

MOLITORIS · LACCASEN VON PODOSPORA ANSERINA

UBR069029816847



BIBLIOTHECA MYCOLOGICA

Herausgegeben von

J. CRAMER

BAND 52

Die Laccasen des Ascomyceten *Podospira anserina*

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS VON STRUKTUR
UND FUNKTION
EINES SYSTEMS MULTIPLER ENZYME

von

H. PETER MOLITORIS

Mit 26 Abbildungen und 9 Tabellen



1976 · J. CRAMER

In der A.R. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft

FL-9490 VADUZ

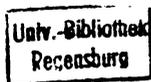
6 7 7 / 8 0 8

23/W/938447

Habilitationsschrift

zur

Erlangung der *venia legendi* an der
Abteilung für Biologie der
Ruhr-Universität Bochum



938447

Anschrift des Verfassers:

Dr. H. Peter Molitoris
Wissenschaftlicher Rat und Professor
Abteilung Pilzphysiologie
Institut für Botanik
Fachbereich Biologie der Universität
8400 Regensburg, Postfach

© 1976 A.R. Gantner Verlag KG., FL-9490 Vaduz
Printed in Germany
by Strauss & Cramer GmbH, 6945 Hirschberg II
ISBN 3-7682-1081-2

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>Einführung</u>	2
I. Untersuchungen an Laccasen	2
II. Kupferhaltige Proteine	3
III. Art und Funktion des Kupfers in Laccasen	5
IV. Substratspezifität der Laccasen	8
V. Heterogenität der Laccasen	10
VI. Biosynthese und Funktion von Glykoproteinen	10
VII. Vorkommen und biologische Funktion der Laccasen	12
B. <u>Problemstellung</u>	14
C. <u>Material und Methoden</u>	15
D. <u>Ergebnisse</u>	17
I. Das Laccasespektrum des Ascomyceten <u>Podospora</u>	17
II. Chemische und biophysikalische Analyse der Laccase I	19
III. Analyse des Kupfers der Laccase I	24
IV. Biochemische Analyse der Laccase I	26
V. Analyse der Quartärstruktur der Laccase I	28
1) Dissoziation und Aggregation	28
2) Elektronenmikroskopie	41
VI. Vergleichende Analyse der Laccasen I, II und III	50
VII. In vivo-Versuche	63
E. <u>Diskussion</u>	67
I. Struktur der Laccasen I, II und III	67
II. Funktion der Laccase	70
F. <u>Zusammenfassung</u>	72
G. <u>Literatur</u>	75

A. Einführung.

I. Untersuchungen an Laccasen

Obwohl die Phenoloxidasen mit ihren typischen Vertretern Laccase und Tyrosinase seit beinahe einem Jahrhundert biochemisch untersucht werden, ist die Funktion dieses weitverbreiteten Enzymsystems noch weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis von Struktur und Funktion der Laccasen leisten, die beim Ascomyceten Podospora anserina als ein System multipler Enzyme auftreten.

Laccase (p-Diphenol:O₂ Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) und Tyrosinase (o-Diphenol:O₂ Oxidoreduktase, EC 1.10.3.1) sind im Tier- und Pflanzenreich weitverbreitete Enzyme, die Phenole, insbesondere Diphenole und Arylamine, über gefärbte Zwischenprodukte mit Hilfe des Luftsauerstoffs unter Entstehung von Wasser zu oxydieren vermögen. Die von ihnen katalysierte Reaktion, ihre Verbreitung und ihre vorerst noch hypothetische biologische Funktion wurden bereits in einer Reihe zusammenfassender Arbeiten behandelt (BONNER, 1957; FRANKE, 1960; KÄÄRIK, 1965; HAIDER, 1966; ROSCH, 1965; PEISACH et al., 1966; FREUDENBERG and NELSH, 1963; MALMSTROM and RYDEN, 1968; SCHUBERT, 1968; HAMILTON, 1969; HIGUCHI, 1971; MALKIN and MALMSTROM, 1970; SARKANEN and LUDWIG, 1971).

Es dürfte weithin unbekannt sein, daß der Begriff der "Oxydasen", der für das Verständnis des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels so wichtig werden sollte, von BERTRAND 1896 im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen an Phenoloxidasen geprägt wurde. Die ersten eingehenden Arbeiten über Laccasen gehen jedoch bereits auf YOSHIDA (1833) zurück. Bei Untersuchungen des Milchsaftes (Latex) des japanischen Lackbaumes Rhus vernicifera (Anacardiaceae) beobachtete er, daß dieser Milchsaft an der Luft zu einem dunklen, durchsichtigen Lack erhärtet und daß dieser Vorgang durch ein hitzeunbeständiges Agens ("diastatic

matter") unter Beteiligung des Luftsauerstoffs katalysiert wird. Dieses Agens hat BERTRAND (1894) nach seinem Vorkommen im Milchsaft des Lackbaumes "Laccase" genannt. Auf Grund des gefundenen Mangangehaltes postulierte er auch bereits den Metallenzymcharakter dieses Proteins. Erst durch die Untersuchungen TISSIERES (1948) konnte jedoch schlüssig nachgewiesen werden, daß Kupfer und nicht Mangan in der Laccase enthalten sind und für ihre katalytische Funktion essentiell sind.

Im Zusammenhang mit dem in der vorliegenden Arbeit behandelten Problemkreis interessieren bei der Laccase, die ein kupferhaltiges Glykoprotein darstellt, insbesondere folgende Punkte, auf die daher hier näher eingegangen werden soll:

- 1) Der Metallenzymcharakter der Laccase und sich daraus ergebende Fragen des Reaktionsmechanismus.
- 2) Der Glykoproteincharakter der Laccase und sich daraus ergebende Fragen der Biosynthese, Struktur und Funktion.
- 3) Die biologische Funktion der Laccase.
- 4) Die Struktur dieses Enzymsystems, die mit obengenannten Punkten im Zusammenhang steht und vor allem im experimentellen Teil abgehandelt werden wird.

Es soll zunächst auf Punkt 1 eingegangen werden.

II. Kupferhaltige Proteine

Kupfer gehört zu den "Übergangsmetallen", deren d- und f-Schalen nur teilweise mit Elektronen besetzt sind und die daher zum Valenzwechsel befähigt sind; im Falle des Kupfers also Cu^+ , Cu^{++} und Cu^{+++} . Aus dieser Fähigkeit erklärt sich bereits ein Großteil der Funktionen dieser Metallenzyme, deren wichtigste Vertreter mit einigen kennzeichnenden Eigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Alle diese Enzyme enthalten gebundenes Kupfer. Als Beispiele für ihre verschiedenen Funktionen seien hier genannt:

- 1) Elektronentransport (z.B. Plastocyanin)
- 2) Sauerstofftransport (z.B. Hämocyanin)
- 3) Transport oder Speicherung des Metalles selbst (z.B. Erythrocyuprein)

Die Laccasen, Gegenstand dieser Untersuchung, gehören zu den sogenannten "blauen Oxidasen", die (mit Ausnahme der Laccase von Agaricus) auf Grund der besonderen Bindungsart des "blauen" Kupfers vom Typ 1 um 600 nm stark absorbieren (Nomenklatur des Kupfers in dieser Arbeit nach MALKIN und MALMSTRÖM, 1970). Die wichtigsten "blauen Oxidasen" vom Laccasetyp sind mit ihren Haupteigenschaften in Tabelle 2 aufgeführt.

III. Art und Funktion des Kupfers in der Laccase.

Bei der durch Laccasen katalysierten Reduktion des molekularen Luftsauerstoffs zu Wasser ist die Kenntnis der Einzelschritte dieses 4-Elektronentransfers, insbesondere die Koppelung der Substratoxidation (1-Elektronentransfer) mit der Sauerstoffreduktion (4-Elektronentransfer) eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Gesamtreaktion. Wie Tabelle 2 zeigt, scheinen alle "blauen Oxidasen" ein Minimum von 4 Cu-Atomen/aktive Enzymeinheit für ihre katalytische Aktivität zu benötigen. Mindestens 3 verschiedene Arten von Kupfer kommen in Laccasen vor, wie dies besonders von MALMSTRÖM und Mitarbeitern (MALKIN and MALMSTRÖM, 1970) mit Hilfe der Untersuchung der elektronenparamagnetischen Resonanz (EPR) des Kupfers erhärtet werden konnte.

Art und Anzahl der verschiedenen Kupferatome in Pilzlaccasen gehen aus Tabelle 3 hervor. 50 % des paramagnetischen Kupfers zeigt typischerweise starke Absorption bei Wellenlängen um 600 nm (Typ 1 = "blaues" Cu^{2+}). Im EPR-Spektrum fällt eine ungewöhnlich enge Hyperfein-Aufspaltung auf. Weiterhin wurde das Typ 1 Cu^{2+} als 1-Elektronenakzeptor bei der Substratoxidation erkannt. Das andere paramagnetische Kupfer (Typ 2, "nichtblaues" Cu^{2+}) zeigt eine breitere Hyperfein-Aufspaltung, hat keine Absorption im sichtbaren Bereich und ist Bindungsstelle für anionische Inhibitoren wie Azid, Cyanid

Tab.1 Hauptgruppen kupferhaltiger Enzyme

Enzym	Organismus	Funktion	MG x 10 ⁻³
Hämocyanin	Jasus	O ₂ -Transport	460
Erythrocyuprein (Superoxyddismutase)	Säuger	Cu-Speicher o. Transport (H ₂ O ₂ -Abbau)	33
Gewebe-Cu-Protein (z. B. Cerebrocyuprein)	Säuger		
Azurin	Bordetella	Elektronen- transport	15
Stellacyanin	Rhus		20
Plastocyanin	Spinacia		21
Blaues Protein	Pseudomonas		16
Umecyanin	Armoracia		15
Tyrosinase	Neurospora	Mischfunkt. Oxidasen	33
Tyrosinase	Agaricus		128
Dopamin-β-Hydroxyl.	Bos		290
Laccase I	Podospora	"Blaue Oxid."	390 ^{d)}
Laccase	Rhus		110
Laccase	Polyporus		60
Laccase	Agaricus		
Ascorbinsäure Oxid.	Cucurbita		140
Coeruloplasmin	Säuger		150
Diamino Oxidase	Sus	andere Oxid.	185
Galactose Oxidase	Dactylium		75
Uricase	"uricolytische Tiere"		
Cytochrom Oxidase	weitverbreitet	Term.Oxidase	80

a) Cu²⁺ Typ 1 = "blaues Cu" nach der Nomenklatur von Malmström

b) Literatur in Malkin and Malmström 1970

c) Literatur in Paul and Stigbrand 1970

d) siehe Diskussion des Molekulargewichtes, diese Arbeit

e) blaßbraune Farbe

Abs.max.d. Cu-Chromo- phors im Sichtb.(nm)	blaue Farbe	Cu g Atom/Molekül		Literatur
		Gesamt	Typ 1	
563	+	14	0	Boas et al. 1969; b)
680	+	2	0	b); c)
				Porter 1966
625	+	1	1	b); c)
604	+	1	1	b); Malmström et al. 1970
597	+	2	2	b); c)
630	+	1		c)
610	+	1	1	c); Stigbrand et al. 1971
-	-	1	0	Fling et al. 1963; b)
-	-	4		Kertesz and Zito 1962
-	-	4-7	0	Friedman and Kaufman 1966; b)
610	+	16	4	diese Arbeit
608	+	4	1	b); c)
610	+	4	1	b)
-	- e)	?	?	Nakamura and Ogura 1966; b)
605	+	8	2(?)	b); c)
610	+	8	2	b); c)
480	-	2	0	Mondovi et al. 1967; Yamada et al. 1967; b)
	-	1	0	b)
	-	1	0	b)
600 u. 825	-	2 (+2Häm)	?	Horio et al. 1961; b)

alkin and Malmström 1970

Tab.2 Die wichtigsten Eigenschaften der "blauen Oxidasen"

Enzym	Produzent	Vorkommen extraz. (e) intra-z. (i)	Mol. Gew. $\times 10^{-3}$	Zahl d. Unter- einheit.	Kohlen- hydrat- gehalt (% TS)	Absorpt.- maximum nm (Schulter)	Kupf.		
							% TS	Atom Cu/ Molek.	Cu ⁺ bzw. EPR- b) % ges. Cu
1) Laccase I	Podospora a	i	390 ^{d)}	4	24	280, (292) 610, (750)	0,298	16 ^{d)}	8
2) Laccase II	Podospora a	i	70	-	25	280, (290) 605	0,298	4	2 ^{e)}
3) Laccase III	Podospora a	i	80	-	23	280, (290) 605	0,310	4	2 ^{e)}
4) Laccase A	Polyporus v.	e	60	-	14	280, (330) 610 (640)	0,44	4	2
5) Laccase B	Polyporus v.	e	ca. 60	-				4	2
6) Laccase	Rhus v.	e	110	-	45	280, 600	0,23	4	2
7) Laccase	Rhus v.	e	141	-		614	0,25	6	2 (29%)
8) Laccase	Rhus v.	e	120-141	-	45	280, (330) 615, (780)	0,23- 0,26	5-6	(43-10%) ^{f)}
9) Laccase	Rhus s.	e	130	-		280, (335) 609, (760)	0,22- 0,24	5-6	(21%)
10) Laccase	Lactarius	i	67			280, 606			
11) Laccase	Agaricus	i				kein Max. ^{f)} zw. 500-800	0,14	4	
12) Laccase	Prunus	i	70-90						
13) Coeruleo- plasmin	Säugerblut	e	150		6-10	610		8	4
14) Ascorbins. Oxidase	Cucurbita	i	140		+	280, (290, 330) 607, (760)		8	4(?)

a) EPR+ = nachweisbar durch EPR

b) EPR- = nicht nachweisbar durch EPR

c) nach der Nomenklatur in Malkin and Malmström 1970

d) siehe Diskussion des Molekulargewichtes, diese Arbeit

e) vorläufige Ergebnisse

f) blaßbraune Farbe

er	Cu ⁺⁺ bzw. EPR* a)		Isoelektr. Fokuss.				Literatur
	g Atom/ Mol (%Cu)	c)		Bandenzahl		IEP	
		Typ 1	Typ 2	Säule	Gel		
8	4	4	1	4	4,8-5,6	diese Arbeit; Molitoris u. Esser 1970	
2 ^{e)}		1:1 ^{e)}	1	7	7-10	diese Arbeit; Esser u. Minuth 1970	
2 ^{e)}		1:1 ^{e)}	1	1-2	4,0	diese Arbeit; Esser u. Minuth 1970	
2	1	1	2		4,0-6,8	Malmström u. Mitarb.; Malkin and Malmström 1970	
2	1	1	10		8,6-9,3	Malmström u. Mitarb.; Malkin and Malmström 1970	
2	1	1	1		8,6	Malmström u. Mitarb.; Reinhammar 1970; Malmström et al. 1970	
4 (71%)	+	?				Blumberg et al. 1964	
142-90)	+	?	1			Nakamura u. Mitarb.; Nakamura 1958; Nakamura and Ogura 1966	
(79%)	+					Nakamura u. Mitarb.; Nakamura and Ogura 1966 Iwasaki et al. 1967	
(100%)	?	?				Nakamura and Ogura 1966	
						Mayer and Harel 1968	
4	2	2				Paul and Stigbrand 1970; Ryden 1971	
2(?)	2(?)	2(?)	1		6,0-7,3	Paul and Stigbrand 1970; Malkin and Malmström 1970; Nakamura et al. 1968; Stark and Dawson 1961.	

Tab.3 Kupfer in Pilzlaccasen a)

Cu-Arten	Zahl	EPR Nachw.	Eigenschaften	Funktion
Para-magn. Cu ²⁺ Typ 1	1	+	"blaues" Cu ²⁺ , Absorption bei 610 nm (ox. Enzym), Redoxpotential 0,785 V	Substratoxidation (1-Elektronenübergang)
Typ 2	1	+	"nichtblaues" Cu ²⁺ , hohe Anionenaffinität (Azid, Cyanid, Fluorid) 400 nm-Bande nach Reaktion mit H ₂ O ₂	Stabilisierung eines intramolekularen Intermediärproduktes (H ₂ O ₂ ?) bei der O ₂ -Reduktion?
Dia-magn. Cu ²⁺	2	-	Spingekoppeltes Cu ²⁺ -Cu ²⁺ -Paar, Absorption bei 330 nm (ox. Enzym)	O ₂ -Reduktion bei Enzymreoxidation (4-Elektronenübergang, 2-Elektronenakzeptor)

a) nach Arbeiten der Malmström-Gruppe (Malkin and Malmström 1970; Reinhammar 1972)

und Fluorid. Bei der Reaktion der Laccase mit H_2O_2 ist dieses Kupfer für die Bildung einer Absorptionsbande bei 400 nm verantwortlich (BRÄNDEN et al., 1971). Eine dritte Form des Kupfers, 50 % des Gesamtkupfers, ist durch EPR nicht nachweisbar. Es scheint sich hier um diamagnetisches Kupfer in Form eines spingekuppelten $Cu^{2-}-Cu^{2+}$ -Paares zu handeln (EHRENBERG et al., 1962). Diese Kupferatome absorbieren im oxidierten Zustand bei 330 nm und fungieren bei der Reoxidation des Enzyms durch molekularen Sauerstoff als 2-Elektronen-akzeptor (MALKIN et al., 1969; REINHAMMAR and VANNGÅRD, 1971).

Auf Grund der vorliegenden Befunde wird für die Laccasen folgender Reaktionsmechanismus diskutiert: Laccase reduziert mit dem Cu^{2+} Typ 1 das Substrat in 1-Elektronenschritten, wobei insgesamt 4 Elektronen zur völligen Reduktion des Enzyms benötigt werden. Durch das diamagnetische Kupferpaar werden anschließend in 2-Elektronenschritten insgesamt 4 Elektronen wieder an den Sauerstoff abgegeben. Durch Einschaltung der Kupferatome vom Typ 2 (Stabilisierung eines intermediären Zwischenproduktes im Sinne von H_2O_2 ?) kommt es zur Reoxidation des Kupfers vom Typ 1.

IV. Substratspezifität der Laccasen

Als Substrate für die obenerwähnte Redoxfunktion der Phenoloxidasen dienen vor allem in o- und p-Stellung substituierte Phenole und Arylamine. In Figur 1 ist in summarischer Form der Reaktionsmechanismus für Tyrosinase und Laccase gezeigt. Tyrosinase katalysiert 2 verschiedene Reaktionen: Einmal die Hydroxylierung von Monophenolen in o-Stellung (Kresolaseaktivität), zum anderen die Oxidation von vorzugsweise o-Diphenolen durch ihre Katecholaseaktivität, wobei keine freien Radikale als Intermediärprodukte auftreten. Demgegenüber vermag Laccase nur die Oxidation von o- und p-substituierten Diphenolen durchzuführen, wobei freie Radikale entstehen. Diese Semichinone dismutieren anschließend. Die entstehenden Chinone reagieren dann in mehreren (enzymatischen und nichtenzymatischen) Schritten über gefärbte Zwischenprodukte zu melaninartigen Polymerisaten (Fig.1).

V. Heterogenität von Laccasen

Im Widerspruch zu ihrer systematischen Bezeichnung als p-Diphenol-oxidierendes Enzym katalysiert die Laccase jedoch auch die Oxidation von Substraten wie Ascorbinsäure und Kaliumferrocyanid und von in o- und m-Stellung substituier-ten Phenolen (Literatur und Diskussion in FRANKE, 1960; SCHANEL and ESSER, 1971). Nicht nur hinsichtlich ihrer Substratspezifität, sondern auch in anderen Eigenschaften, wie Molekulargewicht (60.000 - 390.000), Kohlenhydratgehalt (14 - 45 %) und Anzahl und Art des gebundenen Kupfers, sind die bisher unter-suchten Laccasen sehr heterogen, wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist (siehe auch MALMSTRÖM et al., 1970; REINHAMMAR, 1970). Besonders über Menge und Art des EPR-nachweisbaren Kupfers bestehen unterschiedliche Auffassungen zwischen den Arbeitsgruppen um MALMSTRÖM und NAKAMURA. Darauf wird noch anhand eigener Befunde einzugehen sein.

VI. Biosynthese und Funktion von Glykoproteinen

Neben dem Kupfer ist besonders der Kohlenhydratanteil der Laccase von erheb-licher Bedeutung für deren Struktur und Funktion. Es soll daher kurz darauf eingegangen werden:

In jüngster Zeit sind in der Erforschung der Biosynthese und Funktion der Glykoproteine große Fortschritte gemacht worden, die ihren Niederschlag in einer Reihe von Übersichtsreferaten gefunden haben (EYLAR, 1965; ROSEMAN, 1968; GOTTSCHALK, 1969; SPIRO, 1970; WINTERBURN and PHELPS, 1972).

Glykoproteine stellen Polypeptide dar, die einen verschiedenen hohen kovalent gebundenen Kohlenhydratanteil enthalten. Während die Polypeptidkette der Glyko-proteine an freien Ribosomen synthetisiert wird und ihre Aminosäuresequenz durch den üblichen Matrizenmechanismus genetisch gesteuert ist, erfolgt die schrittweise Anfügung der einzelnen Kohlenhydrate an membrangebundenen Riboso-men durch hochspezifische Transferasen. Die in Glykoproteinen vor allem ent-haltenen Einfachzucker sind Mannose (Man), Galactose (Gal), Glucose (Glc),

Xylose (Xyl), Fucose (Fuc) und Rhamnose (Rha), außerdem die Hexosamine N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylgalactosamin (GalNAc) sowie N-Acetylneuraminsäure (N-AN) und N-Glycolylneuraminsäure. Wie die Polypeptidketten können auch die Zuckerketten verzweigt sein, bevorzugter Verzweigungspunkt ist die Mannose. Die Anknüpfung des ersten Zuckerrestes erfolgt häufig über eine N-glykosidische Bindung ((Asparagin (Asn)-GlcNAc)) oder eine O-glykosidische Bindung mit den Partnern Serin (Ser), Threonin (Thr), Hydroxylysin (Hyl) oder Hydroxyprolin (Hyp) einerseits und GalNAc, Gal, Xyl oder Arabinose (Ara) andererseits. Am nichtreduzierenden Ende der Zuckerkette werden häufig Fucose oder Neuraminsäure gefunden. Die beteiligten Transferasen sind sowohl spezifisch für bestimmte Aminosäuresequenzen der Polypeptidkette (z.B. Asn- α -Thr/Ser-), für das Zuckerende des wachsenden Glykoproteins oder auch für den zu übertragenden Zucker. Dennoch erreicht die Spezifität und Fehlerlosigkeit dieses Mechanismus bei weitem nicht die der m-RNS gesteuerten Proteinsynthese, was die häufig beobachtete Mikroheterogenität bei Glykoproteinen erklärt. Diese konnte in den meisten Fällen im Zuckeranteil lokalisiert werden (PLAPP and COLE, 1967; SPIRO, 1970; ESSER and MINUTH, 1971; RYDEN, 1971; WINTERBURN and PHELPS, 1972).

Über die funktionelle Bedeutung des Kohlenhydratanteils eines Glykoproteins gibt es verschiedene Auffassungen. So werden diskutiert:

- 1) Markierung eines Proteins für extrazelluläre Ausschleusung (EYLAR, 1965; MELCHERS and KNOPF, 1967).
- 2) Bestimmung des weiteren extrazellulären Schicksals (MORELL et al., 1971).
- 3) Schutzfunktion (STRUMEYER and MALIN, 1970; SCHANEL et al., 1971).
- 4) Erhaltung der Quartärstruktur (ROMBAUTS, 1967).

Während WINTERBURN und PHELPS (1972) noch eine Reihe weiterer Funktionen diskutieren, betont SPIRO (1970) auch die Möglichkeit, daß dem Kohlenhydratanteil keine allgemeingültige Funktion zuzuordnen sein. Es ist daher von der Eigen-

schaft der Laccase als Glykoprotein allein noch kein Aufschluß über deren biologische Funktion zu erwarten.

VII. Vorkommen und biologische Funktion von Laccasen

Neben dem Coeruloplasmin, der "tierischen Laccase", wurde in Tieren eine weitere Laccase in Nieren gefunden (KEILIN and HARTREE, 1935). Über ihr Vorkommen in höheren Pflanzen liegen zahlreiche Berichte vor (Literatur und Zusammenstellung in FRANKE, 1960). Hauptsächlich wird Laccase jedoch bei Pilzen als vor allem extrazelluläres Enzym gefunden. Sie ist besonders häufig bei den sogenannten "Weißfäulepilzen" unter den holzzerstörenden Pilzen (BOSE and SARKAR, 1937; LINDBERG, 1955; RONNER, 1957; FRANKE, 1960; ROSCH, 1966; KAARIK, 1965; SCHANEL, 1967).

Trotz dieser weiten Verbreitung und der langdauernden biochemischen Untersuchung existieren über die biologische Funktion der Laccase nur mehr oder weniger hypothetische Vorstellungen. Die wichtigsten seien hier kurz zusammengefaßt:

1) Vor allem wegen ihres Vorkommens in holzabbauenden Pilzen wurde Laccase mit dem Ligninabbau in Verbindung gebracht (LINDBERG, 1955; LYR und ZIEGLER, 1959; HAIDER, 1964; ROSCH, 1965; SCHUBERT, 1965; HALDER, 1966; TROJANOWSKI et al., 1966; SCHUBERT, 1968; SARKANEN, 1971). Andererseits liegen jedoch auch, besonders aus der Schule FREUDENBERGS (Literatur in FREUDENBERG und NEISH, 1966), Hinweise für eine Beteiligung an der Ligninbiosynthese (z.B. Oxidation von Coniferylalkohol mit anschließender Polymerisierung) vor. Die Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig, da meistens nicht mit gereinigten Enzymen gearbeitet wurde; zweitens ist bekannt, daß Laccase meist mit Peroxidase, Katalase und Tyrosinase vergesellschaftet ist, denen ähnliche Funktionen zugeschrieben werden; drittens wurde meistens mit mehr oder weniger denaturierten Ligninabbauprodukten (oder Vorstufen) gearbeitet, wobei nur Einzelschritte aus der Ligninbiosynthese oder dem Ligninkatabolismus erfaßt werden konnten.

Insgesamt ist bei kritischer Betrachtung eher eine Beteiligung an der Ligninbiosynthese wahrscheinlich als am Ligninabbau, wenn es auch verwundert, daß Laccase nur bei außerordentlich wenigen der holzbildenden Pflanzen gefunden wurde (FRANKE, 1960).

2) Schutzfunktion. CLUTTERBUCK (1972) konnte eine positive Korrelation zwischen Phenoloxidasen- und Melaniningehalt von Ascosporen einerseits und deren Lichtresistenz andererseits aufzeigen. POTGIETER und ALEXANDER (1965), KUO und ALEXANDER (1967) und BULL (1970a,b) demonstrierten eine zunehmende Resistenz von Pilzhyphen gegen mikrobielle Lyse mit zunehmendem Melaniningehalt der Hyphen.

3) Entgiftung. Abbau von Kernholztoxinen und chlorierten Phenolen (häufig verwendete Holzschutzstoffe gegen Pilzbefall) durch Laccasen konnte LYR (1962, 1963) zeigen.

4) Funktion in Wirt/Parasit-Beziehungen. Hier wurde sowohl Beteiligung der Laccase und Tyrosinase am Abwehrmechanismus des Wirtes, z.B. in der Hypersensitivitätsreaktion resistenter Wirtspflanzen (ROBERTSON et al., 1968; KOSUGE, 1969; STOESEL, 1970), als auch eine Rolle bei der Überwindung der Abwehrreaktion des Wirtes durch den infizierenden Parasit im Sinne der bereits erwähnten Entgiftungsfunktion der Phenoloxidasen postuliert. Die Hauptschwierigkeit dieser Untersuchungen liegt in der analytischen Trennung und Zuordnung von Wirt- und Parasitstoffwechsel bzw. deren Produkten.

5) Schließlich diskutiert LINDBERG (1955) noch ökologische Faktoren bei der Phenoloxidasenausstattung der Pilze, während

6) in einer kürzlich erschienenen Arbeit von WILSON (1970) das Problem der Korrelation von Morphogenese und Phenoloxidasen bei Pilzen neu beleuchtet wird, das vor allem an Neurospora crassa (Literatur in ESSER, 1968) bereits früher eingehend untersucht wurde.

Zusammenfassend muß aber zum jetzigen Zeitpunkt noch festgestellt werden, daß die biologische Funktion der Laccasen, wie der Phenoloxidasen insgesamt, trotz der langdauernden eingehenden Untersuchung noch völlig ungeklärt ist. Ihre weite Verbreitung und der teilweise sehr hohe Anteil der Phenoloxidasen am Gesamtprotein der Zellen lassen jedoch eine wichtige biologische Funktion im Stoffwechsel vermuten. Ansatzpunkte zur Klärung dieser Frage werden daher vielfach zunächst in einer analytischen Untersuchung des Enzyms selbst und seines Reaktionsmechanismus gesucht.

B. Problemstellung

Ausgangspunkt der hier zu berichtenden Arbeiten waren Untersuchungen von ESSER über verschiedene Fragen der Incompatibilität bei Pilzen, die an dem Ascomyceten Podospora anserina untersucht wurden. Dieser Pilz eignet sich auf Grund seiner günstigen Wachstumseigenschaften, seiner weitgehend durchgeführten genetischen Kartierung, der Möglichkeit zur Tetradenanalyse und seines hohen Anteils der Phenoloxidasen, insbesondere der Laccase, am Gesamtprotein besonders gut für Untersuchungen im genetisch/biochemischen Bereich. Ausgehend von Arbeiten über Incompatibilität (ESSER 1956a, 1959), Morphogenese und schließlich eine damit korrelierte Pigmentierung (ESSER 1956b, 1968), die auf die Anwesenheit von Phenoloxidasen zurückgeführt werden konnte, wurde festgestellt, daß die Phenoloxidasenausstattung des Wildstammes und verschiedener Mutanten differierte (ESSER, 1963a, 1966).

Bei der sich hieraus ergebenden speziellen Untersuchung der Laccasen hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer katalytischen und biologischen Funktion interessiert mich besonders die hier erstmalig aufgetretene hochmolekulare Laccase I, die sich in einer Reihe von Eigenschaften von den Laccasen anderer Organismen, aber auch von den im gleichen Pilz vorkommenden niedermolekularen Laccasen unterscheidet. Darüber hinaus war es Ziel meiner Untersuchung, die strukturellen und funktionellen Beziehungen zwischen den verschiedenen Laccasen zu klären.

Die niedermolekularen Laccasen II und III wurden dabei vorwiegend von ESSER und MINUTH untersucht. Ihre Ergebnisse sind, soweit sie im Zusammenhang mit dieser Arbeit zitiert werden, entsprechend gekennzeichnet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte ich am Institut für Strukturchemie der Universität Groningen (Holland) vornehmen, während die Untersuchung der elektronenparamagnetischen Resonanz in Zusammenarbeit mit den Instituten für Biochemie der Universität Groningen und Göteborg (Schweden) durchgeführt wurde.

C. Material und Methoden

Wildstamm des Ascomyceten Podospora anserina (Ces.) Rehm: Einzelheiten über Genetik und Entwicklungsgeschichte bei ESSER (1956a, 1959). Mutante "zonata" von Podospora anserina: Entsprechende Angaben sind zu finden bei ESSER (1956b, 1969), HERZFELD und ESSER (1969) und ESSER und MINUTH (1970).

Anzucht der Myzelien: Siehe ESSER (1963b), MOLITORIS und ESSER (1970), ESSER und MINUTH (1970), MOLITORIS und ESSER (1971).

Reinigung der Laccasen und Reinheitskriterien: ESSER (1963b), MOLITORIS und ESSER (1970), ESSER und MINUTH (1970).

Analytische Methoden: Die zur Anwendung gelangenden analytischen und biochemischen Methoden sind bereits größtenteils in den beiliegenden Arbeiten MOLITORIS und ESSER (1970, 1971), MOLITORIS et al. (1972) und MOLITORIS und REINHAMMAR (1973) beschrieben.

Die NaDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde nach SHAPIRO et al. (1967) und WEBER und OSBORN (1969) durchgeführt. Die gaschromatographische Analyse der Zuckerkomponente wurde in der von ESSER und MINUTH (1971) beschriebenen Weise nach BOLTON et al. (1965) und SWEELEY et al. (1963) vorgenommen. Die Aminosäureanalyse erfolgte nach SPACKMAN et al. (1958), wie in ESSER und MINUTH (1971) beschrieben. Die Werte für Serin und Threonin wurden für den bei der Hydrolyse erfolgenden Abbau korrigiert. Die Bestimmung von Cystein

und Methionin erfolgte nach der Methode von MOORE (1963). Tryptophan wurde spektrophotometrisch nach EDELHOCH (1967), die freien SH-Gruppen nach ZÄHLER und CLELAND (1968) bestimmt. Die N-terminale Aminosäure wurde nach GRAY (1967) und NEEDLEMAN (1971) ermittelt.

Definitionen und Einheiten: Eine Enzymeinheit (E) entspricht einer Extinktionsänderung von 0,2/min bei 430 nm und 1 cm Lichtweg. Als Substrat wurde DL-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) verwendet.

Die Spezifische Aktivität (spA) gibt die Anzahl der Enzymeinheiten pro mg Protein an (E/mg Protein, bestimmt nach WARBURG und CHRISTIAN, 1941).

Alle sonstigen Angaben über Laccasekonzentrationen beziehen sich auf mg Trockensubstanz.

Verwendete Abkürzungen

DOPA	D,L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
E	Enzymeinheiten
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz
GuHCl	Guanidin-Hydrochlorid
HST	Harnstoff
IEP	Isoelektrischer Punkt
KH	Kohlenhydrat
L I, L II, L III	Laccase I, Laccase II, Laccase III
β -ME	β -Mercaptoöthanol
MG	Molekulargewicht
NaDS	Natriumdodecylsulfat
spA	Spezifische Aktivität
TS	Trockensubstanz

D. Ergebnisse

I. Das Laccasespektrum von Podospora anserina

Voraussetzung für eine sinnvolle vergleichende Analyse von Struktur und Funktion eines komplexen Enzymsystems ist zunächst eine analytische Erfassung der Einzelkomponenten. Es wurden daher zunächst die intrazellulären Laccasen von Wildstamm und Mutante "zonata" gereinigt und vergleichend untersucht.

Herkunft, Ontogenese und Genetik des Wildstammes sind bei ESSER (1956a, 1959) beschrieben. Die Mutante "zonata" (ESSER 1956b, 1966, 1969) bildet im Gegensatz zum Wildstamm keine weiblichen Geschlechtsorgane, zeigt reduziertes, rhythmisches (zoniertes) Wachstum, verminderte Melaninbildung und eine veränderte Hyphenmorphologie. LYSEK und ESSER (1970) konnten zeigen, daß sie auf eine Punktmutation im zonata Gen zurückzuführen ist, der beobachtete Pleiotropismus also einer Einfaktormutante zuzuordnen ist.

Zunächst wurde festgestellt, daß die untersuchten intrazellulären Laccasen in mindestens 3 eindeutig unterscheidbaren Formen auftreten, die als Laccase I (L I), Laccase II (L II) und Laccase III (L III) bezeichnet werden. Sie konnten im Wildstamm und in verschiedenen Mutanten nachgewiesen werden (ESSER 1963 a, b, ESSER 1964, ESSER and MINUTH, 1970).

Die 3 Laccasen wurden aus dem Wildstamm und verschiedenen Mutanten isoliert und gereinigt (ESSER 1964, MOLITORIS und ESSER 1970, ESSER and MINUTH, 1970). Frischgereinigte L I und L III ist nach ihrem Verhalten in der Ultrazentrifuge und in der Elektrophorese homogen, während bei L II Mikroheterogenität im Kohlenhydratanteil festgestellt werden konnte (MOLITORIS und ESSER, 1970, ESSER and MINUTH, 1970, ESSER and MINUTH, 1971).

Bei einem Vergleich der Laccasen des Wildstammes mit der Einfaktormutante "zonata" fällt zunächst das inverse Mengenverhältnis der Laccasen auf. Aus Figur 2 geht hervor, daß der Wildstamm große Mengen L I und geringe Mengen

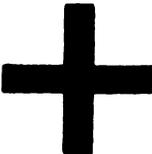
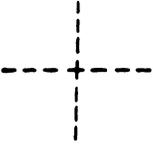
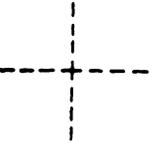
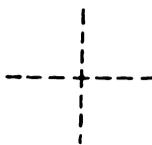
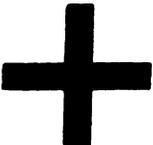
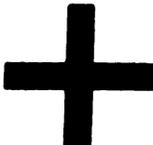
		Laccase		
		I	II	III
wild				
zonata				

Fig.2

Laccaseverteilung in Wildstamm und Mutante "zonata" des Ascomyceten Podospora anserina.

L II und L III bildet. Da sich zeigen ließ, daß es sich hierbei nur um quantitative und keine qualitativen Unterschiede zwischen den Stämmen bezüglich der 3 Laccasen handelt, konnte man auf Grund dieses Befundes bereits annehmen, daß es sich bei zonata nicht um ein Strukturgen für die Laccase-synthese, sondern möglicherweise um ein Regulatorgen im weitesten Sinne handelt (Diskussion bei ESSER and MINUTH, 1970).

II. Chemische und biophysikalische Analyse der Laccase I

Nach Bestimmung der Optimalbedingungen für Aktivität und Stabilität der gereinigten Laccase I wurde eine Reihe chemischer und biophysikalischer Eigenschaften bestimmt (MOLITORIS und ESSER, 1970). Die Aminosäurenanalyse der L I (Tabelle 4) zeigte im Gegensatz zu einer früheren Bestimmung, bei der kein Cystein gefunden wurde (WEBER und ESSER, 1964), das Vorhandensein von Cys-SH in relativ großer Menge sowie fast die doppelte Menge Methionin und Tryptophan. Das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren (ohne Berücksichtigung des Ammoniakwertes aus Asp-NH₂ und Glu-NH₂) beträgt 1,84, d. h. es überwiegen die sauren Aminosäuren. Freie SH-Gruppen konnten im nativen Enzym nach der Methode von ZAHLER und CLELAND (1968) nicht nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure wurden zunächst Hinweise auf Lysin gefunden, (Dansylierung, MOLITORIS und KLISCHIES, unveröffentlicht), eine nachfolgende Analyse (Dinitrofluorbenzol, KLISCHIES, 1974) ergab jedoch eindeutig Serin.

Wie bereits erwähnt, ist Laccase ein Glykoprotein, es besitzt mit 22 % der Trockensubstanz einen verhältnismäßig hohen Kohlenhydratanteil. Dünnschicht-chromatographische und gaschromatographische Analyse des Zuckeranteils ergaben 5 Komponenten (Man, Rha, GlcNAc, Gal, Glc), deren mengenmäßige Anteile aus Tabelle 5 hervorgehen.

Aus der Aminosäuren- und Zuckeranalyse errechnet sich ein Molekulargewicht von etwa 340.000. Dieses liegt um ca. 13 % niedriger als das mit der Ultrazentrifuge ermittelte Molekulargewicht ($M_{SD} = 390.000$; $S_{20,w}^0 = 14,47 \times 10^{-13}$ sec; $D_{20,w}^0 = 3,06 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \times \text{sec}^{-1}$; $\bar{V}_{20} = 0,701 \text{ mg/ml}$; $M_w = 383.000$; MOLITORIS und ESSER, 1970).

Tab.4 Aminosäurezusammensetzung der Laccasen von *Podospora anserina*

Laccase	Mol.Aminosäure / Mol.Enzym				Verhältnis Aminosäuregehalt	
	I		II ^{x)}	III ^{x)}		
Mol.Gew. ^{a)}	390.000		70.000	80.000		
Struktur	Tetramer	Monomer ^{b)}	Monomer	Monomer	LI/LII	LI/LIII
Asp	226	57	60	60	3,8	3,8
Thr	111	28	36	48	3,1	2,3
Ser	87	22	25	32	3,5	2,7
Glu	131	45	25	48	7,2	3,8
Pro	141	35	34	30	4,2	4,7
Gly	154	39	38	45	4,1	3,4
Ala	106	27	30	29	3,0	3,7
Cys SH	74	19	11	16	6,7	4,1
Val	89	22	34	28	2,0	3,2
Met	71	18	9	7	7,9	10,1
Ile	128	32	20	24	6,4	5,3
Leu	111	26	29	39	3,8	2,8
Tyr	51	13	12	12	4,3	4,3
Phe	73	18	16	19	4,0	3,8
Lys	67	17	13	8	5,2	8,4
His	70	18	16	17	4,4	4,1
Arg	86	22	17	17	5,1	5,1
Trp	97	24	13	16	7,5	6,1
Mol.Gew. ^{c)}	254.500		55.800	63.800		
Mittel					∅ 4,9	∅ 4,5

a) Berechnet aus hydrodynamischen Messungen (Molitoris u.Esser 1970)

b) Werte der tetrameren Laccase, geteilt durch 4

c) berechnet für den Proteinanteil aus der Aminosäurezusammensetzung

x) Minuth, unveröffentlicht

Enzym	Gaschromatographie										Orcin	Anthron	
	Anteil der Einzelsucker										Σ KH	KH	KH
	Mao		Rha		GlcNAc		Gal		Glc				
	% TS	% KH	% TS	% KH	% TS	% KH	% TS	% KH	% TS	% KH	% TS	% TS	% TS
Lac. I	14,3	71,4	2,8	13,8	1,5	7,4	1,1	5,6	0,4	1,8	20,0	23,7	23
Lac. II	11,7	51,4	4,7	22,7	0,8	3,5	4,3	18,9	1,2	5,5	22,7	24,9	
Lac. III	16,4	72,6	3,1	13,5	1,6	6,7	1,2	5,0	0,5	2,0	23,1	22,7	

Tab.5

Kohlenhydratanalyse der Laccasen I, II und III (Gaschromatographie). Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf den prozentualen Anteil der jeweiligen Komponente an der Trockensubstanz (%TS) bzw. am Kohlenhydratanteil (%KH) des Enzyms. Zum Vergleich der gaschromatographisch ermittelten Werte sind auch die Ergebnisse der Bestimmung mit dem Orcin- bzw. dem Anthron-Reagenz angegeben.

In der Disc-Elektrophorese (pH 8,3/9,5) zeigt Laccase I bei anodischer Wanderung eine Bande mit $R_f = 0,10$. Entsprechend wurde auch ihr isoelektrischer Punkt (IEP) bei pH 4,9 bestimmt in Übereinstimmung mit dem "berwiegen saurer Aminosäuren (siehe oben).

Das Absorptionsspektrum (Fig. 3) zeigt neben einem Maximum bei 280 nm und einer schwachen Schulter bei 410 nm das für die blauen Oxidasen typische Maximum im Bereich von 610 nm (vgl. Tab. 2).

Das Absorptionsdifferenz-Spektrum (oxidiert minus reduziert) der oxidierten gegen die durch Ascorbinsäure reduzierte Laccase I (Fig. 4) weist je ein Maximum bei 330 und 610 nm auf sowie eine schwache Schulter bei 750 nm (MOLITORIS and REINHAMMAR, 1973).

Nach Reoxidation der Laccase durch Luftsauerstoff stellt sich wieder das ursprüngliche Spektrum ein und die blaue Farbe kehrt zurück. Absorptions- und Absorptionsdifferenz-Spektrum sind typisch für alle bisher untersuchten Laccasen und lassen im Analogieschluß auch eine dementsprechende Anzahl und Art von Kupferatomen bei der Laccase I erwarten.

Das Ergebnis der Kohlenhydratanalyse bestätigt frühere qualitative Bestimmungen (MOLITORIS und ESSER, 1970). Der in Tabelle 5 angegebene Hexosamingehalt stimmt mit den Werten von WEBER und ESSER (1964) und ESSER et al. (1964) überein, liegt aber niedriger als von MOLITORIS und ESSER (1970) auf Grund halbquantitativer Bestimmungen ursprünglich angenommen. Neutralzucker und Aminosäuregehalt liegen um 100 % über den Werten von WEBER und ESSER (1964). Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in jener Arbeit irrtümlich ein Trockensubstanzgehalt von 90 bis 95 % der nach WARBURG und CHRISTIAN (1941) ermittelten Proteinwerte angenommen wurde, während jüngere Bestimmungen (MOLITORIS und ESSER, 1970) einen Trockensubstanzgehalt von nur 46 % ergaben.

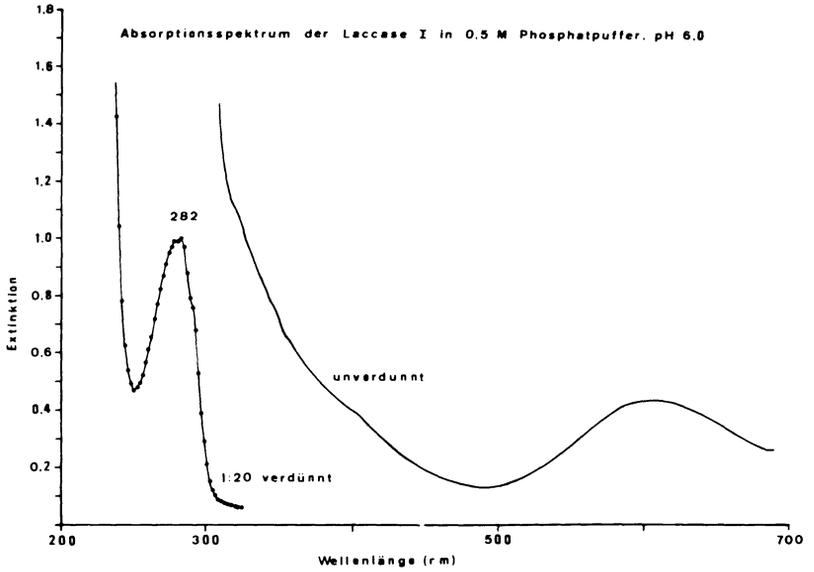


Fig.3

Absorptionsspektrum der Laccase I in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

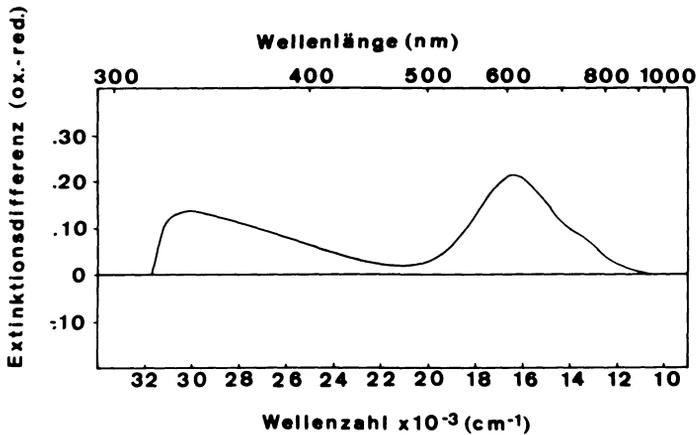


Fig.4

Absorptionsdifferenz-Spektrum (oxydiert minus reduziert) der Laccase I. Messung oxydierter Laccase I ($1,25 \times 10^{-5}$ M) gegen reduzierte Laccase I ($1,25 \times 10^{-5}$ M + Ascorbinsäure $1,25 \times 10^{-2}$ M), jeweils in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

III. Analyse des Kupfers

Wie bereits angedeutet, ist das Kupfer in der Laccase fest gebunden und essentiell für deren katalytische Funktion. Es kann unter reduzierenden Bedingungen durch Dialyse gegen KCN entfernt und durch Zusatz von Cu^+ -Ionen wieder eingeführt werden, wobei auch die katalytische Aktivität zurückkehrt (OMURA, 1961; IWASAKI et al., 1967; MALKIN et al., 1969; ANDO, 1970). In einer früheren Arbeit (MOLITORIS und ESSER, 1970) wurde der Kupfergehalt der LI chemisch (Dichinolyl-Reagenz, BROMAN et al., 1962) zu 0,298 % der Trockensubstanz bestimmt. Dies entspricht 18,3 g-Atom Cu/Laccase-Molekül, bezogen auf ein Molekulargewicht von 390.000. Während die chemische Methode nur die Bestimmung des Gesamt-Kupfers als Cu^+ erlaubt, können durch EPR-Messungen ungepaarte Elektronen untersucht werden, wie sie bei freien organischen Radikalen und bei den Übergangsmetallen in deren paramagnetischen Oxidationsstadien (bei Kupfer als Cu^{2+}) auftreten. Diese Methode erlaubt also Bestimmung der Art und Menge paramagnetischen Kupfers. Sie wird inzwischen routinemäßig bei der Untersuchung von Kupferproteinen eingesetzt (BRAY, 1969; MALKIN and MALMSTRÖM, 1970).

Eine Untersuchung der EPR-Spektren der LI (MOLITORIS and REINHAMMAR, 1975) ergab, daß 50 % des Gesamtkupfers in EPR-nachweisbarer Form vorliegen, 50 % davon als Cu^{2+} Typ 1 mit enger Hyperfeinaufspaltung, die anderen 50 % als Cu^{2+} Typ 2 mit weiter Hyperfeinaufspaltung. Durch Computersimulation (Fig.5) konnte gezeigt werden, daß das experimentell erhaltene Spektrum als Überlagerung aus den Spektren gleicher Mengen von Cu^{2+} des Typ 1 und Typ 2 resultiert. Dies entspricht auch den Befunden der MALMSTRÖM-Gruppe (MALMSTRÖM et al., 1970; MALKIN and MALMSTRÖM, 1970) an Polyporus- und Rhus-Laccase. Dieser Befund ist ein weiteres Argument für die von dieser Arbeitsgruppe als generell angenommene Kupferverteilung bei den blauen Oxidasen, im Gegensatz zu der von NAKAMURA und Mitarbeitern (NAKAMURA et al., 1965; NAKAMURA and OGURA, 1966) vertretenen Ansicht.

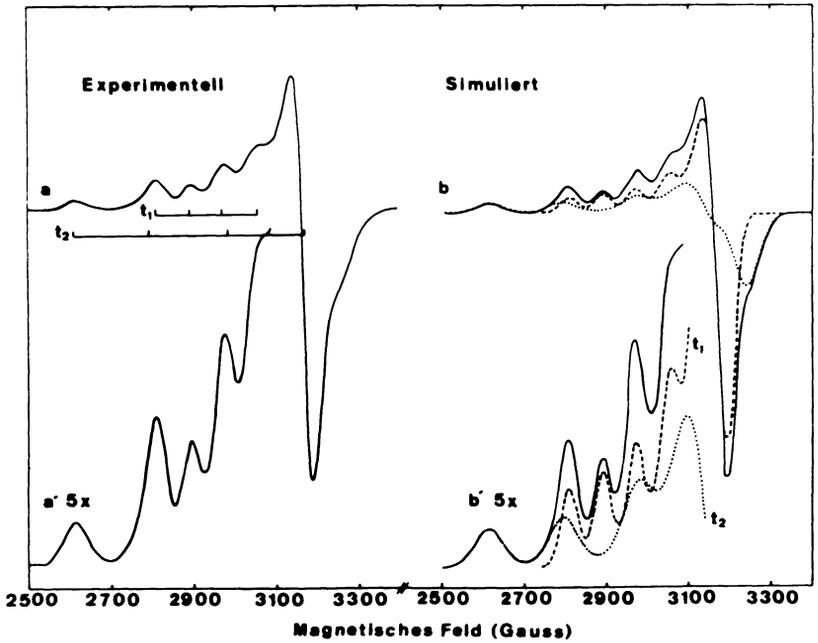


Fig.5

EPR-Spektrum der Laccase I bei 10^4 ° K und 9 GHz. Das experimentelle Spektrum a (a' bei 5facher Verstärkung) wurde mit Laccase I (0,04 mM in 0,02 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,0) gewonnen. Die Konstanten der Hyperfeinaufspaltung für Cu^{2+} Typ 1 und Typ 2 sind graphisch als t_1 und t_2 dargestellt.

Das computersimulierte Spektrum b (b' bei 5facher Verstärkung) ergibt sich als Summe (—) der Einzelspektren t_1 (-----) und t_2 (.....) unter Verwendung der aus dem experimentellen Spektrum ermittelten EPR-Werte für Cu^{2+} Typ 1 und Typ 2 und unter der Annahme gleicher Mengen der beiden para-magnetischen Cu-Atome.

In Analogie zu den Befunden an anderen Laccasen dürfte auch das Maximum bei 610 nm im Absorptions- und Absorptionsdifferenz-Spektrum auf Cu^{2+} vom Typ 1 zurückzuführen sein, während die beiden EPR-nichtnachweisbaren Kupferatome für das Maximum des Absorptionsdifferenz-Spektrums bei 330 nm verantwortlich wären und wahrscheinlich als spingekuppeltes Cu^{2+} - Cu^{2+} -Paar vorliegen.

Es konnte somit gezeigt werden, daß auch die hochmolekulare L I in Art und Verteilung des enthaltenen Kupfers den anderen bisher untersuchten Laccasen gleicht. Sie weicht jedoch von ihnen insofern ab, als sie den 4- bis 5-fachen Gesamtkupfergehalt aufweist.

IV. Biochemische Analyse (siehe auch Tab.8 und 9)

Die von L I katalysierte Oxidation von Diphenolen, Kaliumferrocyanid und Ascorbinsäure entspricht qualitativ weitgehend der anderer Laccasen (MOLITORIS und ESSER, 1970), doch weist L I eine wesentlich höhere spezifische Aktivität (spA) auf. Eine polarographische Untersuchung der L I-Aktivität mit über 30 verschiedenen Substraten bestätigte dies (SCHANEL and ESSER, 1971). Sie zeigte weiterhin, daß L I nur in o- und p-Stellung substituierte Phenole zu oxidieren vermag. Das Temperaturoptimum der Aktivität der L I liegt bei 50° . Bei höheren Temperaturen wird das Enzym irreversibel geschädigt. Die Halbwertszeit der Hitzeinaktivierung bei 60°C zeigt mit 5 min eine verhältnismäßig geringe Hitze-stabilität des Enzyms.

Wie aus Fig.6 ersichtlich, tritt bei L I typische Substrat/Endprodukt-Hemmung auf. L I wird weiterhin durch SH-Gruppen-Substanzen gehemmt. Fig.7 zeigt das Ausmaß der Hemmung bei verschiedenen Konzentrationen von β -Mercaptoäthanol (β -ME). Nach Entfernung von β -ME durch Dialyse kommt es nur zu geringfügiger Reaktivierung. Dies zeigt, daß im Gegensatz zu der Reaktion mit z.B. Ascorbinsäure die Wirkung von β -ME nicht nur in einer reversiblen Reduktion, sondern in weitergehenden (irreversiblen) Veränderungen am Molekül besteht. Der Befund steht auch im Gegensatz zu der reversiblen Hemmung, die mit kupferkomplexie-

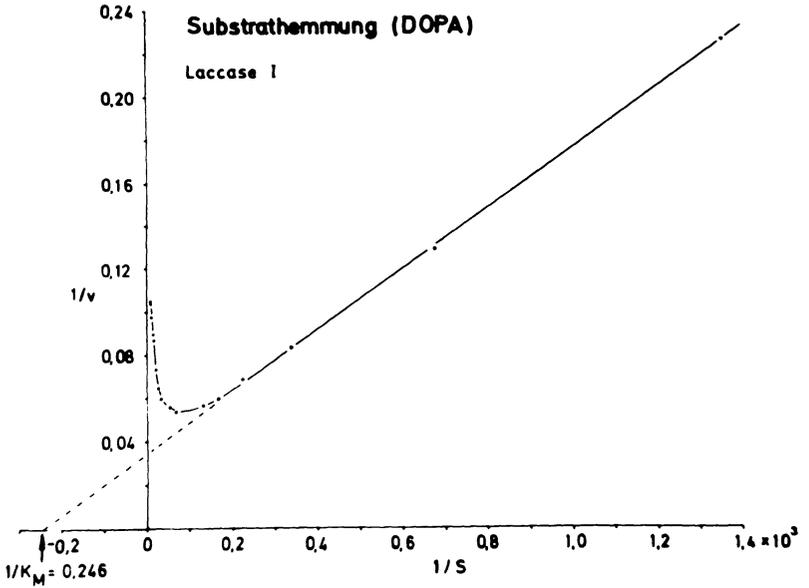


Fig.6

Substrathemmung der Laccase I durch DOPA. Auftragung $1/v$ gegen $1/S$ nach Lineweaver-Burk. 0,02 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

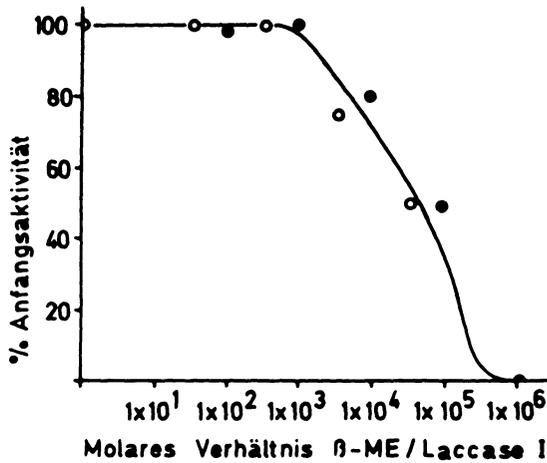


Fig.7

Hemmung der Aktivität der Laccase I durch β -ME im kolorimetrischen Test (0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,0) mit DOPA. Aktivitätsbestimmung unmittelbar nach der Mischung von β -ME und Laccase I.

o = Versuch A, ● = Versuch B.

renden Agentien wie Natriumazid (MOLITORIS und ESSER, 1970) auftritt. Der mit Natriumazid und DOPA gefundene Hemmtyp entspricht einer gemischten Hemmung, die Gemeinsamkeiten mit dem nichtkompetitiven Hemmtyp aufweist (MOLITORIS und ESSER, 1970).

Da serologische Methoden mit zu den empfindlichsten und spezifischsten Nachweisreaktionen der Proteinchemie gehören, wurden Antiseren gegen die reinen Laccasen hergestellt und die KRM-Werte (Kreuzreagierendes Material) sowie das Verhalten in der Immunelektrophorese der verschiedenen Antigen/Antikörper-Kombinationen geprüft (ESSER, 1963c; MOLITORIS und ESSER, 1970; ESSER und MINUTH, 1970). Dabei fiel eine doppelte Präzipitationsbande der Laccase I gegen Antienzym I auf. (Diskussion in MOLITORIS und ESSER, 1970.)

Die untersuchten biochemischen Eigenschaften der L I zeigen, daß qualitativ (mit Ausnahme der fehlenden m-Spezifität) keine wesentlichen Unterschiede zu den anderen Laccasen von Podospora und denen anderer Organismen bestehen.

V. Analyse der Quartärstruktur der Laccase I

1) Dissoziation und Aggregation

Aus der analytischen Untersuchung der L I hatte sich ergeben, daß ihr Molekulargewicht (MG L I = 390.000, L II = 70.000, L III = 30.000) und ihr Kupfergehalt (L I = 18,3, L II = 3,3, L III = 3,9 Cu-Atome/Molekül) um den Faktor 4 bis 5 über den Werten der L II und III liegen. Dieser Befund legte bereits den Gedanken an eine oligomere Struktur der L I nahe. Dazu kam, daß im Laufe der Enzymreinigung und der biochemischen Analyse sich Anhaltspunkte für eine Dissoziation der L I in kleinere Untereinheiten ergaben (MOLITORIS und ESSER, 1970):

- a) Abspaltung kleinerer Komponenten bei Rechromatographie an Molekularsiebsäulen.
- b) Auftreten einer definierten, langsamer sedimentierenden Komponente in der Ultrazentrifuge nach längerer Inkubation der L I bei Raumtemperatur.

- c) Eine biphasische Hitzeinaktivierungskurve gealterter Laccase I im Gegensatz zum linearen Inaktivierungsverlauf frischer Laccase.
- d) Absinken des apparenten Molekulargewichtes bei langdauernden Gleichgewichtssedimentationsläufen bei erhöhter Temperatur.
- e) Auftreten eines Doppelgipfels in der isoelektrischen Fokussierung nach 24-stündiger Inkubation der Laccase I bei Raumtemperatur (Fig. 8a, 8c).

Während diese Befunde auf eine Spaltbarkeit der Laccase I hinweisen, deuten andere Phänomene in Richtung einer Aggregation (MOLITORIS und ESSER, 1970):

- a) Im Verlaufe der Enzymreinigung traten auf der Molekularsiebsäule häufig vorauslaufende Gipfel mit Laccase-Aktivität auf. Das aus ihrem Sedimentationskoeffizienten (20 bzw. 34 Svedberg-Einheiten) nach der Formel von SCHERAGA und MANDELKERN (1953) berechnete Molekulargewicht entsprach etwa dem 2 bzw. 4-fachen Wert der Laccase I.
- b) In der Ultrazentrifuge wurde bei steigenden Puffer- oder Proteinkonzentrationen ein Ansteigen des Sedimentationskoeffizienten beobachtet.
- c) Homogene (Ultrazentrifugation, Disc-Elektrophorese) Laccase I zeigt nach starker Konzentrierung in der Molekularsiebsäule einen zusätzlichen vorauslaufenden Gipfel (Fig. 9). Auf Grund der Analyse seines Sedimentationsverhaltens in der Ultrazentrifuge besitzt er ein etwa doppelt so hohes Molekulargewicht wie Laccase I.

Die genannten vorläufigen Befunde ließen auf eine oligomere Struktur der Laccase I schließen. Gezielte Spaltungsversuche sollten eine Klärung dieser Annahme bringen.

In Fig. 10 ist die Einwirkung von Temperatur, Dialyse und pH-Wert auf das Sedimentationsverhalten der Laccase I gezeigt. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es unter den angegebenen Versuchsbedingungen zwar zu Konformationsänderungen, Denaturierung und auch Spaltung kommt, die auftretenden Spaltprodukte sind jedoch wenig definiert.

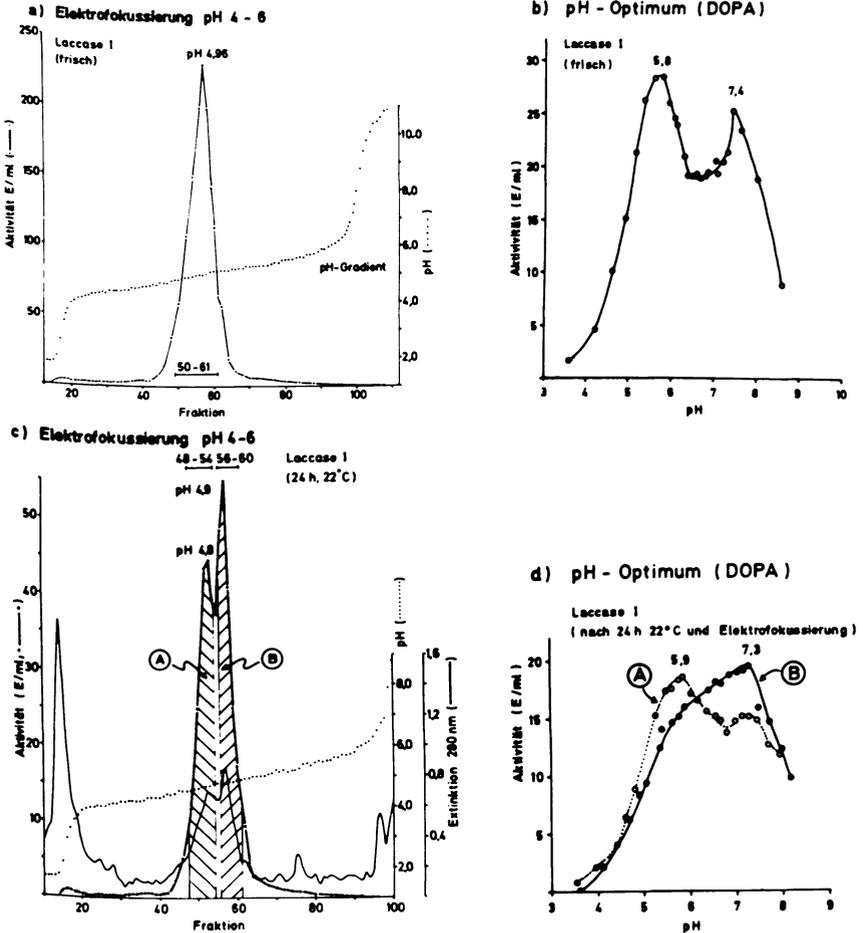


Fig. 8

Verhalten der Laccase I in der isoelektrischen Fokussierung vor und nach eintägiger Inkubation bei 22°C.

- a) Isoelektrische Fokussierung frischer Laccase I im pH-Gradienten 4-6, 1 Gipfel mit einem IEP bei pH 4,96.
- b) pH-Optimum frischer Laccase I in Britton-Robinson II-Puffer mit DOPA. Doppelloptimum bei pH 5,8 und 7,4.
- c) Material von a) nach 24-stündiger Inkubation bei 22°C und isoelektrischer Fokussierung im pH-Gradienten 4-6. 2 unvollständig getrennte Gipfel, A (IEP pH 4,8) und B (IEP pH 4,9).
- d) pH-Optimum (Britton-Robinson II-Puffer, DOPA) von Gipfel A und B aus c). Gipfel A zeigt ein Hauptoptimum bei pH 5,9, ein Nebenoptimum bei pH 7,3; Gipfel B zeigt ein Optimum bei pH 7,3 und eine Schulter bei pH 5,9.

SEPHAROSE 6B

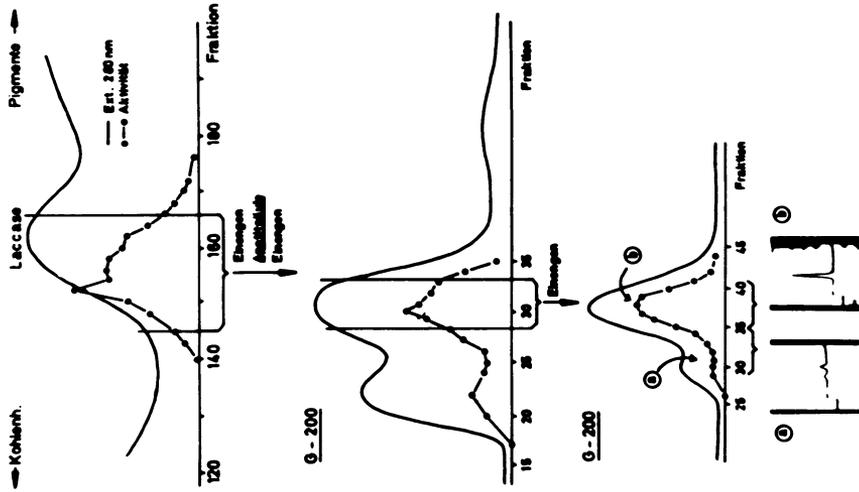


Fig. 9

Konzentrationsabhängige Aggregation der Laccase I zu ihrem Dimeren (Teil der in Molitoris und Esser, 1970, beschriebenen Reinigung). Einzelschritte:

1. Gelfiltration an Sepharose 6 B (5 x 106 cm, 0,02 Phosphatpuffer, pH 6,0).
2. Einengen des Laccase I-Hauptgipfels auf 7 mg/ml Protein durch Druckdialyse (N₂-Gas).
3. Apatichromatographie (3 x 10 cm, stufenweise Elution mit Phosphatpuffer, pH 6,0, von 0,02 M, 0,15 M, 0,5 M).
4. Der mit 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,0, eluierte Hauptgipfel wurde in der Kollodiumhülse auf 150 mg/ml eingengt.
5. 1. Gelchromatographie an Sephadex G-200 (2,5 x 91 cm, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0).
6. Der enggeschnittene Hauptgipfel (homogen nach Ultrazentrifugation) wurde in der Kollodiumhülse auf 35 mg/ml eingengt.
7. 2. Gelchromatographie an Sephadex G-200 (2,5 x 91 cm, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0; verändertes Fraktionsvolumen).
8. Vorgipfel (a) und Hauptgipfel (b) wurden in der analytischen Ultrazentrifuge auf ihr Sedimentationsverhalten untersucht (60.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle, 70° Schlierenwinkel, Aufnahmen 16 min nach Erreichen der Endgeschwindigkeit). Die Molekulargewichte der beiden Sedimentationsgipfel (berechnet nach Scheraga und Mandelkern, 1953) verhalten sich wie 2:1, wobei der Sedimentationskoeffizient des langsameren Gipfels (S_{20,w}) = 13,05 x 10⁻¹³ sec dem der Laccase I entspricht. Sedimentation von links nach rechts.

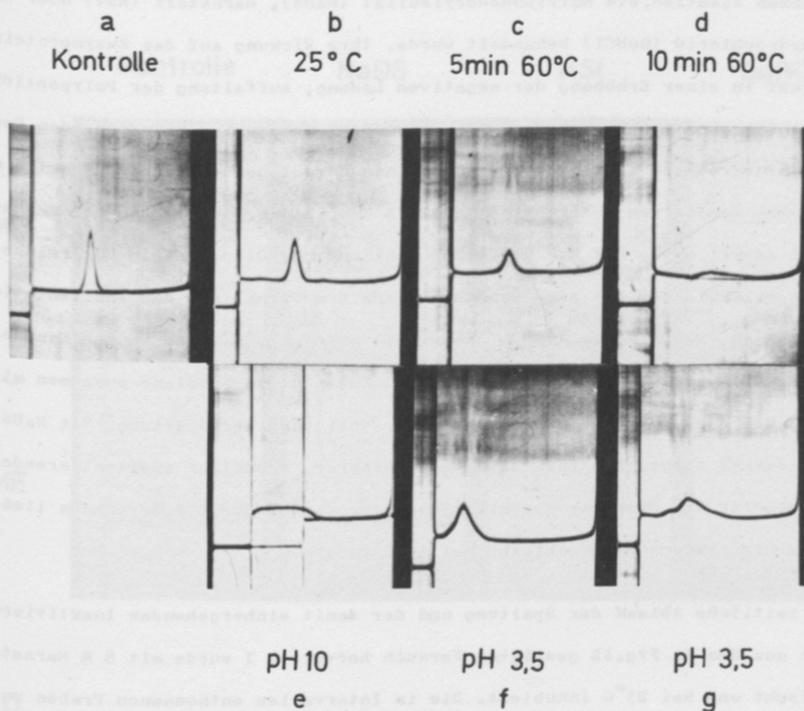


Fig.10

Einwirkung von Temperatur, Dialyse und pH-Wert auf das Sedimentationsverhalten der Laccase I.

Laufbedingungen: 60.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle, 70° Schlierenwinkel, Aufnahmen 16 min nach Erreichen der Endgeschwindigkeit. Laccasekonzentration jeweils 5 mg/ml in 0,1 M Ammonacetat-Puffer, pH 5,0. Sedimentationsrichtung von links nach rechts.

- a) Kontrolle;
- b) nach Dialyse, 15 h, 25°C, gegen 0,1 M Ammonacetat-Puffer, pH 5,0;
- c) nach Vorinkubation, 5 min bei 60°C;
- d) nach Vorinkubation, 10 min bei 60°C;
- e) nach Dialyse, 15 h, 25°C, gegen 0,1 M Ammonacetat-Puffer, pH 10,0;
- f) nach Dialyse, 15 h, 25°C, gegen 0,1 M Ammonacetat-Puffer, pH 3,5;
- g) wie f), jedoch Aufnahme 32 min nach Erreichen der Endgeschwindigkeit.

Demgegenüber wurden definierte Spaltprodukte erhalten, wenn L I mit dissoziierenden Agentien, wie Natriumdodecylsulfat (NaDS), Harnstoff (HST) oder Guanidinhydrochlorid (GuHCl) behandelt wurde. Ihre Wirkung auf das Enzymprotein besteht in einer Erhöhung der negativen Ladung, Auffaltung der Polypeptidkette und Aufbrechen von Disulfidbrücken, besonders wenn unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wird. Das Ergebnis eines derartigen Versuches, jeweils mit und ohne Zusatz von β -Mercaptoäthanol (β -ME), ist in Fig. 11 gezeigt. Demnach kommt es mit NaDS, HST und GuHCl zur Spaltung des Oligomers in Untereinheiten, deren Molekulargewicht nach Berechnung aus dem Verhältnis der Sedimentationskonstanten etwa $1/4$ des Ausgangsmaterials ausmacht. Während in der Kontrolle der Zusatz von β -ME keine Wirkung zeigt, führt diese Substanz zusammen mit NaDS, HST oder GuHCl zu schnellerer bzw. vollständiger Spaltung. Mit NaDS ohne β -ME-Zusatz zeigt sich zusätzlich ein weiterer, schneller sedimentierender Gipfel, für den sich das doppelte Molekulargewicht der L I errechnen ließ. Diese Dimerisierung unterbleibt bei β -ME-Zusatz.

Der zeitliche Ablauf der Spaltung und der damit einhergehenden Inaktivierung geht aus dem in Fig. 12 gezeigten Versuch hervor. L I wurde mit 8 M Harnstoff gemischt und bei 25°C inkubiert. Die in Intervallen entnommenen Proben wurden auf Aktivität und ihr Verhalten in der Disc-Elektrophorese, Immunelektrophorese und Ultrazentrifuge untersucht. Die Abbildung zeigt, daß es zu schneller Inaktivierung mit gleichlaufender Spaltung kommt, wobei auch die blaue Farbe des nativen Enzyms verlorengeht. Während der L I-Gipfel verschwindet, treten 2 neue, langsamer sedimentierende Komponenten auf, deren Molekulargewicht (nach der SCHERAGA/MANDELKERN-Berechnung) bei $L I/2$ bzw. $L I/4$ liegt. In der Immunelektrophorese (L I reagiert nur mit Antienzym I und Antienzym III) tritt keine neue Komponente auf, die z.B. mit Antienzym II reagiert. Auch in der Discelektrophorese tritt bei den Spaltungsversuchen unter Abnahme der Intensität der anodisch wandernden L I Bande nur eine neue anodisch wandernde Bande

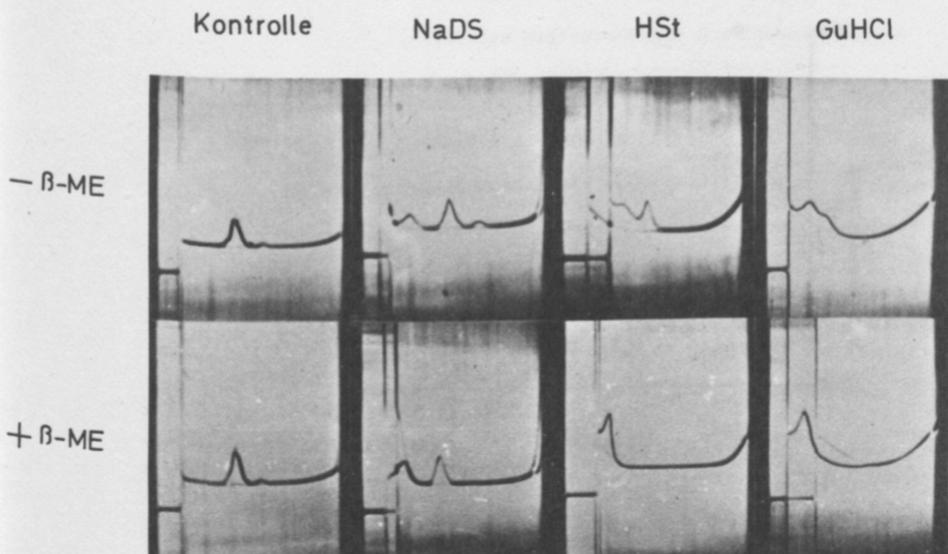


Fig.11

Wirkung 3stündiger Dialyse (25°C) gegen dissoziierende Agentien (mit oder ohne β-ME) auf das Sedimentationsverhalten der Laccase I. Laufbedingungen: 60.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle, 70° Schlierenwinkel, Aufnahmen 16 min nach Erreichen der Endgeschwindigkeit. Endkonzentrationen: Laccase: 4,5 mg/ml; β-ME: 1% ($1,28 \times 10^{-1} M$); NaDS: 1% ($3,4 \times 10^{-2} M$); HSt.: 6 M; GuHCl: 6 M; jeweils 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0. Sedimentationsrichtung von links nach rechts.

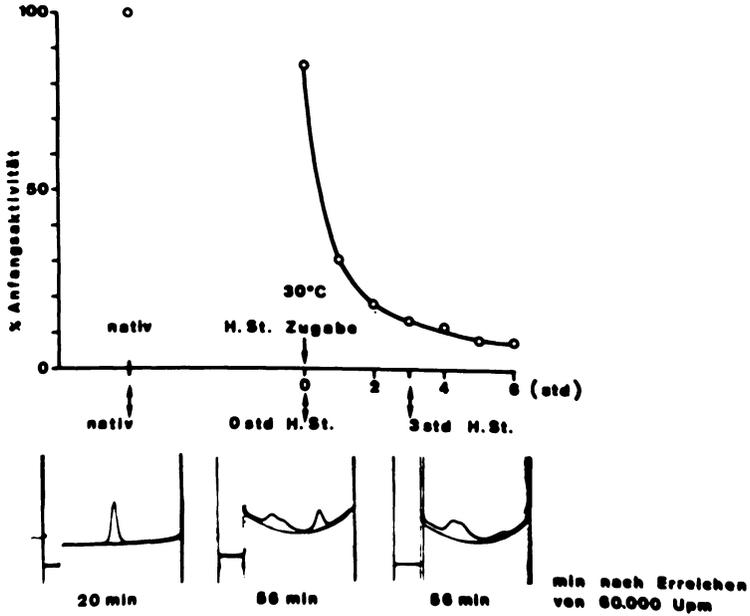


Fig.12

Zeitabhängigkeit der Inaktivierung und Dissoziation der Laccase I durch 8 M Harnstoff.

Konzentrationseinstellung durch Mischen der Komponenten.

Laccasekonzentration 7,7 mg/ml in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

Inkubation bei 30°C. Zu den angegebenen Zeiten Entnahmen für Aktivitätsbestimmung und Sedimentationsanalyse. (0.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle, 70° Schlierenwinkel; Aufnahmen zur angegebenen Zeit nach Erreichen der Endgeschwindigkeit; Sedimentationsrichtung von links nach rechts).

auf, deren R_f -Wert dem der L III entspricht. Wird im Anschluß an die Spaltung mit Harnstoff (6 h, 25°C) dieser durch Dialyse oder Gelfiltration entfernt, so kommt es nur zu geringfügiger Reaggregation, jedoch nicht zu einer Reaktivierung. Der Sedimentationskoeffizient des Spaltproduktes nach Gelfiltration entspricht einem Molekulargewicht von L I/4.

In einem weiteren gleichartigen Versuch mit 1 % NaDS anstelle von 8 M Harnstoff wurde zusätzlich die Temperaturabhängigkeit von Dissoziation und Inaktivierung geprüft. Fig.13 zeigt im Prinzip das gleiche Ergebnis wie der vorhergehende Versuch. Es kommt unter Verlust der blauen Farbe zur Spaltung in L I/4-Einheiten, die L I/2-Komponenten treten nicht auf. Dagegen tritt geringfügige Dimerisierung (schneller sedimentierender Gipfel) auf. Weiterhin zeigt der Versuch die Förderung von Dissoziation und Inaktivierung durch erhöhte Temperatur. Wird nach 27 h Inkubation mit NaDS das dissozzierende Agens durch Dialyse oder Gelfiltration entfernt, so kommt es, wie im Versuch mit 8 M Harnstoff, nur zu geringer Reaggregation und Reaktivierung.

Deshalb sollte die Frage der Reaktivierung und Reaggregation bei Anwendung milderer Spaltungsbedingungen (kürzere Inkubationszeit und Dialyse gegen NaDS anstelle direkten Mischens) geprüft werden.

Wie aus Fig.14 hervorgeht, ist nach 3-stündiger Inkubation etwa die Hälfte der L I dissoziiert, entsprechend sank die Aktivität auf etwa die Hälfte ab. Wurde anschließend das dissozzierende Agens durch 20-stündige Dialyse bei 4°C gegen Puffer entfernt, so zeigt das Sedimentationsbild fast völlige Reaggregation. Das Enzym wurde dabei völlig reaktiviert, die blaue Farbe der nativen Laccase I kehrte zurück.

Werden die Dissoziationsprodukte der L I nach NaDS-Behandlung nicht wie in den bisher beschriebenen Versuchen durch Ultrazentrifugation oder Gelchromatographie, sondern elektrophoretisch nach der Methode von SHAPIRO et al. (1967)

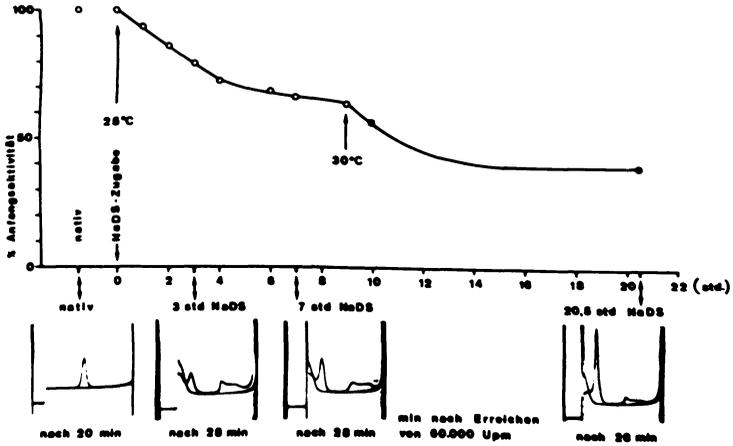


Fig.13

Zeit und Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung und Dissoziation der Laccase I durch 1 % NaDS.

Konzentrationseinstellung durch Mischen der Komponenten.

Laccasekonzentration 9,2 mg/ml in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0.

Inkubation zunächst bei 25°C, später (Pfeil) bei 30°C. Zu den angegebenen Zeiten Entnahmen für Aktivitätsbestimmung und Sedimentationsanalyse. (60.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle, 70° Schlierenwinkel; Aufnahmen zur angegebenen Zeit nach Erreichen der Endgeschwindigkeit; Sedimentationsrichtung von links nach rechts).

Sedimentation →	Behandlung	Aktivität (E/ml)
	Ausgangsmaterial Phosphatpuffer 0.1 M/pH 6.0	1016
	nach Dialyse 3h. 25°C 1% NaDS in Phosphatpuffer 0.1 M/pH 6.0	624
	nach Dialyse 20h. 4°C Phosphatpuffer 0.1 M/pH 6.0	1032

Fig.14

Reversible Spaltung und Inaktivierung der Laccase durch NaDS.

Konzentrationseinstellung durch Dialyse.

Sedimentationsanalyse: 60.000 Upm, 20°C, 2° Alu-Doppelsektorzelle,

70° Schlicrenwinkel, Aufnahmen 20 min nach Erreichen der Endgeschwindigkeit, Sedimentationsrichtung von links nach rechts.

getrennt, so treten noch kleinere Untereinheiten der L I auf. Dies ist in Fig. 15 gezeigt. Die Hauptkomponente der L I hat danach ein MG von ca. 98.000. Wird jedoch während der Dissoziation β -ME zugesetzt, so führt das zum Auftreten noch kleinerer Komponenten, wobei besonders eine starke Bande mit einem MG von ca. 70.000 auffällt. Dieser spaltungsfördernde Effekt von β -ME wurde vielfach beschrieben und von SUNG et al. (1967) am Beispiel der Katalase und von KASPER (1967) bei Coeruloplasmin gezeigt.

Nach diesen Versuchen stellt L I ein Oligomer dar, das sowohl reversible Dissoziation und Inaktivierung zeigt als auch zu höheren Formen aggregieren kann. Die Lage des Gleichgewichtes der verschiedenen Aggregationszustände hängt u.a. ab von Temperatur, Proteinkonzentration sowie Art und Konzentration der dissoziierenden Agentien. Die Reaktivierbarkeit und die dabei beobachtete Rückkehr der typischen Absorption zeigen weiterhin, daß zumindest unter diesen Bedingungen das gebundene Kupfer nicht abdissoziiert.

Konzentrationsabhängigkeit des Gleichgewichtes multipler Enzymformen wurde bereits von FLING et al. (1963) und JOLLEY et al. (1969) bei Tyrosinase beobachtet. Dissoziation und Aggregation in Abhängigkeit von Art und Konzentration des dissoziierenden Agens wurden ebenfalls bereits für Kupferenzyme beschrieben (BUTZOW, 1968, bei Polyporus-Laccase; SIMONS and BEARN, 1969, bei Coeruloplasmin; WESER et al., 1971, bei Erythrocytorein). Daß die durch Harnstoff bewirkte Auffaltung der Polypeptidkette über stabile Zwischenstufen verlaufen kann, wurde verschiedentlich beobachtet (TANFORD, 1964; OLESEN and PETERSEN, 1966; MARCHESI et al., 1969). Dies könnte das Auftreten von L I/2-Einheiten bei der Dissoziation durch Harnstoff erklären. Die fehlende Reaktivierbarkeit der L I nach Harnstoffbehandlung deckt sich mit Befunden von MALMSTROM und VÄNNGÅRD (1960), nach denen durch Harnstoff eine spezifische Bindungsstelle des Kupfers denaturiert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Laccase offenbar aus 4 (oder 5) Untereinheiten aufgebaut ist, die im nativen Enzym nichtkovalent verbunden sind.

Da L I 74 Cys-SH pro Molekül enthält und im nativen Enzym keine freien SH-Gruppen nachweisbar sind, müssen entweder maskierte SH-Gruppen (vergl. BUTZOW, 1968, bei Polyporus-Laccase) oder eine Reihe intramolekularer Disulfidbrücken vorhanden sein. Für eine Zahl von 4 Untereinheiten spricht neben der Tatsache,

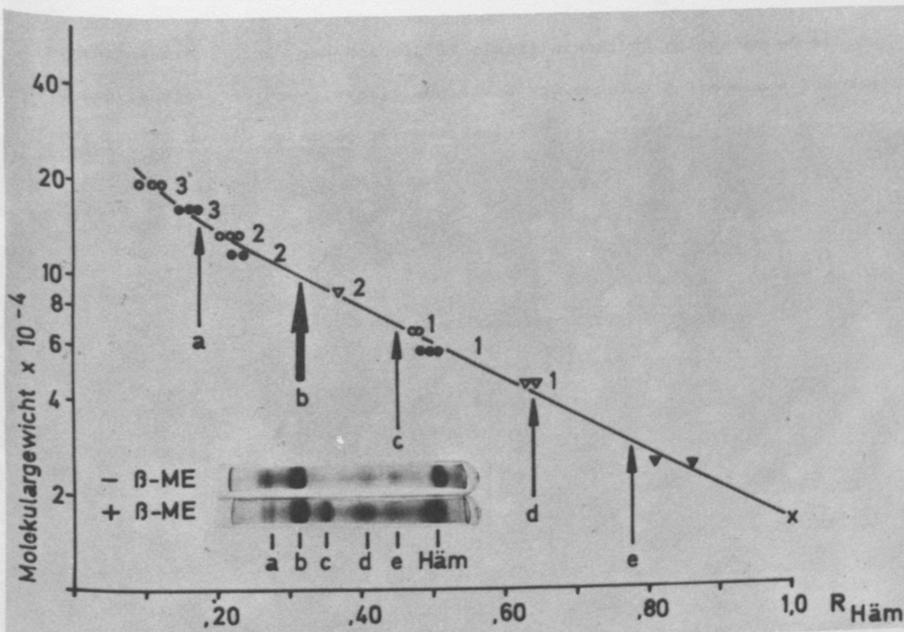


Fig.15

NaDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Laccase I mit und ohne β -ME.

Versuchsbedingungen: Vorinkubation: 3h, 37°C, 1% NaDS \pm 1% β -ME.

Dialyse: 16 h, 4°C, 0,1 % NaDS \pm 0,1 % β -ME.

Vorlauf der Gele 1h bei 4 mA/Röhrchen zur Entfernung oxydierender Substanzen.

Elektrophorese in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,1, mit 0,1% NaDS bei 6 mA/Röhrchen. Proteinfärbung mit Coumassie-Blau.

Diagramm: Auftragung der Wanderungsstrecke gegen das Molekulargewicht.

Eichproteine (Boehringer, Mannheim):

x = Hämoglobin als Bezugssubstanz (MG Tetramer = 64.000)

▼ = Chymotrypsinogen (MG = 25.000)

▽ = Ovalbumin (MG = 45.000)

● = Rinderserumalbumin (MG Monomer = 67.000)

o = Katalase (MG Dimer = 230.000)

Die Ziffern 1,2,3 hinter den Zeichen für die verschiedenen Proteine bedeuten Mono-, Di- bzw. Trimer.

a, b, c, d, e bezeichnen die bei der Spaltung der Laccase I auftretenden Banden, wie sie aus der Abbildung entsprechender Elektropherogramme (mit und ohne Zusatz von β -ME) ersichtlich sind.

daß die beobachteten Sedimentationskoeffizienten der Dissoziationsprodukte eher auf 4 als auf 5 Untereinheiten schließen lassen, auch der Befund, daß bisher nur sehr wenige Oligomere mit Pentamerstruktur gefunden wurden (KLOTZ and LANGERMAN, 1970; DARNALL and KLOTZ, 1972).

2) Elektronenmikroskopie

Um die Zahl der Untereinheiten der Laccase I festzustellen, sollte die Struktur der Laccase I mit dem Elektronenmikroskop untersucht werden. Eine überschlägige Berechnung ergab, daß Laccase I mit einem Molekulargewicht von ca. 400.000 einen Moleküldurchmesser von 10 - 15 nm aufweisen dürfte. Da im Elektronenmikroskop nach dem Negativkontrastverfahren eine Auflösung von 2 - 3 nm erreicht wird, sollte die Laccase I möglicherweise bis in ihre Substruktur darstellbar sein.

Die nächste Abbildung (Fig.16) zeigt typische Laccase I Moleküle bei pH 6,0. Sie erscheinen als Tetramere mit mehr oder weniger deutlich sichtbarer Substruktur, wie aus den Ausschnitten A, B und C hervorgeht. Die elliptischen Untereinheiten sind dabei zu Rechtecken angeordnet. Ihre Dimensionen wurden nach Auswertung der Negativkontrastaufnahmen und nach Platinbedampfung zu 6,7 x 4,3 x 5,4 nm ermittelt. Auf Grund dieser Befunde können bereits Schlüsse auf den Aufbau des Tetramers gezogen werden.

Fig.17 zeigt in Modellform die Möglichkeiten der Bildung von Tetrameren aus Monomeren:

- a) 2 x 2 Monomere aggregieren zu Dimeren und diese wiederum zu einem Tetraeder mit D_2 -Symmetrie (3 Bindungstypen, 0 Bindungsstellen). Bei einem Zerfall dieses Tetramers wären stabile Dimere neben Monomeren zu erwarten.
- b) 4 Monomere aggregieren über eine dimere Zwischenstufe zu einem Tetramer, das als flaches Rechteck erscheint (2 Bindungstypen, 4 Bindungsstellen).
- c) 4 Monomere aggregieren direkt, ohne Zwischenstufen, zu einem Tetramer in Form eines flachen Rechteckes. Bei identischen Untereinheiten (1 Bindungs-

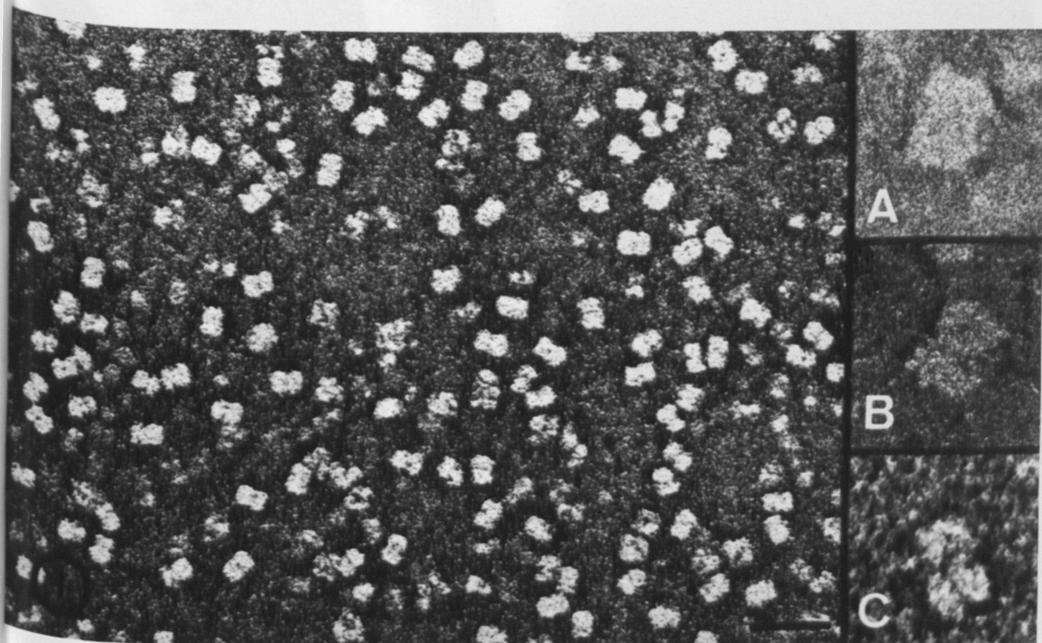


Fig.16

Typische Erscheinungsform der Laccase I im Elektronenmikroskop.

Die Moleküle erscheinen hauptsächlich als Rechtecke. Die Ausschnitte A, B und C zeigen Partikel bei stärkerer Vergrößerung mit verschieden deutlich ausgeprägter Substruktur. Negativ-Kontrastverfahren mit 1.0% Uranylloxalat, pH 6,6; Sprühmethode; der Eichstrich entspricht 50 nm.

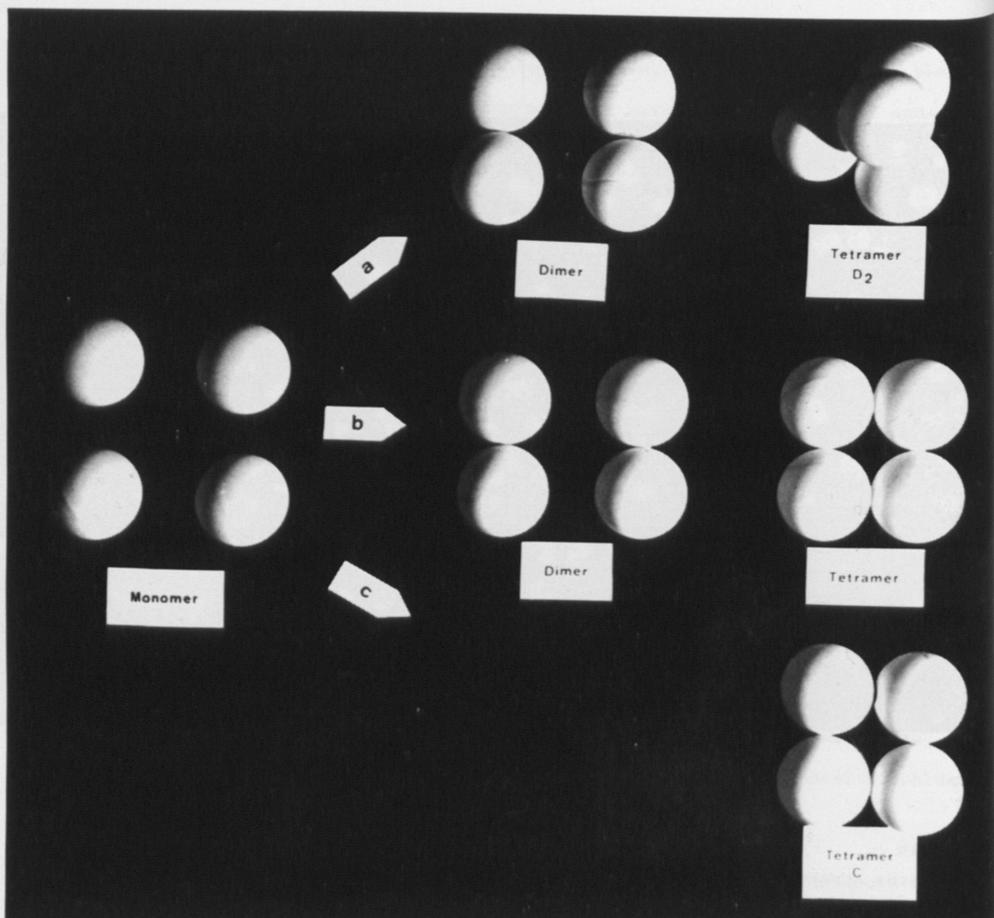


Fig.17

Modell zur Tetramerbildung.

- a) 4 Protomere \longrightarrow 2 Dimere \longrightarrow Tetramer mit Tetraederform
(D_2 = diedrische Symmetrie).
- b) 4 Protomere \longrightarrow 2 Dimere \longrightarrow Tetramer, flaches Rechteck.
- c) 4 Protomere \longrightarrow Tetramer, flaches Rechteck (C_4 , zyklische
Symmetrie, bei 4 identischen Untereinheiten: C_4 -Symmetrie).

typ, 4 identische Bindungsstellen) würde zyklische (C_4) Symmetrie vorliegen.

Die gezeigten Aufnahmen der Laccase I bei neutralem pH deuten auf eine planare Anordnung der 4 Protomere in einem rechteckigen Tetramer hin.

Wurde der pH bei der Präparation der Laccase I auf 4,2 abgesenkt (Fig.18), so erscheinen die Laccase I Moleküle als lineare Aggregate, die im zweidimensionalen Bild Ketten ähneln, deren Glieder aus Tetrameren zu bestehen scheinen.

Auch dieser Befund würde auf eine planare Anordnung der Laccase I Protomere im Tetramer als der Grundeinheit der Kette hindeuten, da eine tetraedische Anordnung (vergl. Abb.17a) nicht den beobachteten Kettentyp ergeben würde.

Die elektronenmikroskopischen Befunde erlauben jedoch im Zusammenhang mit der Bildung linearer Aggregate eine noch weitergehende Diskussion des innerhalb der Tetramere vorliegenden Bindungstyps.

Das 1.Modell hierzu (Fig.19a) zeigt die (nach der Terminologie von MONOD et al., 1965) heterologe Assoziation zweier Tetramere zu einem Oktamer. Durch entsprechende weitere schrittweise Anfügung von Tetrameren (Fig.19b) entstehen durch heterologe Assoziation unbegrenzte, lineare Aggregate, bei denen alle Tetramer/Tetramer-Bindungen gleichwertig sind. Oktamere sollten hierbei keine bevorzugte Zwischenstufe beim Auf- oder Abbau der linearen Aggregate darstellen.

Das 2.Modell (Fig.20a) zeigt isologe Assoziation zweier Tetramere zum Oktamer. Treten derartige Oktamere zu höheren Aggregaten zusammen, so kann dies wiederum nur über isologe Assoziation geschehen (Fig.20b). Aus dem Modell ist deutlich zu ersehen, daß zwei (isologe) Bindungstypen zwischen benachbarten Tetrameren existieren: Starke Bindung (weiß/weiß) innerhalb der einzelnen Oktamere und schwächere Bindungen (schwarz/schwarz) zwischen den einzelnen Oktameren, die die Kette aufbauen. Im zuletzt geschilderten Fall sollte man beim Ketten-



Fig.18

Typische Erscheinungsform der Laccase I bei pH 4,2 im elektronenmikroskopischen Bild. Die Moleküle treten in kettenförmigen linearen Aggregaten auf, die aus Tetrameren zusammengesetzt erscheinen. Negativ-Kontrastverfahren mit 1 % Uranylacetat, pH 4,2, Sprühmethode.

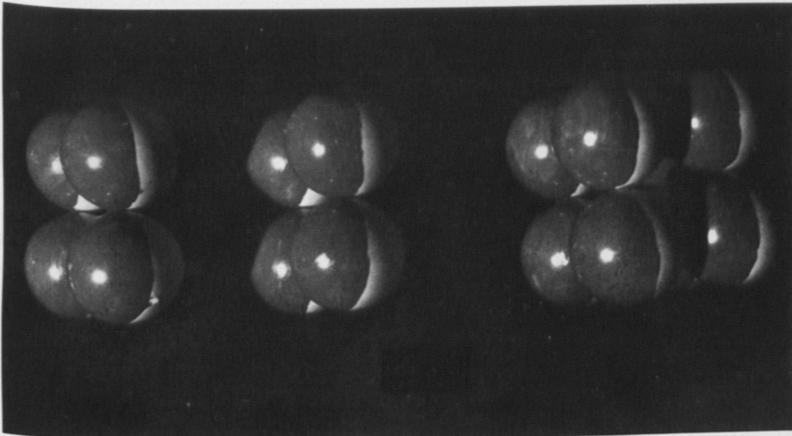


Fig.19 a

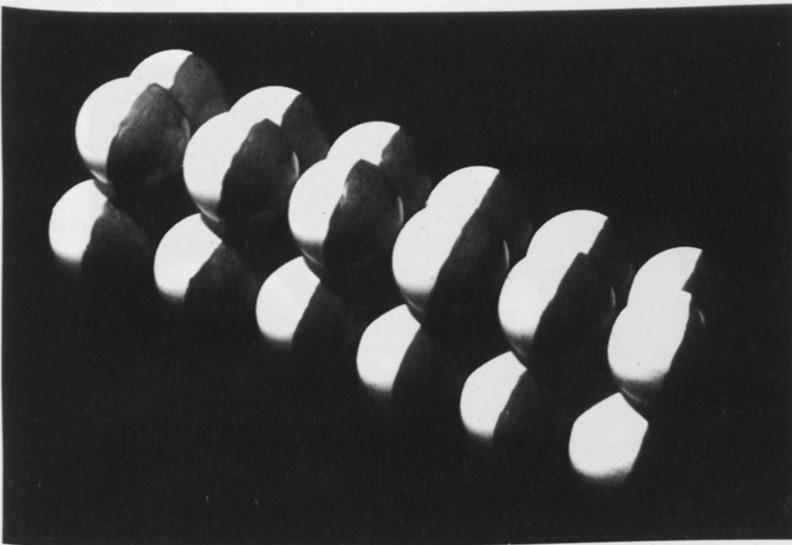


Fig.19 b

Fig.19

1. Modell der Bildung linearer Aggregate aus Tetrameren.

a) Heterologe Assoziation zweier Tetramere zum Oktamer;

b) durch weitere schrittweise heterologe Assoziation

Bildung unbegrenzt langer linearer Aggregate.

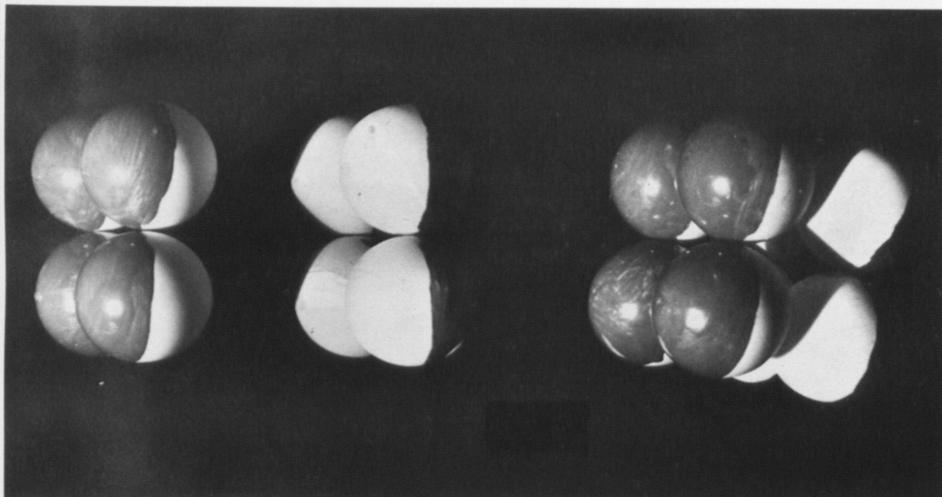


Fig. 19

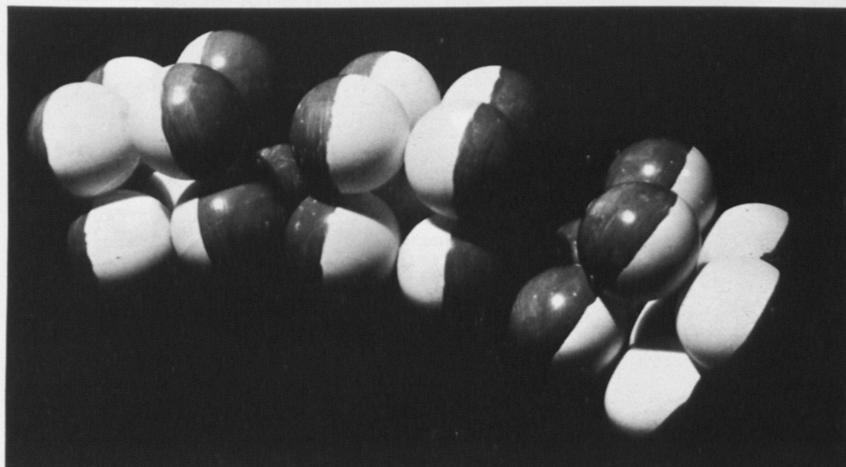


Fig. 20

Fig.20

2. Modell der Bildung linearer Aggregate aus Tetrameren.

a) Isologe Assoziation zweier Tetramere zum Oktamer (starke Bindung);

b) durch isologe Assoziation (schwache Bindung) dieser Oktamere Bildung unbegrenzt langer linearer Aggregate (die aus Oktameren aufgebaut sind und in diese zerfallen können).

Auf- und Abbau je nach Versuchsbedingungen stabile Oktamere und stabile Tetramere erwarten.

Betrachtet man die in Fig.16 gezeigte kettenförmige Struktur der Laccase I bei niedrigem pH, so scheint das zweite der diskutierten Modelle zuzutreffen (isologe Assoziation von Tetrameren zu Oktameren entsprechend Fig.20a,b). Dafür spricht auch, daß unter entsprechenden Versuchsbedingungen sowohl stabile Tetramere (= L I) als auch stabile Oktamere (= Dimer der L I) auftreten (siehe Fig.9, 11, 13, 14).

Auf Grund der soeben diskutierten Modellvorstellung können die elektronenmikroskopisch beobachteten Strukturen und Dimensionen nach dem in Fig.21 dargestellten Schema interpretiert werden: Bei neutralem pH (Fig.21a) liegt Laccase I in Form von Tetrameren vor, bei saurem pH treten kettenförmige Aggregate (Fig.21b) auf. Diese Anordnung kann als Aggregation einzelner planarer Tetramere, Fläche zu Fläche, erklärt werden unter Bildung von Oktameren, die wiederum die Einzelbausteine längerer Ketten repräsentieren. "a-a" sind dabei die starken isologen Bindungen, die je 2 Tetramere zum Oktamer verbinden, "b-b" die schwächeren isologen Bindungen, die die Oktamere zur Kette verknüpfen.

Während der Präparation der Laccase I bei niedrigem pH erfolgt offensichtlich eine gewisse Schrumpfung oder Verzahnung der Moleküle, die sich in geringeren Dimensionen der "Kettenglieder" gegenüber den bei neutralem pH beobachteten Tetrameren äußert. Derartige Schrumpfungerscheinungen bei Proteinen während des Präparations- und Trocknungsprozesses wurden auch von GREGORY (1968) und HASCHMEYER (1970) beschrieben.

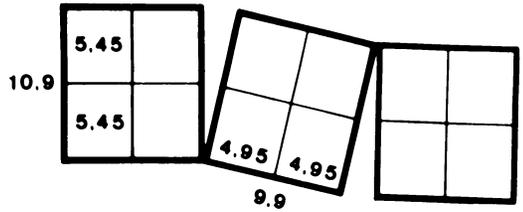
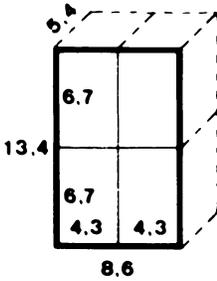
Nach den elektronenmikroskopischen Befunden kann es als gesichert gelten, daß Laccase I ein Tetramer aus 4 morphologisch identischen, elliptischen Untereinheiten darstellt, die in den Ecken eines flachen Tetramers angeordnet erscheinen. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den bereits diskutierten Dissoziationerscheinungen überein und bestätigt den allgemein erhobenen Befund, daß Oligomere meist geradzahlig sind.

Anordnung der Laccase I-Untereinheiten

Beobachtete Dimensionen (nm)

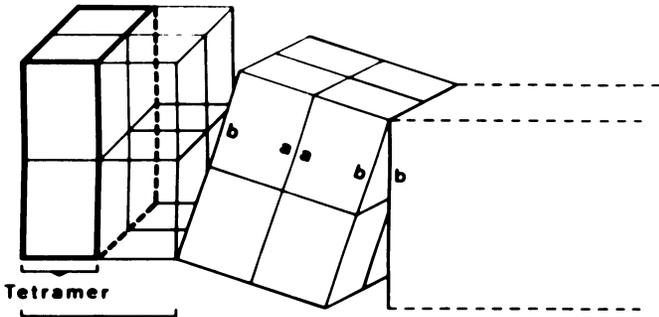
a) Tetramere (pH 7)

b) Ketten (pH 4.2)



Mögliche Struktur der Ketten:

Aggregation von Oktameren (bestehend aus je 2 flachen Tetrameren, Fläche zu Fläche)



Oktamere Kettengrundeinheit

Fig. 21

Modellvorstellung zur Interpretation der multiplen Formen der Laccase I auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde. Die Partikeldimensionen sind in nm angegeben. "a" und "b" entspricht isologen Bindungen verschiedener Stärke.

Elektronenmikroskopische Bestätigung von Strukturuntersuchungen bei anderen Enzymen sind zwar noch relativ selten, doch gibt es bereits Berichte über flache Tetramere mit D_2 oder C_4 Symmetrie (Pyruvatcarboxylase: VALENTINE et al., 1960; Tryptophanase: MORINO and SNELL, 1967; β -Galactosidase: MARCHESI et al., 1969). Ob es sich beim Laccase I-Tetramer um zyklische oder diedrische Symmetrie handelt, kann auf Grund der bis jetzt vorliegenden Daten noch nicht entschieden werden. Aggregation von Proteinen zu elektronenmikroskopisch darstellbaren linearen Aggregaten wurde von TRIP und VAN BRUGGEN (1972) für Coeruloplasmin und von VALENTINE et al. (1968) für Glutaminsynthetase gezeigt. Konzentrationsabhängige Selbstassoziation von β -Lactoglobulinmolekülen fanden ADAMS und LEWIS (1968). WILK et al. (1969) konnten an Schafhirn-Glutaminsynthetase wahrscheinlich machen, daß die heterolog aufgebauten Tetramere durch schwächere isologe Bindungen zu Oktameren vereinigt sind, ähnlich den für die Laccase postulierten schwächeren isologen Bindungen, die die Oktamere zur Kette verbinden.

VI. Vergleichende Analyse der Laccasen I, II und III

Nachdem die tetramere Struktur der Laccase I aufgezeigt werden konnte, stellte sich naturgemäß als nächstes die Frage nach der Identität ihrer Untereinheiten und eventueller verwandtschaftlicher Beziehungen zu Laccase II und III. Eines der wichtigsten Kriterien ist dabei das Molekulargewicht (Tab. 6).

Aus hydrodynamischen Bestimmungen wurde für Laccase I ein Molekulargewicht zwischen 380.000 und 390.000 (MOLITORIS und ESSER, 1970) und für Laccase II und III von 70.000 bzw. 80.000 gefunden (ESSER und MINUTH, 1970).

Die aus den elektronenmikroskopischen Moleküldimensionen errechneten Molekulargewichte können nur Anhaltspunkte geben, obwohl sie in unserem Falle erstaunlich gut mit den nach anderen Methoden erhaltenen Werten übereinstimmen. Sie sollen dennoch bei der Ermittlung des "wahren" Molekulargewichtes unberücksichtigt bleiben.

Die mit NaDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmten Molekulargewichte liegen bei allen drei Laccasen an der oberen Grenze der gefundenen Werte. Im Fall der Laccase III gibt diese Methode mit 87.000 als einzige einen Wert, der deutlich über den anderen Bestimmungen liegt, die alle Werte zwischen 76.000 und 82.000 ergeben. Der prozentuale Unterschied zwischen den Extremwerten liegt bei 13 % für Laccase III, bei 20 % für Laccase II und bei 15 %

Tab. 6 Molekulargewichtsbestimmungen der Laccasen I, II und III^{a)}

Methode	Laccase I		Lacc. II	Lacc. III	Literatur
	Tetramer	Monomer			
NaDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ^{b)}	<u>388.000</u>	<u>97.000</u>	<u>87.000</u>	<u>87.000</u>	diese Arbeit
EM-Dimensionen ^{c)}					
Rotationsellips.			<u>95.000</u>	<u>102.000</u>	Molitoris et al. 1972
Ellipsoid			<u>74.000</u>	<u>76.000</u>	Molitoris et al. 1972
UZ, Sedim./Diffus.	<u>390.000</u>	97.500		<u>82.000</u>	Molitoris u.Esser 1970; Esser u.Minuth 1970
Sedim.Gleichgew.	<u>383.000</u>	95.800	<u>71.000</u>	<u>78.000</u>	Molitoris u.Esser 1970; Esser u.Minuth 1970
Rückrechnung auf 4 g Atom Cu/Monomer	<u>341.000</u>	85.200	<u>84.700</u>	<u>81.600</u>	diese Arbeit
aus Aminosäuren u. Kohlenhydr.Zusamms.	<u>333.000</u>	83.300	<u>77.000</u>	<u>82.000</u>	diese Arbeit
Molekularsiebsäule			<u>70.000</u>	<u>79.500</u>	Esser u.Minuth 1970
arithmet.Mittel	367.000		78.000	82.000	
Mol.Gew.-Verhältn.			^I / _{II} = 4,7	^I / _{III} = 4,5	
% Unterschied zw. den Extremwerten	15 %		20 %	13 %	
wahrscheinl.Wert ^{d)}	ca. 340.000		80.000	82.000	
Mol.Gew.-Verhältn.			^I / _{II} = 4,25	^I / _{III} = 4,15	

a) Die direkt ermittelten Werte sind unterstrichen

b) Werte berechnet aus dem Versuch ohne Zusatz von β -ME

c) die aus den Dimensionen errechneten Werte gehen nicht in die Mittelwertberechnung ein

d) siehe Diskussion

für Laccase I. Schwierigkeiten ergaben sich bei der Molekulargewichtsbestimmung besonders für Laccase II wegen ihrer im Kohlenhydratanteil lokalisierten Mikroheterogenität (ESSER und MINUTH, 1971) und für Laccase I wegen ihrer Neigung zu Assoziation und Dissoziation. Bei beiden Laccasen läßt dies die auf hydrodynamischen Messungen beruhenden Molekulargewichte als weniger genau erscheinen. Daher sind hier die Werte aus der Molekulargewichtsrückrechnung auf den allgemein bei Laccasen gefundenen Kupfergehalt von 4 Kupferatomen pro Protomer und die Molekulargewichtswerte aus der Aminosäuren- und Kohlenhydratanalyse stärker zu gewichten. Auf Grund dieser Überlegungen sollte auch nicht der reine Mittelwert aller Bestimmungen als "wahres" Molekulargewicht angesehen werden. Dieses dürfte vielmehr für Laccase I bei 540.000, für Laccase II bei 80.000 und für Laccase III bei 82.000 liegen. Diese Werte entsprechen auch 10, 4 und 4 Kupferatomen pro Protomer und ergeben ein Molekulargewichtsverhältnis für L I / L II von 4,25 und für L I / L III von 4,14 entsprechend einem Aufbau der tetrameren Laccase I aus 4 Untereinheiten vom Molekulargewicht der "kleinen" Laccasen.

Bei einer vergleichenden Betrachtung mit anderen Laccasen (Tab.7) fiel besonders das hohe Molekulargewicht der Laccase I aus dem Rahmen der bisher untersuchten Laccasen. Nach Bestätigung ihrer Tetramerstruktur liegt ihr Molekulargewicht jedoch, auf das Protomer bezogen, mit ca. 85.000 in dem Bereich, der auch für andere Laccasen gefunden wird. Berücksichtigt man zudem noch den bei den verschiedenen Laccasen unterschiedlichen Zuckergehalt, so ergibt sich, wie aus Tabelle 7 hervorgeht, für alle Laccasen ein Molekulargewicht des Proteinanteils, das in dem engen Bereich zwischen 52.000 und 72.000 liegt. Die für Laccase gefundenen, sehr unterschiedlichen Molekulargewichte sind daher im wesentlichen auf Aggregationserscheinungen und unterschiedlichen Kohlenhydratgehalt zurückzuführen.

Daß höhermolekulare Laccasen vom Typ der Laccase I bei anderen Pilzen bisher nicht beschrieben wurden, mag zum Teil auch daran liegen, daß meist nur extra-

Tab.7 Molekulargewicht des Proteinanteils verschiedener Laccasen
(bezogen auf das Protomer)

Nr. a)	Enzym	Herkunft	MG x 10 ⁻³	KH (%TS)	MG Proteinant.
1	Laccase I	Podospora a.	340	22,2 ^{b)}	66.000
2	Laccase II	Podospora a.	80	23,8 ^{b)}	61.000
3	Laccase III	Podospora a.	82	22,9 ^{b)}	63.200
4	Laccase A	Polyporus v.	60	> 14	< 52.000
6	Laccase	Rhus v.	110	45	61.000
8	Laccase	Rhus v.	120-141	45	72.000 ^{c)}

a) Gleiche Numerierung wie in Tabelle 2

b) Mittelwerte der verschiedenen quantitativen Bestimmungen

c) Mittelwert

zelluläre Laccase untersucht wurden, während Laccase I, II und III direkt aus dem Myzel gewonnen wurden. Aus den Untersuchungen von MOLITORIS und ESSER (1970) über die Synthese der intra- und extrazellulären Laccasen bei Podospora anserina geht hervor, daß die extrazellulären Laccasen im Medium erst auftreten, wenn die intrazelluläre hochmolekulare Laccase I zerfällt. Diese Zerfallsprodukte (Laccase II und III?) werden ausgeschieden und dürften den Großteil der im Kulturfiltrat gefundenen Laccasen ausmachen (MOLITORIS, unveröffentlicht).

In Tabelle 8 sind eine Reihe von Eigenschaften aufgeführt, in denen sich die drei Laccasen von Podospora unterscheiden. Diese Unterschiede bestätigen einerseits, daß es sich tatsächlich um verschiedene eigenständige Enzyme handelt. Andererseits wären diese Unterschiede durch die Annahme zu erklären, daß Laccase I aufgebaut ist aus 4 Untereinheiten gleich oder ähnlich der Laccase II und/oder Laccase III.

Fig. 22 zeigt zusammenfassend den mit dieser Hypothese übereinstimmenden elektronenmikroskopischen Befund, nach dem Laccase I ein Tetramer darstellt, dessen Untereinheiten in Form und Dimension den monomeren Laccasen II und III gleichen (MOLITORIS et al., 1972). Auch die Tatsache, daß nur Laccase I, nicht aber Laccase II und III (MINUTH, unveröffentl.) in definierte Untereinheiten dissoziieren, stützt diese Hypothese. Das für Laccase I beobachtete doppelte pH-Optimum ließe sich aus einer Zusammensetzung der Laccase I, Laccase II und Laccase III erklären; die Daten der Hitzeinaktivierung (vergl. auch die im Abschnitt Dissoziation diskutierten Befunde) ließen sich als Zerfall eines hitzelabilen Oligomers in hitzestabile Untereinheiten interpretieren, wie es HOROWITZ und FLING (1950) für die Tyrosinase von Neurospora crassa zeigen konnten. Die erhöhte spezifische Aktivität des Tetramers kann durch einen kooperativen Effekt erklärt werden, auf den noch später zurückzukommen sein wird.

Bei der isoelektrischen Fokussierung auf der Säule im Ampholine-pH-Gradienten zeigen alle drei Laccasen von Podospora nur je 1 Gipfel, der für Laccase I bei pH 4,9 zwischen dem breiten Gipfel der Laccase II (pH 7-10, Mikroheterogenität, siehe auch ESSER und MINUTH, 1971) und dem der Laccase III bei pH

Tab. 8 Eigenschaften der Laccasen I, II und III

Eigenschaft	Laccase I	Laccase II	Laccase III	Literatur
1) g Atom Cu/Molekül	16	4	4	diese Arbeit; Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
2) Molekulargewicht $\times 10^{-3}$	340	80	82	diese Arbeit
3) Dimensionen der Laccasen (nm) des Protomers (nm)	13,4x8,6 6,7x4,3	6,8x5,5	7,0x5,8	Molitoris et al. 1972
4) Dissoziation in definierte Untereinheiten	+	-	-	diese Arbeit; Minuth unveröff.
5) pH-Optimum (DOPA)	7,5u.6,0	7,5	6,0	Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
6) Hitzeinaktivierung (Halbwertszeit bei 60° C in Min.)	5	60	110	Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
7) spA (E/mg Prot.)	160	40	30	Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
8) IEP (präparative Säule) Bandenzahl/pH	1/4,9	1/7-10	1/4,0	Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
9) IEP (Polyacrylamidgel-Elektro- fok.) Bandenzahl/pH	4/4,7-5,2	7/7-10	2/4,0-5,2	diese Arbeit; Minuth, unveröffentl.
10) Elektrophoret. Beweglichkeit	anod.	kathod.	anod.	Molitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
11) Substratspezifität (substit. Phenole)	o-, p-	o-, m-, p-	o-, m-, p-	Schanel and Esser 1971
12) Aminosäurenanalyse	keine Ubereinstimmung			diese Arbeit; Minuth, unveröff.

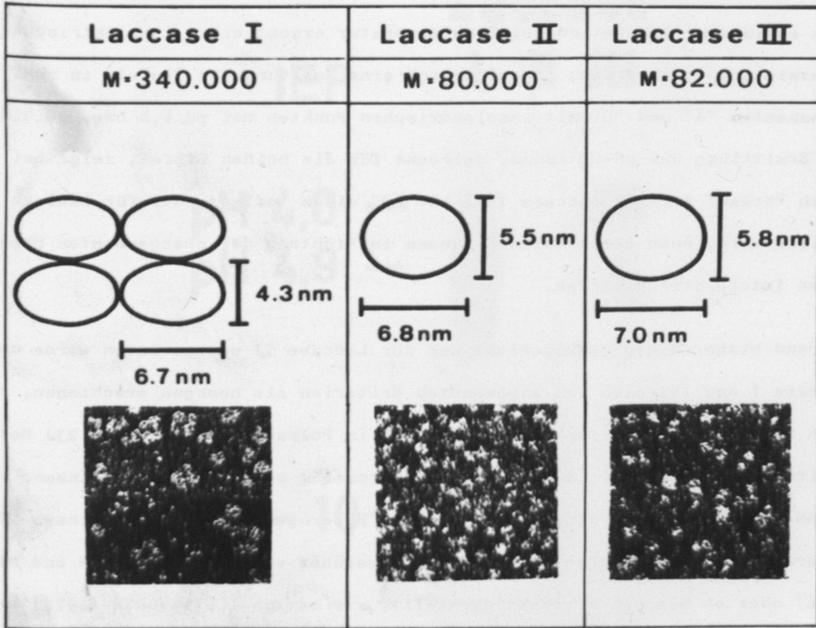


Fig.22

Form und Dimensionen der Laccasen I, II und III auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde (Erläuterung siehe Text).

4,0 liegt. In Fig.8a ist eine isoelektrische Fokussierung für frische Laccase I gezeigt. Das mit dem gleichen Material gemessene pH-Optimum zeigt den bereits erwähnten typischen Doppelgipfel (Fig.8b). Wird diese Laccase jedoch nach eintägiger Inkubation bei Raumtemperatur erneut einer isoelektrischen Fokussierung unterworfen, so zeigt sich eine Spaltung des Gipfels in zwei Komponenten "A" und "B" mit isoelektrischen Punkten bei pH 4,8 bzw. pH 4,9. Die Ermittlung des pH-Optimums, getrennt für die beiden Gipfel, zeigt bei "A" einen Verlauf der für Laccase III, bei "B" einen Verlauf, der für Laccase II typisch wäre. Auch diese Befunde können in Richtung der obengenannten Hypothese interpretiert werden.

Während bisher Mikroheterogenität nur für Laccase II nachgewiesen wurde und Laccase I und III nach den angewandten Kriterien als homogen erschienen, zeigt sich bei der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgel (Fig.23) Heterogenität bei allen drei Laccasen, wobei Laccase I und III eine gemeinsame Bande im pH-Bereich von 5,2 aufweisen. Ob diese Heterogenität wie bei Laccase II auf Unterschiede im Kohlenhydratanteil zurückgeführt werden kann (ESSER und MINUTH, 1971) oder ob sie ein Artefakt darstellt, wie es von ILLINGWORTH (1972) bei Isocitrat-Dehydrogenase berichtet wurde, kann zur Zeit noch nicht entschieden werden.

Die von MALMSTRÖM und Mitarbeitern untersuchten extrazellulären Laccasen A (Tab.2, Nr.4) und B (Tab.2, Nr.5) des Basidiomyceten Polyporus versicolor verhalten sich in einer Reihe von Eigenschaften (Molekulargewicht, Kohlenhydratgehalt, Disc-Elektrophorese, Isoelektrischer Punkt und Heterogenität) wie die hier beschriebenen Laccasen II und III. Ein Laccase I ähnliches Enzym wurde jedoch bei Polyporus (extrazellulär!) nicht gefunden. Auch BLAICH konnte bei seinen Untersuchungen intra- und extrazellulärer Holzpilzenzyme Laccasen vom A- und B-Typ finden (BLAICH and ESSER, 1975).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Befunden, die sich durch die oligomere Struktur der Laccase I erklären lassen, stehen einige Beobachtungen, die sich nicht ohne weiteres auf die postulierte Quartärstruktur der Laccase I zurückführen lassen (Tab.8). So zum Beispiel die unterschiedliche elektrophoretische

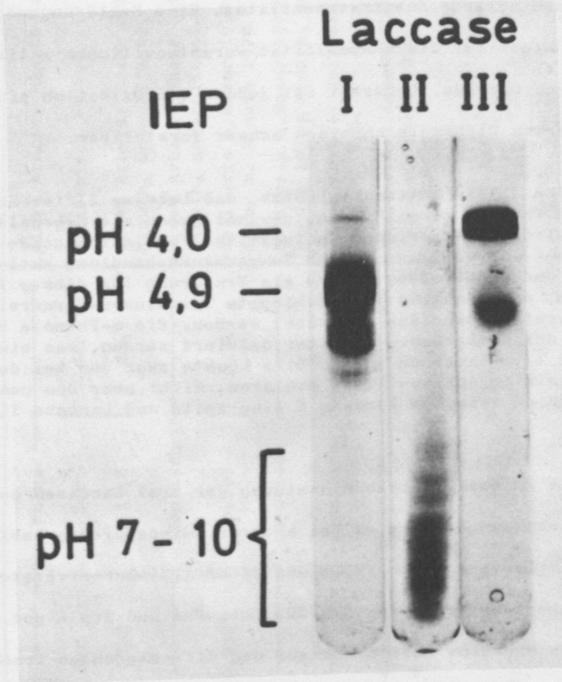


Fig.23

Polyacrylamidgel-Elektrofokussierung von Laccase I, II und III im pH-Gradienten 3-10. Färbung der Proteinbanden mit Bromphenolblau.

Beweglichkeit; sie könnte allerdings ihre Erklärung in einer durch den Kohlenhydratanteil bedingten unterschiedlichen Ladung finden. Ungeklärt ist auch noch die unterschiedliche Substratspezifität. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die Maskierung eines für die m-Spezifität verantwortlichen aktiven Zentrums in der tetrameren Laccase. Generell ist jedoch die Oxidation eines in m-Stellung substituierten Diphenols chemisch schwer vorstellbar.

SCHANDEL und ESSER (1971) hatten berichtet, daß Laccase I die Fähigkeit, m-substituierte Phenole zu oxidieren, gewinnt, wenn sie mehrmals eingefroren und aufgetaut wird. Da Tyrosinase in inaktiver Form mit Laccase vergesellschaftet vorkommt und u.a. auch durch Temperaturbehandlung aktiviert werden kann (HEINZELD und ESSER, 1969), wäre als Erklärung für dieses Phänomen auch daran zu denken, daß inaktive mitgeschleppte Tyrosinase-Verunreinigungen durch die Temperaturbehandlung aktiviert werden, die m-Phenole hydroxylieren und diese dann durch die Laccase weiter oxidiert werden, was eine m-Spezifität der Laccase I vortäuschen würde. Dies könnte zwar den bei der Laccase I beobachteten Einfrier/Auftau-Effekt erklären, nicht aber den generellen Spezifitätsunterschied zwischen Laccase I einerseits und Laccase II und III andererseits.

In Tab.4 ist die Aminosäurezusammensetzung der drei Laccasen gezeigt. Trotz einiger Übereinstimmungen gibt es bei anderen Aminosäuren erhebliche Abweichungen. Die für Laccase I von WEBER und ESSER (1964) berichteten Werte stimmen - mit Ausnahme der Werte für Cys-SH, Met, Phe und Trp - gut mit den hier gezeigten Werten überein, sofern man auf den differierenden Trockensubstanzgehalt der Enzymproben korrigiert. Da die verschiedene Aminosäurezusammensetzung der drei Laccasen sich auch rechnerisch nicht durch die verschiedenen möglichen Kombinationen aus den niedermolekularen Laccasen erklären läßt, ist dieser Befund zur Zeit noch eines der Hauptargumente gegen einen direkten Aufbau der Laccase I aus Laccase II und/oder III. Dieser negative Befund ist umso überraschender, als aus der folgenden Tabelle 9 eine Reihe auffälliger Übereinstimmungen der drei Laccasen hervorgeht:

So wurden bei keiner der nativen Laccasen freie SH-Gruppen gefunden, was sich mit BUTZOW-Befunden (1968) an der Polyporus-Laccase deckt. Serin ist bei allen 3 Laccasen die N-terminale Aminosäure; Laccase I, II und III weisen auch mit

Tab. 9

Eigenschaften der Laccasen I, II und III

Eigenschaft	Laccase I	Laccase II	Laccase III	Literatur
1) Freie SH-Gruppen	—	keine	—	diese Arbeit; Minuth, unveröff.
2) N-terminale Aminosäure	Ser	Ser	Ser	Klischies, 1974.
3) Kohlenhydratgehalt (% TS) ^{a)}	22,2	23,8	22,9	diese Arbeit; Esser u. Minuth 1971; Minuth, unveröffentl.
4) Kohlenhydratzusammensetzung, qualitativ	—	identisch	—	diese Arbeit; Esser u. Minuth 1971; Minuth, unveröffentl.
5) Cu-Gehalt (% TS)	0,298	0,298	0,310	Mollitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970
6) Absorptionsspektrum	—	identisch	—	Mollitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970; Minuth, unveröff.
7) EPR-Spektrum	—	identisch	—	diese Arbeit; Mollitoris u. Reinhammar, 1975.
8) Serologie, starke Verwandtschaft schwache Verwandtschaft.	←	←	←	Mollitoris u. Esser 1970; Esser u. Minuth 1970

a) Mittelwert aus den nach verschiedenen Methoden durchgeführten Bestimmungen

etwa 23 % den gleichen Kohlenhydratgehalt auf und ihre qualitative Kohlenhydratzusammensetzung ist ebenfalls identisch (Man, Rha, GlcNAc, Gal, Glc) wie Tabelle 5 zeigt. Darüberhinaus zeigen Laccase I und III auch in der quantitativen Kohlenhydratzusammensetzung Übereinstimmung.

Aus dem gleichen Kupfergehalt der drei Laccasen ergibt sich, wie bereits diskutiert, eine Zahl von jeweils 4 Kupferatomen pro Laccase-Monomer. Auch die Absorptionsspektren sind identisch. Aus Fig. 24 geht weiterhin hervor, daß auch die EPR-Spektren der drei Laccasen übereinstimmen, was auf eine gleichartige Verteilung der verschiedenen Kupferatome in den drei Laccasen hinweist.

Bei der Untersuchung der serologischen Eigenschaften zeigen alle drei Laccasen Verwandtschaft, wobei starke Verwandtschaft zwischen Laccase I und III, jedoch nur geringe Verwandtschaft zwischen Laccase I und II, beziehungsweise zwischen Laccase II und III gefunden wurde.

Als Ergebnis der vergleichenden Untersuchungen kann festgestellt werden, daß Laccase I oder ihre Untereinheiten in vielen Eigenschaften den Laccasen II und III gleichen. Stärkere Hinweise auf eine Beteiligung am Aufbau der Laccase I existieren nur für Laccase III (Elektrophoretische Wanderungsrichtung, quantitative Kohlenhydratanalyse, serologische Befunde). In diese Richtung weist ebenfalls der Befund, daß auch nach Spaltung der Laccase I (die nativ nur mit Antiserum I und Antiserum III reagiert) noch serologische Verwandtschaft mit Laccase III festzustellen ist, während keine Spaltprodukte auftauchen, die in der Immunelektrophorese nach Wanderungsrichtung oder serologischer Reaktion mit Laccase II verwandt wären.

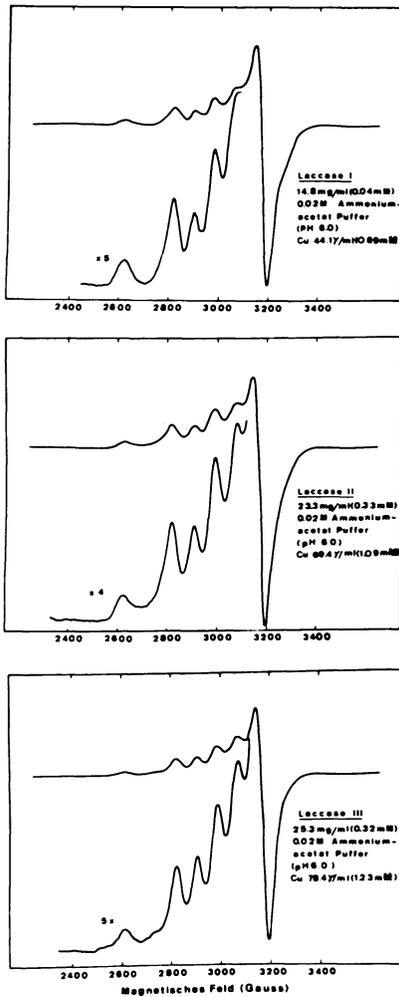


Fig.24

EPR-Spektren der Laccasen I, II und III bei 10^4 K und 9 GHz. Unter dem vollständigen Spektrum ist jeweils noch ein Teil bei 5facher Verstärkung gezeigt.

VII. In vivo-Versuche

Aus den geschilderten in vitro-Untersuchungen geht hervor, daß die drei Laccasen sich mit Ausnahme der Aminosäurezusammensetzung in der Mehrzahl der untersuchten Parameter ähneln oder gleich sind beziehungsweise daß eine Reihe von Unterschieden auf der Basis eines Aufbaues der Laccase I aus Untereinheiten gleich oder ähnlich der Laccase II und/oder III erklärt werden kann.

Es erhob sich nun die Frage, ob und inwieweit die aus den in vitro-Untersuchungen gewonnenen Vorstellungen auch auf die Verhältnisse in vivo zu übertragen sind. Es wurde daher zur Prüfung der Zusammenbau-Hypothese die Synthese der intrazellulären Laccasen des Wildstammes in einem Fermenter-Langzeitversuch verfolgt.

Das Ergebnis geht aus Fig.25 hervor. Der dabei auftretende gegensinnige Verlauf der Synthesekurven der niedermolekularen Laccasen II und III einerseits und der höhermolekularen Laccase I andererseits könnte zunächst als Auf- und Abbau verschiedener, unabhängiger Enzyme gedeutet werden.

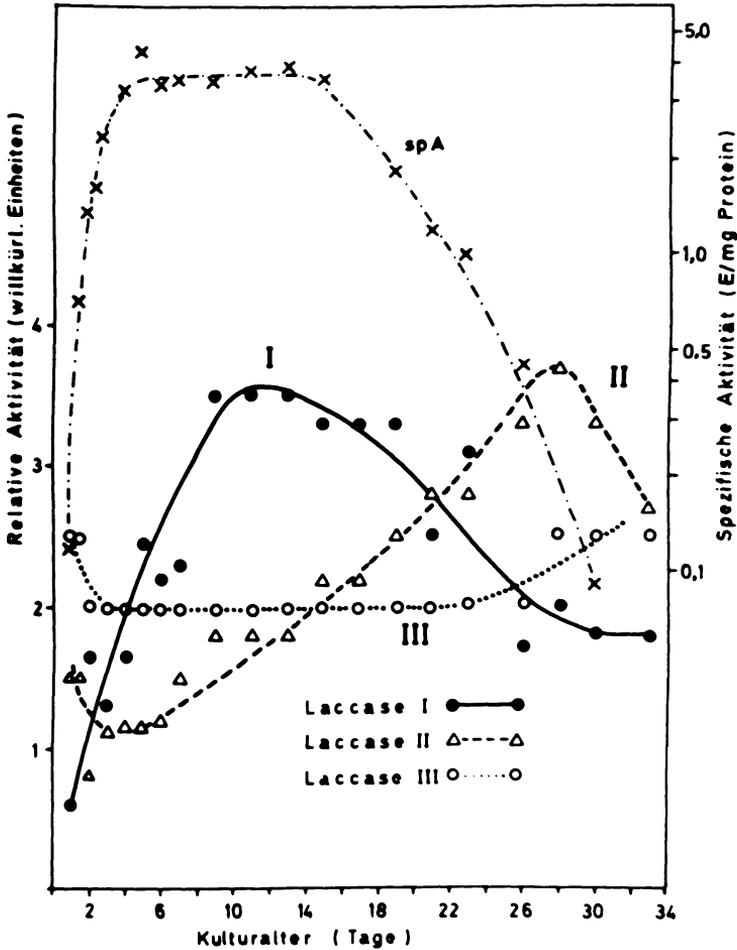
Auf Grund der anderen bereits gezeigten Befunde liegt jedoch die Interpretation näher, daß es sich dabei in der aktiven Wachstumsphase (Tag 0 - 7) um den Zusammenbau der Laccase aus den zuerst gebildeten niedermolekularen Untereinheiten II und/oder III und in der Autolysephase (ab Tag 16) um einen Zerfall in wiederum die gleichen Komponenten handelt, die sich entsprechend intrazellulär anhäufen und schließlich ausgeschieden werden. Dieser Befund würde also die vorgetragene Hypothese unterstützen.

Neben der Untersuchung genetischer und zeitlicher Einflüsse auf die Laccasesynthese interessierte jedoch auch die Wirkung anderer, nichtgenetischer

Fig.25

Abhängigkeit der Bildung der intrazellulären Laccasen I, II und III vom Kulturalter. Langzeitversuch im 300 l-Fermenter. Die Mengenangaben für die Laccasen erfolgen in willkürlichen Einheiten, da sie sich aus den Ergebnissen verschiedener Meßmethoden zusammensetzen (kolorimetrische

Laccaseproduktion und Kulturalter



Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Substraten, Hitzeinaktivierung, Disc-Elektrophorese, Gelelektrofokussierung, Agargelelektrophorese, Immunelektrophorese).

Faktoren, die an der beobachteten Pleiotropie des zonata-Gens beteiligt sind. In einer Reihe weiterer in vivo-Versuche konnte gezeigt werden, daß Morphologie und Laccaseproduktion nicht nur von genetischen Faktoren, sondern auch von äußeren Bedingungen abhängen.

Einige Ergebnisse dieser Versuche sind in Fig. 26 gezeigt. Demnach werden Morphologie und Laccasespektrum auch durch Faktoren wie pH-Wert, Zusammensetzung des Mediums und das Kulturalter beeinflusst und können zu Phänokopieeffekten führen. Phänokopie der Eigenschaften des Wildstammes und der Mutante "zonata" konnte auch LYSÉK (1971) durch gezielte Eingriffe in den Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel erreichen.

Auf Grund all dieser Befunde muß angenommen werden, daß das zonata-Gen mit seinen Genprodukten an einer zentralen Stelle des Stoffwechsels eingreift, sodaß neben Laccase-Art und Menge auch andere (unabhängige?) Parameter wie Ausbildung der Sexualorgane, Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie der Hyphen sowie der Gesamtkultur beeinflusst werden.

Stamm	Kulturbedingungen	Morphologie	Laccasen		
			I	II	III
zonata	unabhängig vom pH-Wert				
wild	pH 6				
	pH 4,5				
	pH 6 + Galactose		nicht bestimmt		
	pH 6 frühes oder spätes Wachstumsstadium				

Fig.26

Abhängigkeit der Morphologie und Laccaseproduktion von verschiedenen Faktoren bei *Podospora anserina*.

E. Diskussion

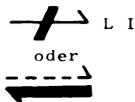
I. Struktur der Laccasen I, II und III

Die Mehrzahl der Befunde über die Laccasen von Polospora anserina steht in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß Laccase I aus Untereinheiten gleich oder ähnlich den Laccasen II und/oder III aufgebaut ist. Nach dieser Hypothese ließe sich auch das eingangs beschriebene inverse Mengenverhältnis der Laccasen beim Wildstamm unter Normalbedingungen als eine fast völlige Aggregation von Laccase II und/oder III zu Laccase I

Wildstamm L II und/oder L III  L I

und bei der Mutante "zonata" als eine

Verhinderung oder Instabilität dieses Zusammenbaues interpretieren:

Mutante "zonata" L II und/oder L III  L I
oder


In diesem Sinne konnte bereits bei einer Reihe von Organismen genetische Kontrolle von Mikroheterogenität, Quartärstruktur und Aufbau von Oligomeren durch entsprechende Kombination identischer oder verschiedener Untereinheiten gezeigt werden (FOX et al., 1963; FLING et al., 1963; de KONING et al., 1966; MARKERT, 1968; CHALMERS and DE MOSS, 1970; YU et al., 1971).

Einem direkten Aufbau der Laccase I aus Untereinheiten gleich oder ähnlich den beiden niedermolekularen Laccasen mit einem Molekulargewicht um 80.000 steht jedoch vor allem das Ergebnis der Aminosäurenanalyse entgegen, das auf dieser Basis keine befriedigende genetische Interpretation der beobachteten Phänomene zuläßt. Weiterhin führten auch entsprechende in vitro-Versuche mit Laccase II und III, allein oder in verschiedenen Mischungsverhältnissen, nicht zum Auftreten höherer Aggregate im Sinne von Laccase I (Nachweis durch Elektronenmikroskopie, Ultrazentrifugation, Elektrophorese; MOLITORIS, un-

veröffentlicht). Zur Aggregation scheinen demnach spezifische - möglicherweise genetisch gesteuerte - Veränderungen an Konformation und/oder Struktur und Zusammensetzung der Laccase-Monomere erforderlich zu sein.

Andererseits ist bei einem Molekulargewicht der Protomere um 80.000 anzunehmen, daß diese aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind. Dafür spricht neben der hohen Zahl der im Molekül enthaltenen Cysteinreste auch das Ergebnis der Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit NaDS, das Bruchstücke mit einem Molekulargewicht bei der Laccase I von 98.000, 69.000, 42.000 und 29.000 zeigt (Fig. 15).

Nimmt man nun an, daß der Zusammenbau der Laccase I genetisch und stoffwechselförmig nicht auf dem Niveau der Aggregation von Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 80.000 gesteuert wird, sondern auf dem Niveau der kovalenten Bindung verschiedener, für die drei Laccasen identischer oder unterschiedlicher Polypeptidketten, die dann je nach Kombination Laccase II, Laccase III oder das Laccase I-Protomer ergeben (das wie gezeigt reversibel aggregieren und dissoziieren kann), so ließen sich alle bisher gezeigten Befunde in ein gemeinsames Modell einfügen und auch genetisch interpretieren.

Um diese Hypothese zu prüfen, sind daher im Augenblick folgende Versuche im Gange oder geplant:

Quantitative Spaltung der Laccase I in ihre Untereinheiten (MG ca. 90.000) unter Verhinderung der Reaggregation.

Isolierung, Reinigung, chemische und biochemische Analyse der Spaltprodukte
Herstellung von Antisera gegen die gereinigten Spaltprodukte und Feststellung ihrer serologischen Verwandtschaft mit Laccase I, II und III oder bestimmten Derivaten.

Entsprechende Versuche mit den z. B. nach tryptischer Verdauung der Spaltprodukte (Protomere) gewonnenen Polypeptiden (Fingerprints).

Untersuchung der Laccasen weiterer Mutanten.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser und anderer Versuche ist zu hoffen, das Problem der multiplen Laccasen des Ascomyceten Podospora anserina auch einer befriedigenden genetischen Interpretation zuzuführen.

Die bereits vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch bereits jetzt folgende Feststellung zu:

Bei den Laccasen des Ascomyceten Podospora anserina handelt es sich um ein System multipler Enzyme, die in verschiedenen Aggregationszuständen auftreten können und sich in wesentlichen Eigenschaften gleichen, wobei das Gleichgewicht zu höher- und niedermolekularen Formen durch bestimmte Stoffwechselbedingungen verschoben sein kann, die sowohl von äußeren als auch von genetischen Faktoren beeinflusst werden.

II. Funktion der Laccase

Durch die Untersuchungen der jüngsten Zeit konnte der Mechanismus der durch die Laccase katalysierten Reaktion besonders hinsichtlich der beteiligten Kupferatome in einer Reihe von Punkten geklärt werden (MALKIN and MALMSTRÖM, 1970; REINHAMMAR, 1972). Die an den Laccasen von Podospora anserina gewonnenen Ergebnisse stimmen mit diesen Befunden überein.

Weitere interessante Ergebnisse konnten kürzlich PECHT und FARAGGI (1971) beitragen, die Kooperativität beim intramolekularen Elektronentransport zwischen den einzelnen Kupferatomen der Laccase feststellten. Sie machten weiterhin wahrscheinlich, daß das durch seinen Valenzwechsel an der Redox-Reaktion beteiligte Kupfer im Inneren des Laccasemoleküls liegt und die hydrierten Elektronen zunächst mit Aminosäureresten der Proteinperipherie reagieren. Die Tatsache, daß dabei die Effektivität des Elektronentransports von der Proteinkonzentration der Laccase abhängt, bietet auch eine Möglichkeit zur Interpretation der bei der tetrameren Laccase I gegenüber den niedermolekularen monomeren Laccasen II und III vierfach höheren spezifischen Aktivität. Entsprechend obigem Befund kann dies ebenfalls als ein kooperativer Effekt gedeutet werden, da die Tetramerstruktur der Laccase I quasi eine sehr hohe Laccasekonzentration bei gleichzeitig stabiler Quartärstruktur gewährleistet.

Der Elektronentransport findet bei Laccasen jedoch nicht nur intramolekular statt - und im Falle der Laccase I möglicherweise intermolekular zwischen identischen, nichtkovalent gebundenen Protomeren -, sondern es konnte inzwischen auch nachgewiesen werden (MALMSTRÖM et al., 1971), daß mehrere Redoxenzyme wie Laccase, Cytochrom c und Azurin ein Elektronentransport-System bilden können, bei dem die Elektronen zwischen dessen einzelnen nicht-identischen Komponenten weitgereicht werden. Dies ist möglicherweise auch ein Hinweis auf eine biologische Funktion der Laccase im Zusammenhang

mit anderen Redoxkatalysatoren, wie Peroxidase, Katalase und Tyrosinase, mit denen sie häufig vergesellschaftet ist. Möglicherweise wird dadurch auch erklärt, warum manche der für die Laccase postulierten Reaktionen nur mit unreinen Enzympräparaten (z.B. bei Versuchen zum Ligninstoffwechsel) ablaufen.

Ein anderer, mehrfach erhobener Befund (Literatur in MOLITORIS und ESSER, 1970; BLAICH, 1972) ist die scheinbare Identität von Laccase und Peroxidase oder Katalase hinsichtlich einer Reihe von Eigenschaften, sowie die auffallend geringe Substratspezifität der Laccase. Durch Untersuchungen an organischen Kupferkomplexen wurde festgestellt, daß diese nicht nur die typischen EPR-Eigenschaften der Laccase aufweisen, sondern je nach Versuchsbedingungen auch katalatische, peroxidatische und phenoloxidatische Aktivität besitzen (PECHT et al., 1967; SIGEL, 1969). Demnach wäre hier das Kupfer kritischer Bestandteil des Systems und der Proteinanteil wäre von geringerer Bedeutung.

Diese Schlußbemerkungen zu der noch immer nicht geklärten Funktion der Laccasen sollten noch einmal die Komplexität des Problems der Struktur und Funktion der Laccase aufzeigen und die verschiedenen Wege demonstrieren, auf denen versucht wird, über die analytische Untersuchung des Enzyms und seines Reaktionsmechanismus schließlich auch dessen biologische Funktion aufzuklären.

F. Zusammenfassung

- 1) Die hochmolekulare Laccase I (p-Diphenol:O₂ Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) wurde aus dem Myzel des Wildstammes des Ascomyceten Podospora anserina isoliert und gereinigt. Das Enzym ist nach Kriterien der Ultrazentrifugation und Elektrophorese homogen.
- 2) Die analytisch-biochemische Untersuchung zeigte folgende Eigenschaften: Molekulargewicht je nach Bestimmungsmethode 333.000 bis 390.000, wahrscheinlichster Wert um 340.000; 16 g-Atom Kupfer pro Enzymmolekül; Kohlenhydratgehalt 22 % der Trockensubstanz; Kohlenhydratkomponenten: Man, Rha, GlcNAc, Gal, Glc; Aminosäurenanalyse: 74 Cys-SH pro Molekül, keine freien SH-Gruppen im nativen Enzym; Verhältnis saurer zu basischen Aminosäuren 1,84/1; Ser als N-terminale Aminosäure; doppeltes pH-Optimum (mit DOPA) bei pH 7,5 und 9,0; Isoelektrischer Punkt bei pH 4,9; anodische Wanderungsrichtung in der Elektrophorese; Spezifität für o- und p-substituierte Phenole; Substrathemmung; Hemmung durch Kupfer-komplexierende Agentien (Azid) und SH-Gruppen-Reagenzien wie β -Mercaptoäthanol; Absorptionsspektrum mit Maxima bei 280 und 610 nm; Absorptionsdifferenz (ox. - red.) Spektrum mit Maxima bei 330 und 610 nm; in serologischen Versuchen (Bestimmung kreuzreagierender Materials, Immunelektrophorese, Immundiffusion) starke Verwandtschaft zwischen Laccase I und III, geringe Verwandtschaft zwischen Laccase I und II sowie L II und III.
- 3) Die physikalische Untersuchung des im Enzym gebundenen Kupfers durch Messung der elektronenparamagnetischen Resonanz zeigte, daß bei Laccase I 50 % des Gesamtkupfers (also 8 Kupferatome) EPR-nachweisbar sind, 4 davon gehören dem Cu²⁺ Typ 1 ("blaues" Cu²⁺), 4 dem Cu²⁺ Typ 2 ("nichtblaues" Cu²⁺) an.
- 4) Laccase I kann durch dissoziierende Agentien (NaDS, Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid) reversibel in Untereinheiten gespalten und inaktiviert werden. Zusatz von β -Mercaptoäthanol bewirkt irreversible Spaltung und führt zusätzlich zu kleineren Spaltprodukten. Auch Aggregation zu höheren Vielfachen

der Laccase I wird beobachtet.

5) Auf Grund der Spaltungsversuche und der elektronenmikroskopischen Untersuchung stellt Laccase I ein durch nichtkovalente Bindungen verknüpftes Tetramer dar, aufgebaut aus elliptischen, morphologisch identischen Untereinheiten ($6,7 \times 4,3 \times 5,4$ nm), die in den Ecken eines Rechteckes angeordnet erscheinen. Bei Senkung des pH-Wertes während der Präparation kommt es zur Bildung linearer Aggregate. Die elektronenmikroskopischen Befunde werden anhand eines Symmetriemodelles diskutiert.

6) Ein Vergleich der Laccase I des Wildstammes von Podospora anserina mit den aus der Einfaktormutante "zonata" isolierten niedermolekularen Laccasen II (MG = 80.000, 4 Cu) und III (MG = 82.000, 4 Cu) läßt auf Grund einer Vielzahl von Übereinstimmungen den Schluß zu, daß Laccase I aufgebaut ist aus Untereinheiten, die den niedermolekularen Laccasen ähnlich sind.

7) Die verschiedene Aminosäurezusammensetzung der 3 Laccasen spricht gegen einen direkten Aufbau der Laccase I aus den niedermolekularen Laccasen II und/oder III. Eine genetische Interpretation der beobachteten Phänomene wird weiter durch die im zonata-Gen (Punktmutation) lokalisierte Pleiotropie erschwert. Es werden Vorstellungen zur Klärung dieses Widerspruchs diskutiert und Wege zu seiner Lösung vorgeschlagen.

8) Die mögliche funktionelle Bedeutung der Laccasen wird anhand eigener Befunde und neuer Untersuchungsergebnisse anderer Autoren diskutiert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.ESSER bin ich für ständige ideelle und materielle Unterstützung der Arbeiten sehr zu Dank verpflichtet. Danken möchte ich auch den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhles, insbesondere Herrn W. Minuth für kritische Diskussionen, sowie meinen beiden Mitarbeiterinnen, Dipl. Landw. Frau P. Wenkow und Frä. H. Goldschmidt, und dem technischen Personal des Institutes.

Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Kommission für Forschung der Ruhr-Universität und der Gesellschaft der Freunde der Ruhr-Universität unterstützt.

G. Literatur

- ADAMS, E.T., and LEWIS, M.S.: Biochem. 7, 1044 (1968).
- ANDO, K.: J. Biochem. Tokyo 68, 501 (1970).
- BERTRAND, G.: Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 118, 1215 (1894).
- BERTRAND, G.: Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 122, 1132 (1896).
- BLAICH, R.: Experientia 28, 896 (1972).
- BLAICH, R., and ESSER, K.: Arch. Mikrobiol. 103, 271 (1975).
- BLUMBERG, W.E., LEVINE, W.G., MARGOLIS, S. and FEISACH, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 277 (1964).
- BOAS, J.F., PILBROW, J.R., TROUP, G.J., MOORE, C. and SMITH, D.T.:
J.Chem.Soc. A, 965 (1969).
- BOLTON, C.H., CLAMP, J.R. and HOUGH, L.: Biochem.J. 96, 5c (1965).
- BONNER, W.D.jr.: Annu.Rev.Plant Physiol. 8, 427 (1957).
- BOSE, S.R., and SARKAR, S.N.: Proc.Roy.Soc. B. 123, 173 (1937).
- BRÄNDÉN, R., MALMSTRÖM, B.G. and VÄNNGÅRD, T.: Eur.J.Biochem. 18, 238 (1971).
- BRAY, R.C.: FEBS Letters 5, 1 (1969).
- BROMAN, J., MALMSTRÖM, B.G., AASA, R. and VÄNNGÅRD, T.: J.Mol.Biol. 5 301 (1962).
- BULL, A.T.: Arch.Biochem.Biophys. 137, 345 (1970a).
- BULL, A.T.: Enzymologia 39, 333 (1970b).
- BUTZOW, J.: Biochim.Biophys.Acta 168, 490 (1968).
- CHALMERS, J.H.jr., and DEMOSS, J.A.: Genetics 65, 213 (1970).
- CLUTTERBUCK, A.J.: J.Gen.Microbiol. 70, 423 (1972).
- DARNALL, D.W., and KLOTZ, I.M.: Arch.Biochem.Biophys. 149, 1 (1972).
- EDELHOCH, H.: Biochemistry 6, 1948 (1967).
- EHRENBERG, A., MALMSTRÖM, B.G., BROMAN, L., and MOSBACH, R.: J.Mol.Biol. 5, 450 (1962).
- ESSER, K.: Z.Indukt.Abstamm.Vererbungs1. 87, 595 (1956a).
- ESSER, K.: Naturwiss. 43, 284 (1956b).
- ESSER, K.: Compt.Rend.Lab.Carlsberg, Sér.physiol. 26, 103 (1956c).
- ESSER, K.: Z.Vererbungs1. 90, 29 (1959).
- ESSER, K.: Proc.Int.Congr.Genet.XIth, The Netherlands, Vol.I (1963a).

- ESSER, K.: Arch.Mikrobiol. 46, 217 (1963b).
- ESSER, K.: Naturwiss. 50, 576 (1963c).
- ESSER, K.: Z.Vererbungs1. 97, 327 (1966).
- ESSER, K.: Genetics 60, 281 (1968).
- ESSER, K.: Mycologia 61, 1008 (1969)
- ESSER,K. and MINUTH,W.: Genetics 64, 441 (1970).
- ESSER,K. and MINUTH,W.: Eur.J.Biochem. 23, 484 (1971).
- ESSER,K., DICK,S. and GIELEN,W.: Arch.Mikrobiol. 48, 306 (1964).
- EYLAR, E.H.: J.Theor.Biol. 10, 89 (1965).
- FLING,M., HOROWITZ, N.H. and HEINEMANN, S.F.: J. Biol. Chem. 238, 2045 (1963).
- FOX, A.S. BURNETT,J.B. and FUCHS,M.S.: Ann.N.Y.Acad.Sci. 100, (II) 840 (1963).
- FRANKE, W.: In: W.RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie ^{XI}I/1,
Springer Heidelberg 1960, 401.
- FREUDENBERG,K. and NEISH,A.C.: Constitution and Biosynthesis of Lignin.
Springer Berlin-Heidelberg-New York 1968.
- FRIEDMAN, S. and KAUFMAN, S.: J.Biol.Chem. 241, 2256 (1966).
- GOTTSCHALK, A.: Nature 222, 452 (1969).
- GRAY, W.R.: In: COLOWICK,S.P. and N.O.KAPLAN(Eds.): Methods in Enzymology.
Vol.XII, Academic Press 1967, p.139.
- GREGORY, R.P.F.: Biochim.Biophys.Acta 159, 429 (1968).
- HAIDER, K.: Zentralbl.Bakteriol.,Parasitenk.,Infektionskr.Hyg.,1.Orig.198,
308 (1966).
- HAIDER,K., LIM,S. und FLAIG,W.: Holzforschung 18, 81 (1964).
- HAMILTON, G.A.: Adv.Enzymol. 32, 55 (1969).
- HASCHEMEYER, R.H.: Adv.Enzymol. 33, 71 (1970).
- HERZFELD,F. and ESSER,K.: Arch.Mikrobiol. 65, 146 (1969).
- HIGUCHI, T.: Adv.Enzymol. 34, 204 (1971).
- HORIO,T., HIGASHI,T., YAMANAKA,T. MATSUBARA,H. and OKUNUKI,K.: J.Biol.Chem.
236, 944 (1961).

- HOROWITZ, N.H. and FLING, M.: Proc.Natl.Acad.Sci. 42, 498 (1956).
- ILLINGWORTH, J.A.: Biochem.J. 129, 1125 (1972).
- IWASAKI, H., MATSUBARA, T. and MORI, T.: J.Biochem.(Tokyo) 61, 814 (1967).
- JOLLEY, R.L. jr., NELSON, R.M. and ROBB, D.A.: J.Biol.Chem. 244, 3251 (1969).
- KAÄRIK, A.: Stud.Forst.Suec. 31, 5 (1965).
- KASPER, C.B.: Biochemistry 6, 3185 (1967).
- KEILIN, D. and HARTREE, E.F.: Proc.Roy.Soc. B (London) 119, 114 (1935).
- KERTESZ, D. and ZITO, R.: In: HAYAISHI, O. (Ed.): Oxygenases, Academic Press N.Y. 1962, p.307.
- KLISCHIES, Martina: Diplomarbeit, Bochum (1974).
- KLOTZ, I.M. and LANGERMAN, N.R.: Annu.Rev.Biochem. 39, 25 (1970).
- KONING, DE, P.J., VAN ROOIJEN, P.J. and KOK, A.: Biochem.Biophys.Res.Commun. 24, 616 (1960).
- KOSUGE, T.: Annu.Rev.Phytopathol. 7, 195 (1969).
- KUO, M.-J. and ALEXANDER, M.: J.Bacteriol. 94, 624 (1967).
- LINDBERG, G.: Z.Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 69, 142 (1955).
- LYR, H.: Planta 48, 239 (1956).
- LYR, H.: Flora 152, 570 (1962).
- LYR, H.: Phytopathol.Z. 47, 73 (1963).
- LYR, H. und ZIEGLER, H.: Phytopathol.Z. 35, 173 (1959).
- LYSEK, G.: Arch.Mikrobiol. 78, 330 (1971).
- LYSEK, G. and ESSER, K.: Arch.Mikrobiol. 73, 224 (1970).
- MALKIN, R. and MALMSTRÖM, B.G.: Adv.Enzymol. 33, 177 (1970).
- MALKIN, R., MALMSTRÖM, B.G. and VANNGÄRD, T.: Europ.J.Biochem. 7, 253 (1969).
- MALKIN, R., MALMSTRÖM, B.G. and VANNGÄRD, T.: Europ.J.Biochem. 10, 324 (1969).
- MALMSTRÖM, G. and RYDEN, L.: In: SINGER, T.: Biological oxidations. Inter-science Publ. 1968, p.15.
- MALMSTRÖM, G. and VANNGÄRD, T.: J.Mol.Biol. 2, 118 (1960).
- MALMSTRÖM, B.G., REINHAMMAR, B. and VANNGÄRD, T.: Biochim.Biophys.Acta 205, 48 (1970).

- MALMSTROM, G., FINAZZI-AGRO, A.F., GREENWOOD, C., ANTONINI, E., BRUNORI, M.
and MONDOVI, B.: Arch.Biochem.Biophys. 145, 349 (1971).
- MARCHESI, S.L., STEERS, E. and SHIFRIN, S.: Biochim.Biophys.Acta 181, 20 (1969).
- MARKERT, C.L.: Ann.N.Y.Acad.Sci. 151, 14 (1968).
- MAYER, A.M. and HAREL, E.: Phytochem. 7, 1253 (1968).
- MELCHERS, F. and KNOPF, P.M.: Cold Spr.Harb.Symp.Quant.Biol. 32, 255 (1967).
- MOLITORIS, H.P. and ESSER, K.: Arch.Mikrobiol. 72, 267 (1970).
- MOLITORIS, H.P. and ESSER, K.: Arch.Mikrobiol. 77, 99 (1971).
- MOLITORIS, H.P. and REINHAMMAR, B.: Biochim. Biophys. Acta 386, 493 (1975).
- MOLITORIS, H.P., VAN BREEMEN, J.F.L., VAN BRUGGEN, E.F.J. and ESSER, K.:
Biochim.Biophys.Acta 271, 286 (1972).
- MONDOVI, B., ROTILIO, G., COSTA, M.T., FINAZZI-AGRO, A., CHIANCONE, E., HANSEN, R.
and BEINERT, H.: J.Biol.Chem. 242, 1160 (1967).
- MONOD, J., WYMAN, J., and CHANGEUX, J.-P.: J.Mol.Biol. 12, 88 (1965).
- MOORE, S.: J.Biol.Chem. 238, 235 (1963).
- MORELL, A.G., GREGORIADIS, G. and SCHEINBERG, I.H.: J.Biol.Chem. 246, 1461 (1971).
- MORINO, Y. and SNELL, E.E.: J.Biol.Chem. 242, 5591 (1967).
- NAKAMURA, T.: Biochim.Biophys.Acta 30, 44 (1958).
- NAKAMURA, T. and OGURA, Y.: Wenner Gren Center Intern.Symp. Ser.9, Pergamon
Press 1966, p.205.
- NAKAMURA, T. and OGURA, Y.: J.Biochem.(Tokyo) 59, 449 (1966).
- NAKAMURA, T., IKAI, A., and OGURA, Y.: J.Biochem.(Tokyo) 57, 808 (1965).
- NAKAMURA, T., MAKINO, N. and OGURA, Y.: J.Biochem.(Tokyo) 64, 189 (1968).
- NEEDLEMAN, S.B.: Protein Sequence determination. Springer Berlin-Heidelberg-
New York 1971, p.38.
- OLESEN, H. and PEDERSEN, P.O.: Acta Chem.Scand. 22, 1386 (1968).
- OMURA, T.: J.Biochem.(Tokyo) 50, 389 (1961).
- PAUL, K.G. and STIGBRAND, T.: Biochim.Biophys.Acta 221, 255 (1970).

- PECHT, I. and FARAGGI, M.: Nature 233, 116 (1971).
- PECHT, I., LEVITZKI, A. and ANBAR, M.: J. Amer. Chem. Soc. 89/7 1587 (1967).
- PEISACH, J., AISEN, P. and BLUMBERG, W.E.: The Biochemistry of Copper. Proc. Symp. Copper in Biology. Academic Press New York-London 1966.
- PLAPP, B.V., and COLE, R.D.: Biochemistry 6, 3676 (1967).
- PORTER, H.: In: PEISACH, J., AISEN, P. and BLUMBERG, W.E. (Eds.): The Biochemistry of Copper. Academic Press New York 1966, p.159.
- POTGIETER, H.J. and ALEXANDER, M.: J. Bacteriol. 91, 1520 (1965).
- REINHAMMAR, B.: Biochim. Biophys. Acta 205, 35 (1970).
- REINHAMMAR, B.R.M.: Biochim. Biophys. Acta 275, 245 (1972).
- REINHAMMAR, B.M. and VANNGÅRD, T.I.: Eur. J. Biochem. 18, 403 (1971).
- ROBERTSON, N.F., FRIEND, J., AVEYARD, M., BROWN, J., HUFFEE, M. and HOMANS, A.L.: J. gen. Microbiol. 54, 261 (1968).
- RÖSCH, R.: Beih. Mater. Organism., 1 Holz u. Organism. Intern. Symp. Berlin-Dahlem 1965, 173.
- RÖSCH, R.: Arch. Mikrobiol. 54, 80 (1966).
- ROMBAUTS, W.A., SCHROEDER, W.A. and MORRISON, M.: Biochemistry 6, 2965 (1967).
- ROSEMAN, S.: 4th Int. Conf. on Cystic Fibrosis Pancreas, Berne/Grindelwald 1966, Part II. Karger Basel-New York 1968, p.244.
- RYDEN, L.: Int. J. Protein Res. III, 131 (1971).
- SARKANEN, K.V. and LUDWIG, C.H.: Lignins, occurrence, formation, structure and reaction. Wiley Interscience, New York 1971.
- SCHANDEL, L.: Biol. Plant. (Praha) 9, 41 (1967).
- SCHANDEL, L. and ESSER, K.: Arch. Mikrobiol. 77, 111 (1971).
- SCHANDEL, L., BLAICH, R. and ESSER, K.: Arch. Mikrobiol. 77, 140 (1971).
- SCHERAGA, A.H. and MANDELKERN, L.: J. Amer. Chem. Soc. 75, 179 (1953).
- SCHUBERT, W.J.: In: FLORKIN, M. and STOTZ, E.H. (Eds.): Comprehensive Biochemistry. Vol. 20 1968, p.193.
- SCHUBERT, W.J.: Lignin Biochemistry. Academic Press New York-London 1965, p.70 + 81.

- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. and MAIZEL, J.V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- SIGEL, H.: *Angew. Chem.* 81, 161 (1969).
- SIMONS, K., and BEARN, A.G.: *Biochim. Biophys. Acta* 175, 260 (1969).
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE, S.: *Analyt. Chem.* 30, 1190 (1958).
- SPIRO, R.G.: *Annu. Rev. Biochem.* 39, 599 (1970).
- STARK, G.R. and DAWSON, C.R.: *J. Biol. Chem.* 237, 712 (1962).
- STIGBRAND, T., MALMSTRÖM, B.G. and VANNGÅRD, T.: *FEBS Letters* 12, 260 (1970/71).
- STOESSEL, A.: *Recent Adv. Phytochem.* 2, 143 (1970).
- STRUMEYER, D.H. and MALIN, M.J.: *Biochem. J.* 118, 899 (1970).
- SUND, H., WEBER, K. and MÖLBERT, E.: *Eur. J. Biochem.* 1, 400 (1967).
- SWEETLEY, C.C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELLS, W.W.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2497 (1963).
- TANFORD, C.: *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 2050 (1964).
- TISSIERES, A.: *Nature* 162, 340 (1948).
- TRIP, J.A.J. and VAN BRUGGEN, E.F.J.: *Biochim. Biophys. Acta* 263, 31 (1972).
- TROJANOWSKI, J., LEONOWICZ, A. and HAMPEL, B.: *Acta Microbiol. Pol.* 15, 17 (1966).
- VALENTINE, R.C., WRIGLEY, N.G., SCRUTTON, M.C., IRIAS, J.J. and UTTER, M.F.: *Biochemistry* 5, 3111 (1966).
- VALENTINE, R.C., SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R.: *Biochemistry* 7, 2143 (1968).
- WARBURG, O. and CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.* 310, 384 (1941).
- WEBER, P. and ESSER, K.: *Naturwiss.* 20, 491 (1964).
- WEBER, K. and OSBORN, M.: *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
- WESER, U., BUNNENBERG, E., CAMMACK, R., DJERASSI, C., FLOHÉ, E., THOMAS G. and VOELTER, W.: *Biochim. Biophys. Acta* 243, 203 (1971).
- WILK, S., MEISTER, A. and HASCHEMEYER, R.H.: *Biochemistry* 8, 3168 (1969).
- WILSON, D.M.: *Phytopathology* 60, 129 (1970).
- WINTERBURN, P.J. and PHELPS, C.F.: *Nature* 236, 147 (1972).

YAMADA, H., KUMAGAI, H., KAWASAKI, H., MATSUI, H. and OGATA, K.: Biochem. Biophys.

Res. Commun. 29, 723 (1967).

YOSHIDA, H.: J. Chem. Soc. (Tokyo) 43, 472 (1883).

YU, S.-A., GARRETT, M. K. and SUSSMAN, A. S.: Genetics 68, 473 (1971).

ZAHLER, W. L. and CLELAND, W. W.: J. Biol. Chem. 243, 716 (1968).

