultern treten nicht mehr auf.

Die Tatsache, daß um 410 nm keine verstärkte Absorption mehr festgestellt wurde, deutet auf eine Abtrennung der hier absorbierenden verunreinigenden Pigmente hin.

Das Verhältnis der Extinktionswerte der beiden Gipfel,  $D^{280}/D^{605}$ , blieb gegenüber Teil II unverändert und liegt mit einem Wert um 40 etwa doppelt so hoch wie die von Nakamura (1958), Mosbach (1963) und Iwasaki et al. (1967) für Laccasen angegebenen Werte. Das Absorptionsverhältnis  $D^{280}/D^{605}$  ist gestiegen und liegt im Mittel bei 1,66 mit Maximalwerten über 1,70 und deutet damit ebenfalls einen höheren Reinheitsgrad an. Der millimolare Extinktionskoeffizient des Kupfers  $\xi \frac{605}{\text{mM Cu}} = 1,047$  entspricht den in Teil II und bei Nakamura (1958), Mosbach (1963) und Fähræus u. Reinhammar (1967) berichteten Werten.

Der millimolare Extinktionskoeffizient für die Laccase  $\xi \frac{605}{\text{mM Laccase}} = 19,15$  (berechnet auf der Basis des Molekulargewichtes, s. unten) liegt dagegen um den Faktor 2,5 über den Werten von Teil II.

d) Molekulare Daten (Tab.4, Zeile 29—35)

Da die genaue Bestimmung des *partiellen spezifischen Volumens*, besonders bei kleinen Probenmengen, methodische Schwierigkeiten bereitet, wurde bisher vielfach — und das trifft auch für die meisten Arbeiten mit Phenoloxidasen zu — mit angenommenen oder nur annähernd bestimmten Werten gearbeitet. Durch die Anwendung eines Präzisionsdensitometers konnte das partielle spezifische Volumen der Laccase zu 0,701 ml/g bestimmt werden.

Dieser Wert liegt niedriger als die meisten der angenommenen Werte, stimmt jedoch gut mit dem von Fähræus u. Reinhammar (1967) aus der Kohlenhydrat- und Aminosäurenanalyse errechneten Wert (0,705 ml/g) überein. Das in Teil II mit 0,63 angegebene partielle spezifische Volumen wäre dagegen eher für reine Kohlenhydrate oder Glykoproteine mit überwiegendem Kohlenhydratanteil (Gottschalk, 1966) typisch.

Zusammen mit der aus Ultrazentrifugenmessungen ermittelten *Sedimentationskonstanten*  $s_{20,w}^0$  und der *Diffusionskonstanten*  $D_{20,w}^0$  errechnet sich ein *Molekulargewicht* von 390.000.

Es liegt damit im gleichen Bereich wie das — allerdings aus abweichenden Einzelwerten von  $V_{20}$  und  $s_{20,w}^0$  errechnete — Molekulargewicht der Laccase aus Teil II. Die Molekulargewichte der anderen bisher untersuchten Laccasen liegen dagegen entweder um 65.000 (Mosbach, 1963; Fähraeus u. Reinhammar, 1967; Iwasaki et al., 1967) oder um 130.000 (Nakamura, 1958; Omura, 1961).

Das aus Sedimentation und Diffusion ermittelte Molekulargewicht wird durch den im Gleichgewichtssedimentations-Verfahren gefundenen Wert von 383.000 bestätigt.

Aus den angegebenen Daten errechnet sich das *Verhältnis der Reibungskoeffizienten*  $f/f_0$  zu 1,46, was auf eine noch globuläre Struktur des Laccasemoleküls hinweist. Unter der Annahme, daß es sich um ein gestrecktes, unhydratisiertes Molekül handelt, ergibt sich nach Schachmann (1959) ein Achsenverhältnis von etwa 9.

Auch das Verhältnis der Reibungskoeffizienten anderer kupfer- und kohlenhydrathaltiger Oxydasen liegt im Bereich zwischen 1,25 und 1,68 (errechnet aus den entsprechenden Daten für Laccase II und III aus Teil VI; Laccase: Nakamura, 1958; Coeruloplasmin: Starcher u. Hill, 1966; Hibino u. Samejima, 1969; Hämocyanin: Konigs, 1969).

Für die Bestimmung funktioneller Einheiten des Laccasemoleküls ist die Anzahl der Kupferatome pro Enzymmolekül von Bedeutung. Mit über 18 liegt dieser Wert bei der hier untersuchten Laccase I sehr hoch, im Gegensatz zu nur 7 in Teil II (vgl. jedoch die Diskussion der Trockensubstanz- und Proteinbestimmung S. 280) und den von anderen Autoren bei Laccase gefundenen Werten, die zwischen 4 und 6 liegen (Literatur bei Blumberg et al., 1964).

#### e) Elektrophoretische Daten (Tab. 4, Zeile 36 und 37)

Frischgereinigte Laccase I zeigt in der Disc-Elektrophorese bei pH 9,5 nach Anfärbung auf Protein oder Enzymaktivität jeweils eine anodisch wandernde Bande mit  $R_f$ -Werten von 0,10—0,11. In der *Agargel-Elektrophorese* auf Objektträgern wurde nach Anfärben mit denselben Substanzen ebenfalls nur ein anodisch wandernder Fleck gefunden. Die Elektrofokussierung frischer Laccase I im Ampholine-pH-Gradienten ergab einen *isoelektrischen Punkt* des Enzyms bei pH 4,9. Die isoelektrischen Punkte der von Jonsson et al. (1968) untersuchten *Polyporus-Laccase A* lagen zwischen pH 3,1 und 3,3, für die Komponenten der *Laccase B* zwischen pH 4,6 und 6,8. Es fällt auf, daß bei der Laccase I isoelektrischer Punkt und optimale Stabilität der enzymatischen Aktivität beim gleichen pH-Wert liegen.

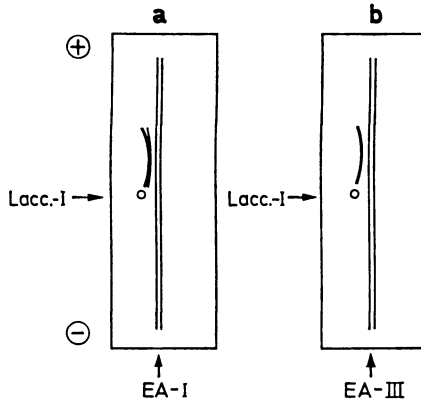


Abb.3. Immunelektrophorese der Laccase I des Wildstammes (schematisch). Frische Wildstamm-Laccase I gegen: a) Enzymantikörper gegen Laccase I, Wildstamm (= EA I); b) Enzymantikörper gegen Laccase III, Mutante z (= EA III). Anode oben, Kathode unten

#### f) Serologie

Zur Bestimmung serologischer Eigenschaften (nicht in Tab.4 aufgeführt) wurden Antiseren aus Kaninchen gegen die hier beschriebene Laccase I des Wildstammes und die Laccasen II und III der Mutante z eingesetzt (ausführliche Darstellung der Methodik und der Eigenschaften der einzelnen Laccasen in Teil VI). Die qualitativen Beziehungen zwischen der Laccase I und den Antienzymen gegen Laccase I, II und III wurden mit Hilfe der Immunelektrophorese ermittelt (Abb.3). Die anodisch wandernde Laccase I reagiert mit ihrem Antiserum durch eine starke und eine schwache Präzipitationsbande, was bei einem reinen, homogenen Enzym nicht zu erwarten wäre. Darauf wird später noch einzugehen sein. Mit Antiserum III wurde eine deutliche Einzelbande gebildet, während mit Antiserum II keine Präzipitationsreaktion zu beobachten war.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Untersuchung der quantitativen serologischen Beziehungen (Methodik Teil III, Einzeldaten Teil VI) durch Ermittlung der KRM-Werte (Kreuzreagierendes Material) eine geringe Reaktion des Enzymantikörpers II mit seinem Alloenzym Laccase I gefunden werden.

Die Ergebnisse der Immunelektrophorese und der KRM-Wert-Bestimmungen lassen auf eine serologisch nahe Verwandtschaft der höhermolekularen Laccase I mit der niedermolekularen Laccase III und auf geringe Verwandtschaft sowohl zwischen Laccase I und der niedermolekularen Laccase II als auch zwischen Laccase II und III schließen.

## g) Weitere Eigenschaften der gereinigten Laccase

*Katalatische Aktivität.* Die teilweise gereinigte Laccase I (Tab. 1, Schritt 6, nach der Molekularsiebsäule) zeigt im polarographischen Test<sup>4</sup> mit  $H_2O_2$  katalatische Aktivität. Durch anschließende Chromatographie an Hydroxylapatit lassen sich katalatische und Laccase-Aktivität nicht trennen und verlassen gemeinsam die Säule. Das gleiche wird auch bei der Reinigung der Tyrosinase der *Podospira* gefunden, wo ebenfalls die beiden genannten Aktivitäten gemeinsam die Hydroxylapatitsäule verlassen und so von der Tyrosinase abgetrennt werden (Herzfeld, persönl. Mitteil.). In der Disc-Elektrophorese liegt die katalatische Aktivität in der auch mit Dopa (= Laccaseaktivität) reagierenden Zone (Katalasenachweis mit 0,5% gekochter Stärke im Gel und Zusatz von  $H_2O_2$  und KJ; nach Brewbaker et al., 1968). Durch Hitzebehandlung (+ 60°C) wird nur die Laccase-, nicht aber die katalatische Aktivität zerstört.

Zwei Erklärungsmöglichkeiten für die Anwesenheit der katalatischen Aktivität in der Laccase I kommen in Betracht: 1. *Verunreinigung* mit dem Hämoprotein Katalase, in freier Form oder als Komplex vorliegend; 2. Gehalt der Laccase an peroxydatisch und katalatisch wirksamem  $Cu^{++}$ . Wenn auch bei der hohen spezifischen Aktivität der Katalase bereits Spuren des Enzyms zum Nachweis seiner katalatischen Aktivität ausreichen, so ist die erste Möglichkeit doch unwahrscheinlich, da in diesem Fall die Katalase durch alle Reinigungsschritte mitgeschleppt worden wäre und sich auch nach den angewandten Reinheitskriterien wie die Laccase verhalten müßte. Außerdem besitzt die reine Laccase I nicht das für Katalase typische Absorptionsmaximum bei 405 nm. Die genannten Gründe, zusammen mit den im folgenden aufgeführten Befunden anderer Autoren, sprechen daher für die zweite Möglichkeit.

Sigel (1969) hat mit verschiedenen Modellsubstanzen, die  $Cu^{++}$  mit freien Koordinationsstellen enthalten, sowohl katalatische als auch peroxydatische Aktivität nachgewiesen. Im speziellen Fall des Kupfer-Glykoproteins Coeruloplasmin fanden Mukasa et al. (1969), daß die peroxydatische Aktivität dem Gehalt des Proteins an Kupfer in der  $Cu^{++}$ -Form parallel lief. Felsenfeld u. Printz (1959) und Ghiretti (1956) stellten an Hämocyanin, einem weiteren Kupfer-Glykoprotein, ebenfalls katalatische Aktivität fest, wobei Ghiretti die Anwesenheit des Hämoproteins Katalase ausschließen und die katalatische Aktivität allein auf das im Hämocyanin vorliegende  $Cu^{++}$  zurückführen konnte. Analog zu unseren Befunden (Hitzeinaktivierung) waren auch dort beide Aktivitäten zwar im gleichen Proteinmolekül lokalisiert, doch reagierten sie unabhängig voneinander auf verschiedene Versuchsbedingungen.

Zwar kann auf Grund der bisher vorliegenden Versuche die Frage der Herkunft der katalatischen Aktivität der gereinigten Laccase noch

---

4 Den Herren Dr. K. Wisser und Dr. F. Herzfeld sei für ihre Unterstützung bei den polarographischen Messungen gedankt.

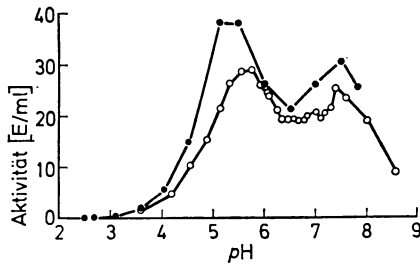


Abb. 4. pH-Optimum der Reaktion frisch gereinigter Laccase I mit DL-Dopa. Die pH-Messungen wurden unmittelbar nach jeder Aktivitätsmessung vorgenommen. Zur Verminderung der Autoxydation des Dopa im alkalischen Bereich wurde dem Puffer 0,1 M EDTA zugegeben und jede pH-Stufe des Puffers erst unmittelbar vor Reaktionsbeginn angesetzt. •—• McIlvaine-Puffer; Laccase in 0,4 M Phosphatpuffer pH 6, undialysiert, SpA = 145. o—o Britton-Robinson-Puffer (II); Laccase, dialysiert gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH 6, SpA = 112

nicht entschieden werden, doch erscheint in Analogie zu den Befunden von Ghiretti (1956), Sigel (1969) und Felsenfeld u. Printz (1959) ein Reaktionsmechanismus wahrscheinlicher zu sein, der allein auf das in der Laccase vorhandene  $\text{Cu}^{++}$  zurückzuführen ist.

*pH-Optimum.* Bei der Betrachtung der Kurve der pH-Abhängigkeit der Reaktion mit Dopa (Abb. 4) fällt auf, daß die Aktivität der gereinigten Laccase I in McIlvaine-Puffer (pH 2,7—7,9) und Britton-Robinson-II-Puffer (pH 3,6—8,6) jeweils 2 Optima bei pH 5,5 und pH 7,5 aufweist. Sie liegen damit innerhalb der allgemein für Phenoloxidasen beobachteten Werte (pH 3,5—8,0). Oberhalb pH 8 fällt die Aktivität steil ab, was auch Cheung u. Marshall (1969) für die 3 Isozyme der Laccase von *Polyporus* gefunden hatten.

Zweipfelige pH-Optima wurden bei Phenoloxidasen nur vereinzelt gefunden (Tyrosinase: Alberghina, 1964; Patil u. Zucker, 1965; Katz u. Mayer, 1969; Laccase: Rösch, 1961; Walch, 1968). Die partikelgebundene Chloroplasten-Tyrosinase (Katz u. Mayer, 1969) verlor allerdings ihr zweites pH-Optimum, wenn sie durch Trypsinbehandlung in löslichen Zustand überführt wurde. Die eine der von Patil u. Zucker (1965) beschriebenen Kartoffel-Tyrosinasen hat ein Doppeloptimum bei pH 5 und pH 7, die andere höhermolekulare, deren Homogenität durch Stärkegelelektrophorese, Hydroxylapatit-Chromatographie und Ultrazentrifugation nachgewiesen wurde, hatte ein Optimum bei pH 5 und eine ausgeprägte Schulter bei pH 7. Die sonstigen katalytischen Eigenschaften der beiden von Patil u. Zucker beschriebenen Enzyme waren fast gleich. Dieser Befund wurde in Richtung einer Monomer-Polymer-Beziehung diskutiert. Da es sich in den zitierten Fällen nur bei den Tyrosinasen um gereinigtes Enzym handelte, kann das bei den Laccasen beschriebene pH-Doppeloptimum auch durch Verunreinigungen verursacht sein.

Im Fall der von uns beschriebenen Laccase I ist das doppelte pH-Optimum entweder als eine ungewöhnliche Eigenschaft eines reinen Enzyms anzusehen oder es handelt sich um einen Enzymkomplex, der

sich durch die angewandten Reinheitskriterien nicht erfassen und auf-trennen läßt. (Dieser Punkt wird im folgenden noch zu diskutieren sein.)

#### h) Einfluß von Außenbedingungen auf die Laccase-Produktion

Der *Podospira*-Wildstamm wird normalerweise bei pH 6—7 ange-zogen und zeigt auf Maismehl-Agar kontinuierliches Wachstum. Wird er jedoch bei pH 5 und darunter kultiviert, so wird die Wuchsform in zunehmendem Maße zoniert und die Wachstumsrate sinkt ab. Der Wild-stamm gleicht dann in seinem Habitus den Mutanten *z* und *un* (Esser, 1969). Diese zunächst auf morphologischem Niveau gefundene Phäno-kopie konnte auch im physiologischen Bereich bestätigt werden: Bei Submerskultur der Mutante *z* in Maismehl-Medium werden bei pH 6—7 hauptsächlich die niedermolekularen Laccasen II und III und nur Spuren der höhermolekularen Laccase I produziert. Der Wildstamm dagegen bildet unter gleichen Bedingungen fast ausschließlich Laccase I und kaum Laccase II und III (Teil VI). Wird der Wildstamm jedoch im Fermenter (300 l) im Bereich zwischen pH 6 bis 4,5 und bei geänderter Belüftung, sonst aber gleichen Bedingungen angezogen, so ergibt sich folgendes Bild: Die Mycelproduktion sinkt auf etwa die Hälfte ab und auch die im Mycel enthaltene Phenoloxydasenaktivität (E/kg Feucht-gewicht) ist erheblich vermindert.

Bei einer Aufarbeitung dieses Materials nach der für die Laccase I beschriebenen Methode zeigen sich weitere Unterschiede: Bei gestiegenem Tyrosinaseanteil (der im Verlauf der Reinigung abgetrennt wird) taucht eine neue Komponente mit Laccaseaktivität in größerer Menge auf. Während in den für die höhermolekulare Laccase I typischen Fraktionen der Molekularsiebsäule nur wenig Aktivität enthalten ist, kommt die Hauptmenge der Aktivität erst in späteren, für ein niedrigeres Mole-kulargewicht typischen Fraktionen von der Säule. Bei einer probeweisen Weiterverarbeitung zeigt dieses Enzym folgende Merkmale:

1. Elution von der *Hydroxylapatitsäule* bereits bei einer Pufferkonzentration weit unter 0,2 M.
2. *SpA* zwischen 40 und 60.
3. Erniedrigte *Michaelis-Menten-Konstante* für Dopa ( $K_m \text{ Dopa} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ).
4. Erhöhte Halbwertszeit der *Hitzeinaktivierung* bei 60°C (ca. 100 min).
5. Auftreten einer kathodisch wandernden Komponente mit Laccase-aktivität neben einer anodisch wandernden (wie Laccase I) in der *Agargel-Elektrophorese*.
6. In der *Immunelektrophorese gegen Antiserum I* eine kathodisch wandernde Doppelbande neben der für Laccase I typischen, anodisch wandernden Doppelbande.

7. In der *Immunelektrophorese gegen Antiserum II* eine Präzipitationsbande im kathodischen Bereich, in dem mit Laccase I keine Reaktion beobachtet wird.

Alle diese Befunde deuten auf die Anwesenheit einer Laccase hin, die in ihren Eigenschaften von der Laccase I abweicht und in manchen Punkten der Laccase II der Mutante *z* gleicht (Teil VI). Sie wird daher im folgenden als Laccase „II“ bezeichnet. Die unter Punkt 2 und 3 berichteten Werte liegen zwischen denen der Laccase I und der Laccase II und können, wie auch die unter Punkt 5 und 6 berichteten Eigenschaften, auf gleichzeitige Anwesenheit von Laccase I schließen lassen, die dann allerdings an der Molekularsiebsäule nicht völlig abgetrennt worden wäre. Die Laccase „II“ hat weiterhin, wie auch die Laccase I, ein doppelgipfeliges pH-Optimum, das jedoch geringfügig zur alkalischen Seite verschoben ist. Es ist bemerkenswert, daß die beiden Gipfel der Laccase „II“ bei pH 7,4 bzw. pH 6,0 den pH-Optima entsprechen, die für reine Laccase II bzw. Laccase III gefunden wurden.

Das durch geänderte Anzuchtbedingungen hervorgerufene Auftreten der Laccase „II“ bei gleichzeitiger Abnahme der Laccase I wirft die Frage nach dem Mechanismus dieser Veränderung auf.

Einmal kann diese Erscheinung durch die Induktion einer weiteren Laccase bedingt sein. Verschiedentlich wurde bereits festgestellt, daß die Laccaseproduktion von Anzuchtbedingungen abhängig ist. Mosbach (1963) hatte im Kulturfiltrat des Pilzes *Polyporus* zwei Laccase-Isozyme nachgewiesen. Cheung u. Marshall (1969) verwendeten ein neues Nährmedium und stellten daraufhin das Auftreten eines weiteren Isozyms fest. Gleichzeitig verfolgten sie auch die Ausscheidung der drei Isozyme ins Nährmedium und beobachteten, daß die Maximalproduktion zu verschiedenen Zeiten erreicht wurde. Das Auftreten des dritten Isozyms kann daher auch dadurch erklärt werden, daß die Änderung der Anzuchtbedingungen zu einer zeitlichen Verschiebung der Synthese der Isozyme führte, so daß jetzt — im Gegensatz zu früheren Untersuchungen — zum Erntezeitpunkt alle drei Laccasen in nachweisbarer Menge vorlagen. Diese Erklärung wäre auch für das hier beschriebene Auftreten der Laccase „II“ denkbar.

Da die neue aufgetretene Komponente offenbar ein geringeres Molekulargewicht als die Laccase I besitzt, könnte sie aber auch als Baustein bzw. als Spaltprodukt einer polymeren Laccase I anzusehen sein. Diese und die oben besprochenen Möglichkeiten brauchen sich dabei nicht auszuschließen.

#### i) Polymere Struktur der Laccase

Im Verlaufe der Reinigung sowie bei einigen gezielten Versuchen wurden folgende Hinweise auf eine polymere Struktur der gereinigten Laccase gewonnen:

Laccase mit höherem Molekulargewicht als 390.000

1. Bei der Aufarbeitung des Mycels kann mit der Molekularsiebsäule im Vorlauf ein *höhermolekularer Aktivitätsgipfel* von der Hauptmenge der

Laccase I abgetrennt und weiter gereinigt werden. Aus Ultrazentrifugmessungen ergibt sich ein wesentlich höherer Sedimentationskoeffizient (ca. 34 Svedberg-Einheiten). Wurde dieser Wert in die von Scheraga u. Mandelkern (1953) angegebene Formel zur Ermittlung von Molekulargewichtsverhältnissen aus den Sedimentationskoeffizienten eingesetzt ((in abgewandelter Form:  $[(s_{20,w})_A/(s_{20,w})_D]^{1/3} = M_A/M_D$ )), so ergibt sich ein Verhältnis gegenüber Laccase I von annähernd 5:1. In der Disc- und Immunelektrophorese (anodische Wanderung) hat das Material einen niedrigeren  $R_f$ -Wert als Laccase I und reagiert mit Antiserum I. Weiterhin zeichnet es sich durch eine höhere SpA und höhere Hitze-stabilität aus. Diese Befunde lassen vermuten, daß es sich um ein Aggregationsprodukt der Laccase I handelt.

2. Gereinigte Laccase I scheint auch *in vitro* zu einem höhermolekularen Produkt *aggregieren* zu können: a) Die Sedimentationskonstante der Laccase I steigt nämlich mit zunehmender Proteinkonzentration an, wenn die Sedimentationsläufe in 0,4 M Phosphatpuffer statt in dem normalerweise verwendeten 0,1 M Puffer durchgeführt werden. b) Wird Laccase I in höherer Konzentration inkubiert, so tritt bei anschließender Disc-Elektrophorese eine zusätzliche aktive Bande mit niedrigerem  $R_f$ -Wert auf. Parallel dazu erscheint in Sedimentationsläufen (0,1 M Phosphatpuffer, pH 6) ein zusätzlicher, schneller sedimentierender Gipfel (ca. 20 Svedberg-Einheiten), der nach der oben angeführten Berechnung auf ein doppelt so hohes Molekulargewicht wie das des Ausgangsmaterials, der Laccase I, schließen läßt.

#### Laccase mit niedrigerem Molekulargewicht als 390.000

Außer den beiden Aggregationsformen mit höherem Molekulargewicht scheinen aber auch kleinere Einheiten einer aktiven Laccase vorzuliegen.

1. *Unter Normalbedingungen* werden bei der Reinigung der Laccase I Spuren niedermolekularer Laccasen beobachtet, die den Mutanten-Laccasen II und III gleichen (Teil VI).

2. *Bei geänderten Anzuchtbedingungen* (pH < 5) lassen sich, wie bereits unter Punkt h) berichtet, bei stark vermindertem Gehalt an Laccase I erhebliche Mengen an niedermolekularer Laccase gewinnen, die der Laccase II und teilweise auch der Laccase III der Mutanten gleichen.

3. *Wird normal angezogenes Mycel längere Zeit bei -18°C gelagert*, so wird bei anschließender Reinigung neben Laccase I in größeren Mengen eine Laccase gefunden, die folgende Eigenschaften aufweist: Eine um den Faktor 3—4 niedrigere SpA, eine geringere Hitzestabilität, Auftreten schneller wandernder Banden in der Disc-Elektrophorese und eine langsamer sedimentierende Komponente in Sedimentationsläufen. Aus der Sedimentationskonstanten (ca. 5,5 Svedberg-Einheiten) ergibt sich nach der bereits erwähnten Formel ein um den Faktor 4—5 niedrigeres

Molekulargewicht. Offenbar können bei der Lagerung des Mycels Vorgänge ablaufen, die zu dem Auftreten niedermolekularer Laccaseeinheiten führen.

4. Folgende Befunde lassen eine *Dissoziation der gereinigten Laccase I* annehmen: Wird frischgereinigte, homogene Laccase I *längere Zeit* bei  $+4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, so fällt die Aktivität und damit auch die SpA ab. Bei Raumtemperatur erfolgt der Aktivitätsbefall entsprechend schneller. Parallel dazu treten in der Disc-Elektrophorese schneller wandernde, enzymatisch aktive Banden auf und in Sedimentationsläufen zeigt sich eine zusätzliche, langsamer sedimentierende Komponente (ca. 5,5 Svedberg-Einheiten). Nach der Scheraga-Formel beträgt ihr Molekulargewicht etwa  $\frac{1}{4}$  der Laccase I. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Laccase I hat den gleichen Effekt. Es kommt unter diesen Bedingungen anscheinend zu einer Dissoziation der Laccase I in aktive Untereinheiten.

5. Unter den bisher geschilderten Bedingungen erfolgt eine Dissoziation der Laccase I in 4 oder 5 Untereinheiten. Wird die Laccase dagegen mit *Natriumdodecylsulfat* ( $25 \cdot 10^{-3}$  M) inkubiert, so liegt die Sedimentationskonstante der Zerfallsprodukte bei 3 Svedberg-Einheiten. Das daraus errechnete Molekulargewicht würde nur  $\frac{1}{8}$  bis  $\frac{1}{10}$  der Laccase I betragen und mit etwa 40.000 nur halb so groß sein wie das der mit anderen Verfahren gewonnenen Untereinheiten. Es liegt damit im Bereich der bei vielen Enzymen gefundenen kleinsten aktiven Untereinheiten.

#### j) Diskussionsbemerkungen zur Struktur der Laccase I

Auf Grund des Assoziations- und Dissoziationsverhaltens der Laccase I lassen sich jetzt auch folgende experimentelle Befunde im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Autoren erklären:

1. Die bei der *Immunelektrophorese* der Laccase I gegen Antiserum I beobachteten doppelten Präzipitationslinien können wie bei der Lactatdehydrogenase (Avrameas u. Rajewsky, 1964) im Sinne einer Monomer-Polymerbeziehung aufgefaßt werden.

2. Wurden die *Gleichgewichtssedimentationsläufe* mit Laccase I bei  $20^{\circ}\text{C}$  über längere Zeit durchgeführt, so nimmt das als Gewichtsmittel  $\bar{M}_w$  errechnete Molekulargewicht kontinuierlich mit der Zentrifugationsdauer ab. Diese Abnahme ist um so stärker, je geringer die eingesetzte Proteinkonzentration ist. Dies deutet ebenfalls auf Dissoziation hin.

3. Das *partielle spezifische Volumen* nimmt bei  $+25^{\circ}\text{C}$  langsam, kontinuierlich ab. Das gleiche konnte Konings (1969) bei Hämocyanin unter Bedingungen beobachten, die zur Dissoziation des Moleküls führten.

4. Die Tatsache, daß die *hochgereinigte Laccase I* bei der Elution von den verschiedenen Säulen *kein Plateau der SpA* mehr aufweist (s. S. 272),

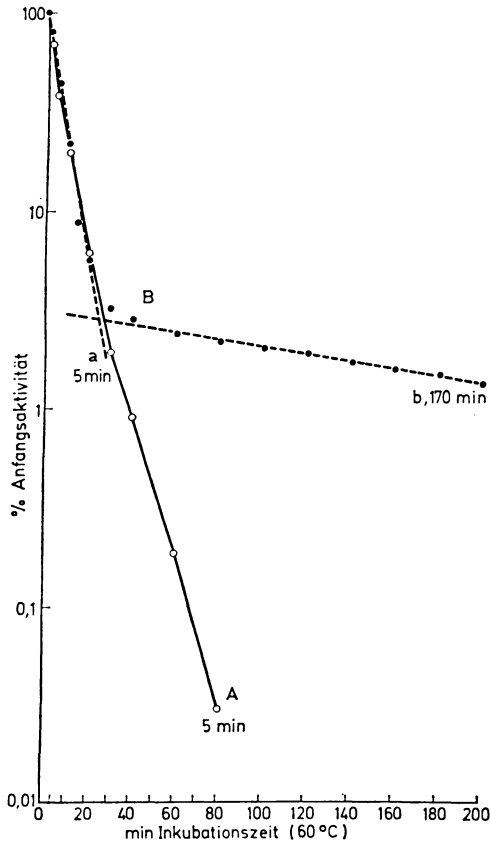


Abb. 5. Hitzeinaktivierung der Laccase I. Inkubation der Laccase bei  $+60^{\circ}\text{C}$ . Nach den angegebenen Zeiten Probenentnahme für den normalen Aktivitätstest mit Dopa.  $\circ$ — $\circ$  Gerade A: frische Laccase, 0,5 M Phosphatpuffer pH 6, undialysiert, SpA = 117.  $\bullet$ — $\bullet$  Kurve B, Schenkel a und b: gealterte Laccase, 0,4 M Phosphatpuffer pH 6, undialysiert, 8 Tage Inkubation bei  $+4^{\circ}\text{C}$ , SpA = 82

läßt sich ebenfalls als ständige Dissoziation in Untereinheiten geringerer SpA erklären. In diesem Sinne wären auch die Ergebnisse der Stabilitätsversuche zu deuten.

5. Auf Grund einer polymeren Struktur der Laccase I und der leichten Dissoziierbarkeit des gealterten Enzyms wird auch der abweichende Verlauf der *Hitzeinaktivierung gealterter Laccase I* verständlich. Die graphische Darstellung (Abb. 5) zeigt eine zweischenkelige Kurve B mit einem zunächst schnellen Aktivitätsbefall (Schenkel a, Halbwertszeit 5 min), gefolgt von einem wesentlich langsameren Abfall der Aktivität (Schenkel b, Halbwertszeit 170 min).

Dies könnte einmal durch die gleichzeitige Anwesenheit zweier verschiedener Enzyme mit verschiedener Hitzestabilität bedingt sein, wie es von Horowitz u. Fling (1956) für die Tyrosinase von *Neurospora* gefunden wurde.

In dem dort untersuchten Heterokaryon, dessen Kernkomponenten die Allele Ts bzw. Tl für verschiedene Hitzestabilität die Tyrosinase tragen, wirken beide Allele unabhängig voneinander und führen nicht zur Produktion einer Enzymhybride mit intermediären Eigenschaften, sondern zur gleichzeitigen Bildung beider Enzyme.

Unsere Versuchsergebnisse dagegen lassen die Deutung zu, daß die gealterte, polymere, hitzelabile Laccase I (Abb. 5, Hitzeinaktivierung und Spaltung nach Kurve B, Schenkel a) in Untereinheiten größerer Hitzestabilität zerfällt. Diese werden dann entsprechend einer Reaktion I. Ordnung inaktiviert (Kurve B, Schenkel b). Dieser Befund und die Tatsache, daß die hitzebedingte Dissoziation und Inaktivierung der eingesetzten Proteinkonzentration umgekehrt proportional sind, decken sich mit den Ergebnissen von Jolley et al. (1969) bei der *Agaricus*-Tyrosinase.

*Alle diese Beobachtungen sind durch eine Dissoziation der Laccase I in Untereinheiten geringerer SpA in Abhängigkeit von Proteinkonzentration, Zeit und Temperatur erklärbar.*

6. Ob bei der Alterung und Dissoziation der Laccase I sich auch die Konformation des Enzymmoleküls ändert, kann auf Grund der vorliegenden Befunde nicht eindeutig festgestellt werden. In diese Richtung deutet jedoch die Veränderung der Absorption im ultravioletten Spektralbereich, die Abnahme des partiellen spezifischen Volumens und die veränderte Hemmkinetik dissozierender Laccase (kompetitiver Hemmungstyp mit Dopa und Natriumazid;  $K_i$  ca.  $1 \cdot 10^{-5}$  M; praktisch unveränderte Michaelis-Konstante für Dopa).

7. Für die Berechnung der Molekulargewichtsverhältnisse wurde die von Scheraga u. Mandelkern (1953) angegebene Gleichung benutzt. Sie gilt strenggenommen nur bei globulären, unhydratisierten Molekülen geringer Asymmetrie. Andernfalls sind die errechneten Molekulargewichte zu hoch. Die Laccase I entspricht auf Grund ihrer hydrodynamischen Daten nicht völlig diesen Voraussetzungen, so daß das nach obiger Gleichung berechnete Molekulargewicht der Untereinheiten zu hoch sein könnte. Nach entsprechender Korrektur der Molekulargewichte wäre demnach eine Dissoziation nicht in 4, sondern in 5 Untereinheiten im Bereich des Möglichen.

Bisher wurden allerdings nur wenige Enzymmoleküle gefunden, die aus einer ungeraden Anzahl von Untereinheiten aufgebaut sind (Literatur s. Anonymus, 1968). Das Vorkommen von 5 Untereinheiten wurde für Cytochrom a (Takemori et al., 1961), Arginindecarboxylase (Boeker u. Snell, 1968) und Hämocyanin (Literatur bei Konings, 1969) berichtet. In allen drei Fällen können diese Untereinheiten

nochmals halbiert werden (bei Cytochrom a z. B. durch Natriumdodecylsulfat), was mit unserem Befund an der Laccase übereinstimmen würde.

Es war bereits festgestellt worden, daß der ermittelte Wert von mehr als 18 Kupferatomen pro Enzymmolekül (390.000 Molekulargewicht) außerordentlich hoch liegt. Bei einem Zerfall in 5 Untereinheiten würden jedoch nur etwa 4 Kupferatome auf eine Untereinheit kommen, ein Wert, der auch von Nakamura (1958) und Mosbach (1963) für Laccase gefunden wurde. Die neueren Arbeiten der letztgenannten Gruppe über Art und Funktion der 4 Kupferatome der *Polyporus*-Laccase (Fee et al., 1969) lassen bereits eine Interpretation von Funktion und Zusammenwirken im Enzymmolekül zu.

Das Ergebnis vorläufiger elektronenmikroskopischer Untersuchungen deutet allerdings auf eine *tetramere* Struktur der Laccase I hin, die in Dimere und Monomere zerfallen kann (Molitoris, unveröffentlicht).

In Analogie zu den Befunden von Cheung u. Marshall (1969) läßt sich, besonders auf Grund der serologischen Daten, auch bei den Laccasen der *Podospora* eine Monomer-Polymer-Beziehung zwischen nicht identischen Untereinheiten diskutieren. Auch das doppelte pH-Optimum kann in diese Richtung deuten. Zur Klärung dieser Frage bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

*Zusammenfassend* kann gesagt werden, daß die *Laccase des Wildstammes* von *Podospora anserina* in *verschiedenen Aggregationszuständen* vorkommt, die *zumindest teilweise ineinander umwandelbar* sind. Inwieweit es sich dabei um die wahren Verhältnisse in der Zelle und nicht um Artefakte bei der Reinigung handelt, muß vorerst dahingestellt bleiben. Ein weiterer Punkt ist, ob die bei der Dissoziation der Laccase I entstandenen Untereinheiten Bausteine der Laccase sind, die auch als selbständige Einheiten auftreten und enzymatisch aktiv sind. Daraus ergibt sich dann die Frage, ob diese Untereinheiten mit den vor allem in den Mutanten gefundenen niedermolekularen Laccasen verwandt oder identisch sind.

Ein früherer Mitarbeiter unserer Gruppe, Herr Dr. W. Krause, war besonders an der Entwicklung des neuen Reinigungsverfahrens beteiligt. Ihm und auch Herrn W. Minuth, der durch kritische Diskussionen zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat, gebührt unser Dank. Den technischen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Fr. H. Goldschmidt, danken wir für tatkräftige und sorgfältige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

### Literatur

Die Phenoloxidasen des Ascomyceten *Podospora anserina*.

- I. Identifizierung von Laccase und Tyrosinase beim Wildstamm. Arch. Mikrobiol. **46**, 217—226 (1963). (K. Esser.)
- II. Reinigung und Eigenschaften der Laccase. Arch. Mikrobiol. **48**, 306—318 (1964). (K. Esser, S. Dick u. W. Gielen.)
- III. Quantitative und qualitative Enzymunterschiede nach Mutation an nicht gekoppelten Loci. Z. Vererbungsl. **97**, 327—344 (1966). (K. Esser.)
- IV. Reinigung und Eigenschaften der Tyrosinase. Arch. Mikrobiol. **65**, 146—162 (1969). (F. Herzfeld u. K. Esser.)

- VI. Genetic regulation of the formation of laccase. Genetics (in press). (K. Esser u. W. Minuth.)
- Ackermann, W. W., Potter, V. R.: Enzyme inhibition in relation to chemotherapy. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **72**, 1—9 (1949).
- Alberghina, F. A. M.: Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices: Partial purification and properties. Phytochem. **3**, 65—72 (1964).
- Anonymus (Molecular Biology Correspondent): Odd proteins. Nature (Lond.) **218**, 811—812 (1968).
- Avrameas, S., Rajewsky, K.: Immunological characteristics of some lactic dehydrogenases. Nature (Lond.) **201**, 405—407 (1964).
- Blix, G.: The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. Acta chem. scand. **2**, 467—473 (1948).
- Blumberg, W. E., Levine, W. G., Margolis, S., Peisach, J.: On the nature of copper in two proteins obtained from *Rhus vernicifera latex*. Biochem. biophys. Res. Commun. **15**, 277—283 (1964).
- Böhm, P., Dauber, S., Baumeister, L.: Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum. Klin. Wschr. **32**, 289—292 (1954).
- Boeker, E. A., Snell, E. E.: Arginine decarboxylase from *Escherichia coli*. II. Dissociation and reassociation of subunits. J. biol. Chem. **243**, 1678—1684 (1968).
- Brewbaker, J. L., Upadhyya, M. D., Mäkinen, Y., MacDonald, R.: Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications. Physiol. Plantarum **21**, 930—940 (1968).
- Cheung, D. S. M., Marshall, K. C.: Antigenic and some kinetic properties of three p-diphenol oxidase isoenzymes of *Trametes versicolor*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **178**, 177—180 (1969).
- Crumpton, M. J.: Identification of amino sugars. Biochem. J. **72**, 479—486 (1959).
- Dixon, M., Webb, E. C. (Hrsg.): Enzymes. New York: Academic Press 1964.
- Elias, H. G.: Ultrazentrifugen-Methoden. Beckman Instruments, München 1961, 2. rev. Aufl.
- Esser, K.: Die Inkompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm.  
I. Die genetische Analyse der Semi-Inkompatibilität. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-L. **87**, 595—624 (1956a).  
— Gen-Mutanten von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm mit männlichem Verhalten. Naturwissenschaften **43**, 284 (1956b).  
— Die Inkompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm.  
II. Die Wirkungsweise der Semi-Inkompatibilitäts-Gene. Z. VererbungsL. **90**, 29—52 (1959).  
— Die Wirkungsweise von Antiseren auf die Phenoloxidasen von *Podospora anserina*. Naturwissenschaften **50**, 576—577 (1963).  
— The influence of pH on rhythmic mycelial growth in *Podospora anserina*. Mycologia (N. Y.) **61**, 1008—1011 (1969).
- Fähræus, G., Reinhammar, B.: Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. Acta chem. scand. **21**, 2367—2378 (1967).
- Fee, J. A., Malkin, R., Malmström, B. G., Vänngård, T.: Anaerobic oxidation-reduction titrations of fungal laccase. Evidence for several high potential electron accepting sites. J. biol. Chem. **244**, 4200—4207 (1969).
- Felsenfeld, G., Printz, M. P.: Specific reactions of hydrogen peroxide with the active site of hemocyanin. The formation of "methemocyanin". J. Amer. chem. Soc. **81**, 6259—6264 (1959).

- Fischer, F. G., Dörfel, H.: Die papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Uronsäuren. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **301**, 224—234 (1955).
- Fling, M., Horowitz, N. H., Heinemann, S. F.: The isolation and properties of crystalline tyrosinase from *Neurospora*. J. biol. Chem. **238**, 2045—2053 (1963).
- Ghiretti, F.: The decomposition of hydrogen peroxide by hemocyanin and by its dissociation products. Arch. Biochem. **63**, 165—176 (1956).
- Gottschalk, A.: Glycoproteins. Their composition, structure and function. Amsterdam-London-New York: Elsevier 1966.
- Hibino, Y., Samejima, T.: On the conformation of porcine ceruloplasmin. Arch. Biochem. **130**, 617—623 (1969).
- Hörmann, H., Gollwitzer, R.: Bestimmung von Hexosen in Tryptophan-haltigen Eiweißkörpern. Die Kohlenhydratkomponente des Eialbumins. Justus Liebigs Ann. Chem. **655**, 178—188 (1962).
- Horowitz, N. H., Fling, M.: Studies of tyrosinase production by a heterocaryon of *Neurospora*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **42**, 498—501 (1956).
- Iwasaki, H., Matsubara, T., Mori, T.: A fungal laccase, its properties and reconstitution from its protein and copper. J. Biochem. (Tokyo) **61**, 814—816 (1967).
- Jamieson, G. A.: Studies on glycoproteins. I. The carbohydrate portion of human ceruloplasmin. J. biol. Chem. **240**, 2019—2027 (1965).
- Jolley, R. L., Jr., Robb, D. A., Mason, H. S.: The multiple forms of mushroom tyrosinase. Association-dissociation phenomena. J. biol. Chem. **244**, 1593—1599 (1969).
- Jonsson, M., Petterson, E., Reinhammar, B.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. VII. The isoelectric spectra of fungal laccase A and B. Acta chem. scand. **22**, 2135—2140 (1968).
- Katz, Y., Mayer, A. M.: Changes in properties of catechol oxidase from chloroplasts following liberation from membranes. Israel J. Bot. **18**, 11—19 (1969).
- Konings, W. N.: Structure and function of hemocyanin. Diss., Univ. Groningen 1969.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. **193**, 265—275 (1951).
- Macrae, A. R., Duggleby, R. G.: Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. Phytochem. **7**, 855—861 (1968).
- Malkin, R., Malmström, B. G., Vänngård, T.: The requirement of the "non-blue" copper (II) for the activity of fungal laccase. FEBS Letters **1**, 50—54 (1968).
- Malmström, B. G., Agro, A. F., Antonini, E.: The mechanism of laccase-catalyzed oxidations: Kinetic evidence for the involvement of several electron-accepting sites in the enzyme. Europ. J. Biochem. **9**, 383—391 (1969).
- Reinhammar, B., Vänngård, T.: Two forms of copper (II) in fungal laccase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **156**, 67—76 (1968).
- Mosbach, R.: Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **73**, 204—212 (1963).
- Mukasa, H., Nosoh, Y., Sato, T.: Changes of the copper states of porcine ceruloplasmin by urea denaturation. J. Biochem. **65**, 649—650 (1969).
- Nakamura, T.: Purification and physico-chemical properties of laccase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **30**, 44—52 (1958).
- Omura, T. J.: Studies on laccases of lacquer trees. III. Reconstruction of laccase from its protein and copper. J. Biochem. (Tokyo) **50**, 389—393 (1961).
- Partridge, S. M., Westall, R. G.: Filter-paper partition chromatography of sugars. Biochem. J. **42**, 238—248 (1948).
- Patil, S. S., Zucker, M.: Potato phenolases. Purification and properties. J. biol. Chem. **240**, 3938—3943 (1965).

- Peisach, J., Levine, W. G.: A comparison of the enzymic activities of pig ceruloplasmin and *Rhus vernicifera* laccase. J. biol. Chem. **240**, 2284—2289 (1965).
- — Blumberg, W. E.: Structural properties of stellacyanin, a copper mucoprotein from *Rhus vernicifera*, the Japanese lac tree. J. biol. Chem. **242**, 2847—2858 (1967).
- Pomerantz, S. H.: Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. J. biol. Chem. **238**, 2351—2357 (1963).
- Rauen, H. M. (Hrsg.): Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer 1964.
- Rösch, R.: Untersuchungen über den Ligninabbau und über die Oxydasen von Braun- und Weißfäulepilzen. Arch. Mikrobiol. **38**, 73—106 (1961).
- Schachmann, H. K.: Ultracentrifugation in biochemistry. New York-London: Academic Press 1959.
- Scheraga, H. A., Mandelkern, L.: Consideration of the hydrodynamic properties of proteins. J. Amer. chem. Soc. **75**, 179—184 (1953).
- Sigel, H.: Zur katalytischen und peroxidatischen Aktivität von Cu<sup>2+</sup>-Komplexen. Angew. Chem. **81**, 161—171 (1969).
- Stabinger, H., Leopold, H., Kratky, O.: Eine neue Methode zur Präzisionsmessung der Dichte von Flüssigkeiten. Mh. Chem. **98**, 436—438 (1967).
- Stahl, E. (Hrsg.): Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- Starcher, B., Hill, C. H.: Isolation and characterization of induced ceruloplasmin from chicken serum. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **127**, 400—406 (1966).
- Stark, G. R., Dawson, C. R.: On the accessibility of sulfhydryl groups in ascorbic acid oxidase. J. biol. Chem. **237**, 712—716 (1962).
- Suzuki, Y.: Studies on a polyphenolase in *Scopolia japonica*. V. Inhibition by sulfhydryl compounds. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., Ser. 4 Biol. **25**, 119—123 (1959).
- Svennerholm, E., Svennerholm, L.: Quantitative paper partition chromatography of sialic acids. Nature (Lond.) **181**, 1154—1155 (1958).
- Svensson, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentration at a steady state and its solution for simple cases. Acta chem. scand. **15**, 325—341 (1961).
- Takemori, S., Sekuzu, I., Okunuki, K.: Studies on cytochrome a. VII. Physicochemical properties of purified cytochrome a. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **51**, 464—472 (1961).
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P., Harrison, T. S.: Detection of sugars on paper chromatograms. Nature (Lond.) **166**, 444—445 (1950).
- Walch, H.: Bildung und Nachweis von Phenoloxidasen bei einigen *Ganoderma*-Arten (Lackporlinge). Arch. Mikrobiol. **60**, 314—325 (1968).
- Walker, J. R. L.: Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*. Phytochem. **8**, 561—566 (1969).
- Warburg, O., Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. **810**, 384—421 (1941).
- Wisser, K.: Eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der Catecholase- und Cresolase-Aktivität von Tyrosinase. Z. analyt. Chem. **243**, 639 (1968).
- Yphantis, D. A.: Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. Biochemistry **3**, 297—317 (1964).

Prof. Dr. K. Esser  
 Dr. H. Peter Molitoris  
 Inst. f. Allgem. Botanik  
 d. Ruhr-Univ. Bochum  
 D-4630 Bochum-Querenburg, Postfach 2148