

Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften

I. Trennung, Reinigung, chemische und physikalische Daten

On the Physiological Significance of the Isoenzyme Groups of Peroxidase from Tobacco Demonstrated by Biochemical Properties

I. Separation, Purification, Chemical and Physical Properties

A. NESSEL und M. MÄDER

Mit 4 Abbildungen

Empfangen am 1. Oktober 1976 · Angenommen am 15. November 1976

Summary

Separation and purification of three peroxidase-isoenzyme groups (G_I , fast migrating anodic; G_{II} , slow migrating anodic; G_{III} , slow migrating cathodic) was accomplished by ion-exchange chromatography. Chromatographic separation of the groups was controlled by disk-electrophoresis and by isoelectric focusing. Molecular weights were estimated by SDS-gel electrophoresis and by thin layer chromatography. The results of both methods are similar. G_I has a molecular weight of about 27,000, G_{II} of 43,000 and G_{III} of 47,000. By affinity chromatography with Concanavalin A-sepharose it was shown that the enzymes of the three peroxidase groups are all glycoproteins. While heat inactivation of G_I was measured at 50 °C, inactivation of G_{II} and G_{III} did not take place before 70 °C. Absorption spectra of the three groups were typical for ferriperoxidases with the maximum of the Soret band at 401 nm.

Key words: peroxidase, isoenzymes, biochemical characterization, callus cultures, *Nicotiana tabacum*.

Einleitung

Die Peroxidase-Isoenzyme sind bei Tabak-Geweben nach disk-elektrophoretischer Trennung in maximal 4 Gruppen angeordnet, die sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit deutlich unterscheiden (MÄDER et al., 1975 b). Untersuchungen zur

*) MW = Molekulargewichte, DE = Disk-Elektrophorese, IEF = Isoelektrische Fokussierung, IP = Isoelektrischer Punkt.

Lokalisation haben gezeigt, daß die Gruppen verschiedenen Kompartimenten der Zelle zuzuordnen sind (MÄDER et al., 1975 a; MÄDER, 1976). Es ist anzunehmen, daß mit der unterschiedlichen Lokalisation auch verschiedene Funktionen verknüpft sind.

KAY et al. (1967) haben die physikalischen, chemischen und biochemischen Eigenschaften der Meerrettich-Peroxidasen, die nach elektrophoretischer Trennung in Gruppen auftreten, analysiert. Sie zeigten, daß die Isoenzyme innerhalb einer Gruppe nur geringfügig differierten, zwischen den beiden Gruppen aber deutliche Unterschiede bestanden.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Lokalisation sollten die Eigenschaften der Tabak-Peroxidasegruppen untersucht werden, um weitere Hinweise zu ihrer biologischen Funktion zu erhalten. Tabak-Kallus bot sich für diese Untersuchungen aus zweierlei Gründen an: 1. Alle in Tabak-Geweben auftretenden Isoenzymgruppen kommen im Kallus vor. Die Gruppen bestehen hier alle in der Regel aus einer starken Haupt- und 1–2 wesentlich schwächeren Nebenbanden. Sie sind somit weniger heterogen als in den «natürlichen» Geweben (vgl. MÄDER et al., 1975 b). 2. Die Gesamtkonzentration ist im Kallus wesentlich höher als in den «natürlichen» Geweben und von den sauren Proteinen ist die Peroxidase das vorherrschende.

Während der erste Teil dieser Arbeit sich mit Trennung, Reinigung sowie einigen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Peroxidase-Gruppen befaßt, sollen im 2. Teil die Substratspezifitäten der Gruppen und ihre mögliche Bedeutung für die natürliche Rolle der Peroxidase-Isoenzyme behandelt werden.

Material und Methoden

Kalluskulturen wurden aus Sproßstücken von *Nicotiana tabacum* var. BURLEY auf dem Medium nach MURASHIGE and SKOOG (1962) angezogen und subkultiviert (16 h Licht, 3000 Lux, 25 °C).

Extraktion: 30 g Kallus wurden mit 60 ml Acetatpuffer (0,05 M, pH = 4,6) mit dem Ultra Turrax 3 × 2 min im Eisbad zerkleinert. Der Gewebebrei wurde durch vier Lagen Verbandsmull gepreßt; der Preßsaft anschließend bei 4 °C 20 min mit 12 000 g abzentrifugiert. Der Überstand ergab den Rohextrakt.

Aktivitätsmessung: Zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität wurde der Testansatz nach SIEGEL and GALSTON (1967) verwendet. Je nach Aktivität wurden 10–100 µl Peroxidase-Enzymlösung zugegeben; die Messung erfolgte bei 470 nm im Zeiss-Photometer PMO II, T = 25 °C; Meßdauer 2 min, Ablesvorgang alle 15 sec.

Proteinbestimmung wurde nach LOWRY (1951) durchgeführt; die Proteine wurden vor der Färbung mit TCA aus den Extrakten ausgefällt und mit SDS wieder aufgenommen.

Ionenaustauschchromatographie: Die säulenchromatographische Trennung der Peroxidase-Isoenzymgruppen wurde mit Whatman Cellulose (pre swollen) durchgeführt; CM-52 für Kationenaustausch und DE-52 für Anionenaustausch. 60–70 ml Rohextrakt wurden auf die CM-Säule (15 × 3 cm) gegeben. Mit Acetatpuffer (0,05 M pH = 4,6) wurde nachgewaschen. Es wurden 30 Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen 7–20 enthielten Peroxidaseaktivität und ergaben zusammen den Durchfluß der CM-Säule. Dieser enthielt die anodischen Peroxidase-Isoenzymgruppen G_I und G_{II}. Die beiden kathodischen Gruppen G_{III} und G_{IV} wurden von der CM-Cellulose gebunden.

Die Elution der Gruppe G_{III} wurde mit 0,125 M NaCl (in 0,05 M Acetatpuffer pH = 4,6) vorgenommen. Mit höherer NaCl-Konzentration war G_{IV} (aber durch G_{III} verunreinigt und relativ geringer Aktivität) zu eluieren.

Der Durchfluß der CM-Säule (mit den Gruppen G_I und G_{II}) wurde mit Ammoniumsulfat (80% Sättigung) ausgefällt, mit 10 ml Tris/HCl-Puffer (0,05 M, pH = 8,5) aufgenommen und 15 h bei einmaligem Pufferwechsel gegen denselben Puffer dialysiert. Dieser Extrakt wurde auf die DEAE-Cellulose aufgetragen, dabei wurden die beiden Gruppen G_I und G_{II} gebunden.

Die Gruppe G_{II} wurde mit 0,05 M NaCl und G_I mit 0,25 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (0,05 M, pH = 8,5) eluiert. Alle Gruppen wurden 15 h gegen Tris/HCl-Puffer dialysiert. Die Reinheit der so gewonnenen Gruppen wurde durch Disk-Elektrophorese kontrolliert.

Disk-Elektrophorese und Isoelektrische Fokussierung wurden nach den von MÄDER et 1975 a) bzw. MÄDER und BOPP (1976) beschriebenen Methoden durchgeführt.

Die *Molekulargewichtsbestimmung* mit SDS-Elektrophorese erfolgte nach NEVILLE und GLOSSMAN (1974). Die Proben wurden dabei folgendermaßen hergestellt: zu 1 ml Enzymextrakt wurden 1 mg Na₂CO₃, 4 mg SDS, 10 µl Mercaptoethanol und 150 mg Saccharose hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Wasserbad 15 min bei 100 °C gekocht. Als Markersubstanzen wurde der Satz MS-II von Serva (Heidelberg) nach den Angaben von MACHOLD (1974) benutzt.

Die *Molekulargewichtsbestimmung* mit der Dünnschichtchromatographie wurde nach MORRIS (1964) durchgeführt.

Die *Glykoproteinbestimmung* erfolgte mit Con-A-Sepharose nach der Gebrauchsanweisung von Pharmacia Fine Chemicals (1974).

Trennungsgang schematisch

Rohextrakt (Acetatpuffer, 0,05 M, pH 4,6)



CM-Cellulose (Kationenaustauscher)

- 1. Elution, Beseitigung von Verunreinigungen
(0,03 M NaCl in Acetatpuffer, 0,05 M, pH 4,6)
- 2. Elution, Gruppe III
(0,125 M NaCl in Acetatpuffer, 0,05 M, pH 4,6)

Durchfluß CM enthält G_I und G_{II}



Fällung mit 80% Ammoniumsulfat



Aufnahme in 10 ml Tris/HCl-Puffer (0,05 M, pH 8,5)
und Dialyse gegen denselben Puffer



DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher)

- 1. Elution, Gruppe G_{II}
(0,05 M NaCl in Tris/HCl-Puffer, 0,05 M, pH 8,5)
- 2. Elution, Gruppe G_I
(0,25 M NaCl in Tris/HCl-Puffer, 0,05 M, pH 8,5)



Kontrolle der so gewonnenen Gruppen durch Disk-Elektrophorese

Ergebnisse

1. Extraktion, Tennung und Reinigung der Peroxidase-Isozymgruppen

Ein Vergleich des Peroxidase-Isozymmusters mit dem Proteinmuster des gleichen Kallusrohextraktes zum einen und den Proteinmustern der Rohextrakte natürlicher Gewebe zum anderen zeigt, daß die Peroxidase im Kallusrohextrakt im an

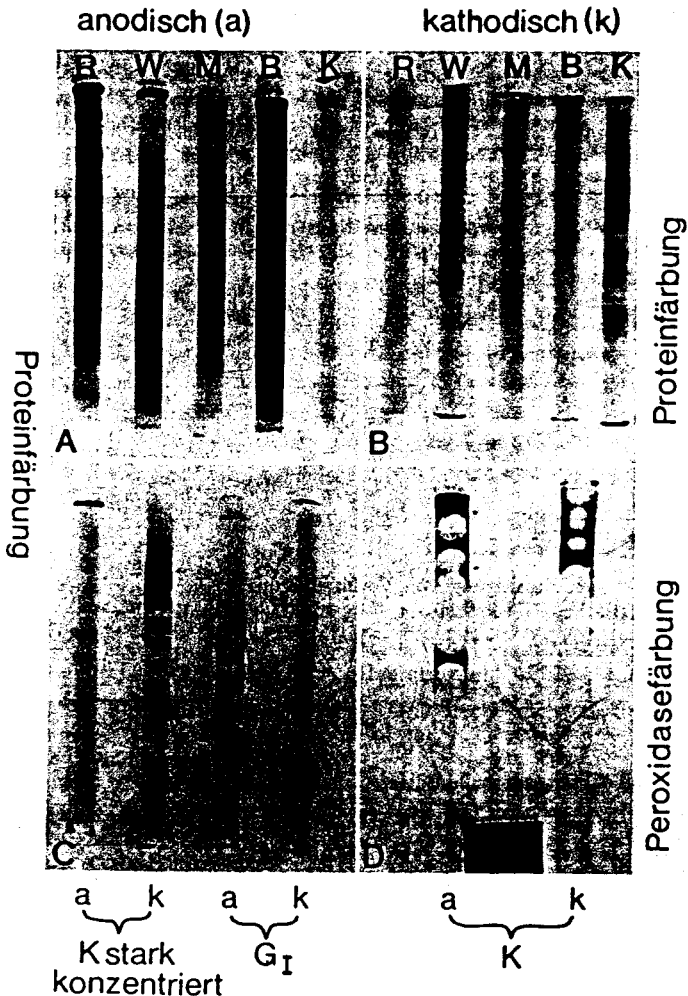


Fig. 1: a, b) Comparison of the pattern of proteins of the crude extract of different tobacco tissue after anodic and cathodic separation. c) Pattern of proteins of concentrated extract of tobacco callus and of group G_I isolated and purified from the crude extract. d) Pattern of peroxidases of the crude callus extract (R = cortex, W = root, M = pith, B = leaf, K = callus, a = anodic, k = cathodic).

odischen Bereich das vorherrschende Protein ist. Entsprechend der hohen Peroxidase-Gesamtaktivität im Kallus ist also mit einem hohen Anteil an Peroxidaseprotein im Kallusrohextrakt zu rechnen (vgl. Abb. 1).

Der Rohextrakt aus Tabak-Kallus färbt sich während der Extraktion braun an, was auf die Oxidation phenolischer Substanzen zurückzuführen ist (FIELDS and TYSON, 1973), die in Tabak-Geweben in größeren Mengen vorliegen (SHEEN, 1969). Zunächst wurde mit Sephadex G 25 (Medium), Polyclar AT (unlösliches Polyvinylpyrrolidon) Aktivkohle und Dowex 1-X 8 (200-400 mesh Cl-Form) versucht, diese störenden Farbstoffe zu entfernen. Keine der angewandten Methoden führte jedoch zu einem befriedigenden Resultat. Entweder war der Reinigungseffekt nur gering oder die Peroxidasen wurden gemeinsam mit den Farbstoffen adsorbiert. Der Rohextrakt blieb daher zunächst unbehandelt. Zur Proteinbestimmung wurden die Proteine wegen der störenden Farbstoffe mit TCA gefällt. Die Peroxidase-Isoenzymgruppen wurden nach dem in Material und Methoden gegebenen Schema getrennt und partiell gereinigt. Die Trennung wurde mit Hilfe der Disk-Elektrophorese kontrolliert (Abb. 2).

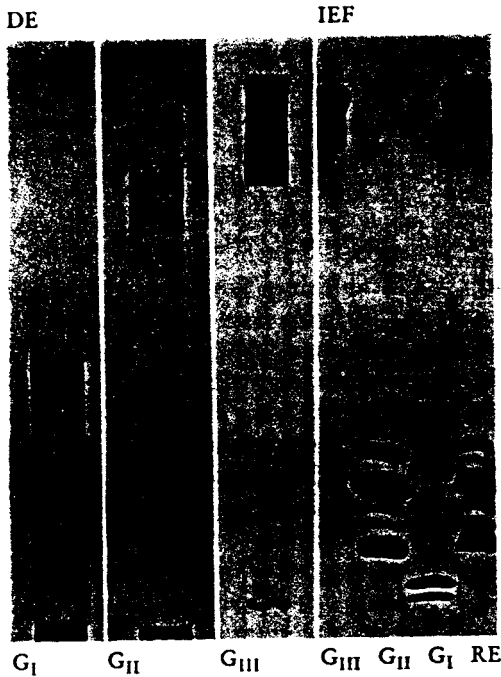


Fig. 2: Discelectrophoresis (DE) and isoelectric focusing (IEF) of the 3 groups of peroxidase isoenzymes after separation and purification. For comparison crude extract was separated by isoelectric focusing. In the crude extract activity of G_1 was very low at the pH of the isoelectric point. Purified G_1 on the other hand shows pronounced reaction.

Eine Bestimmung der spezifischen Aktivität der getrennten Gruppen bezogen auf die spezifische Aktivität des Kallusrohextraktes, der alle 3 Gruppen enthielt, ergab im einzelnen folgende Reinigungsfaktoren: G_I -3, G_{II} -25, G_{III} -54. Die große Diskrepanz zwischen G_I einerseits und G_{II} und G_{III} andererseits ist zunächst schwer erklärbar. Es muß jedoch beachtet werden, daß bei einem Vergleich des Peroxidase-Musters mit dem Protein-Muster des Kallusrohextraktes (Abb. 1) auch bei stärkerer Konzentration desselben an den Gelorten von G_{II} und G_{III} kein Protein nachzuweisen ist. Demnach handelt es sich bei G_{II} und G_{III} um Proteine mit hoher spezifischer Aktivität, bei G_I jedoch um solche mit geringer.

2. Isoelektrische Fokussierung

Die parallel durchgeführte IEF der getrennten Peroxidase-Gruppen und des Kallus-Rohextraktes zeigt nochmals deutlich die Reinheit der getrennten Gruppen (Abb. 2). Zusätzlich kann besonders im Fall der Gruppe G_I die Anreicherung gut demonstriert werden. G_I hat seine IP'e bei pH 4-4,5. Bei diesem pH ist die Aktivität der Peroxidase mit dem von uns verwendeten Guajakol als Substrat bereits stark vermindert, was in der schwachen Aktivität von G_I im Vergleich zu den anderen Gruppen beim Rohextrakt deutlich zum Ausdruck kommt (Abb. 2). Trotz des ungünstigen pH-Wertes zeigt die angereicherte G_I hier dennoch starke Färbung (Aktivität). (Abb. 2). Während im basischen Bereich für die Gruppe G_{III} keine wesentlichen Unterschiede zur DE-Trennung zu registrieren sind, führt die IEF der beiden sauren Gruppen G_I und G_{II} zu einer deutlichen Veränderung der Bandenzahl. Die Gruppen als solche bleiben aber erhalten.

3. Die Glykoproteinnatur der Peroxidase-Isoenzymgruppen

Bei den Peroxidasen handelt es sich in der Regel um Glykoproteine (SAUNDERS et al., 1965). Der Glykoproteincharakter von Proteinen läßt sich mit Hilfe von Con-A-Sepharose prüfen (DARBYSHIRE, 1973). Zum Nachweis des Glykoproteincharakters der drei Peroxidase-Isoenzymgruppen (G_I , G_{II} , G_{III}) wurden diese auf Con-A-Sepharose Säulen aufgetragen. Die Kontrolle wurde mit Serumalbuminlösung durchgeführt. Während die Serumalbuminlösung die Säule passierte, wurden die Peroxidase-Gruppen vollständig gebunden. Der Durchfluß enthielt keine Aktivität. Mit 10%iger D-Glucopyranosid-Lösung ließen sich die Gruppen wieder eluieren. Aufgrund dieser Untersuchungen ist damit zu rechnen, daß es sich auch bei den Tabak-Peroxidasen durchweg um Glykoproteine handelt. Den endgültigen Nachweis muß jedoch die Analyse des hochgereinigten Enzyms erbringen.

4. Die Molekulargewichte der Peroxidase-Isoenzymgruppen

Die Dodecylsulfat(SDS-)Elektrophorese in 10%igen Acrylamidgelen ist eine geeignete Methode, um die Molekulargewichte von Proteinen, die zwischen 10 000-70 000 liegen, zu bestimmen. Die MW'e pflanzlicher Peroxidase werden meist mit

30 000–50 000 angegeben. Durch die Behandlung der Proteine mit SDS und Mercaptoäthanol entstehen Polypeptide von der Form gestreckter Ellipsoide mit konstanter quer und variabler Längsachse, die dem Molekulargewicht proportional ist (MACHOLD, 1974). Die Wanderung in Gelen bestimmter Porengröße ist somit nur noch von der Molekülgröße abhängig (MACHOLD, 1974).

Table 1: Molecular weight of the isoenzyme groups prepared by SDS gel electrophoresis and thin layer chromatography.

	Peroxidasegruppen	SDS-Methode	Dünnschicht- chromatographie
G _I	I a	40 000 schwach	
	I b	34 500 schwach	
	I c	30 500 stark	26 500
	I d	27 500 stark	
G _{II}		46 000 stark	40 000
G _{III}	III a	50 000 schwach	
	III b	45 200 stark	47 000
	III c	43 500 schwach	

Die SDS-Mercaptoäthanol-Behandlung führte bei G_{II} zu einer Proteinbande, bei G_{III} zu drei und bei G_I zu vier Banden. Für jede Bande ergab sich ein MW (Tab. 1). Während die Banden von G_{II} und G_{III} ähnliche MW'e haben, weichen die von G_I deutlich ab. Da die Molekulargewichtsbestimmung von Glykoproteinen mit der SDS-Methode zu Abweichungen führen kann (MACHOLD, 1974) wurden die MW'e aller drei Gruppen auch nach der dünn-schichtchromatographischen Methode von MORRIS (1974) bestimmt. Es handelt sich bei dieser Methode im wesentlichen um die Trennung von Proteinen aufgrund des Molekülsiebefektes von Sephadex G 100. Diese Methode hat außerdem gegenüber der obigen den Vorteil, daß man spezifische Peroxidase-Färbungen durchführen kann und nicht auf die allgemeinen Proteinfärbungen angewiesen ist. Es wird somit das Miterfassen von Nicht-Peroxidase Protein vermieden. Für die 3 Peroxidasegruppen ergab sich jeweils nur ein einziges MW, das mit dem MW der entsprechenden Hauptbande der SDS-Methode annähernd identisch ist (Tab. 1). Da die für G_I gemessenen niedrigsten Werte bei 27 000 liegen, die von G_{II} und G_{III} aber zwischen 40 000 und 50 000 handelt es sich möglichenfalls um monomere und dimere Enzymproteine.

5. Temperatursensitivität und Temperaturoptima der Peroxidase-Isoenzymgruppen

Die Peroxidasen besitzen eine sehr hohe Temperaturresistenz, die bei einzelnen Isoenzymen unterschiedlich sein kann (GORDON und ALLDRIDGE, 1971). Um die Temperatursensitivität der drei Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabak-Kallus zu

testen, wurden diese bei verschiedenen Temperaturen (50, 70, 75 und 80 °C) inaktiviert und die Inaktivierungsgeschwindigkeiten gemessen (Abb. 3). Wie schon bei den Molekulargewichten zeigt auch hier G_I wieder ein von den beiden anderen Gruppen verschiedenes Verhalten. Während G_I bereits bei 50 °C deutlich hitzeinaktiviert

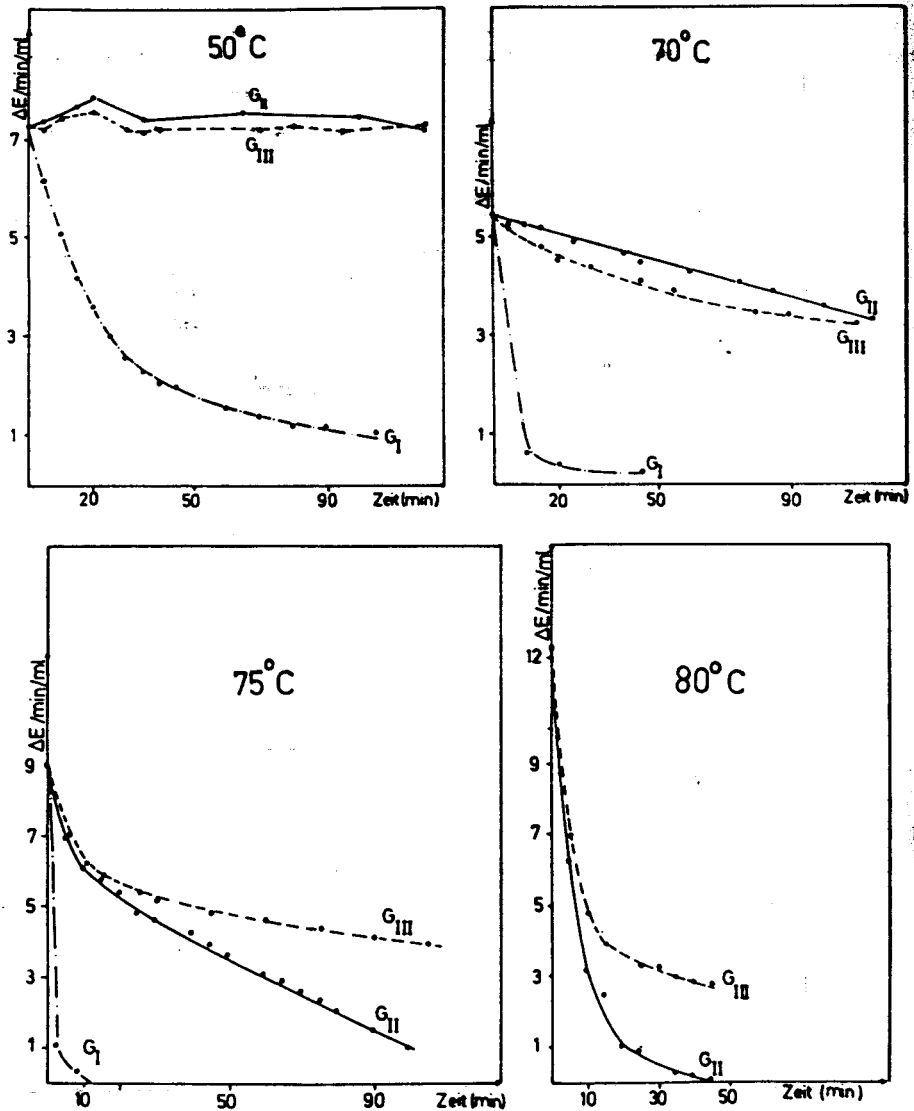


Fig. 3: Activity of the 3 groups at different temperatures. G_I was inactivated at a lower temperature than the two other groups.

ktiviert wird, ist eine Inaktivierung für G_{II} und G_{III} erst ab 70 °C messbar. Bei 80 °C erfolgt auch für G_{II} und G_{III} starke Hitzeinaktivierung.

Die Bestimmung der Temparturoptima führt zu einem entsprechenden Bild. G_{II} und G_{III} besitzen bei etwa gleicher Temperatur (65 °C) Optima, für G_I liegt es jedoch bei 43 °C. Die getrennten Peroxidase-Gruppen wurden in eingefrorenem Zu-

Table 2: Stability of the 3 groups of peroxidases at different conditions of storage.

Puffer	G _I	G _{II}	G _{III}	G _{III}	G _{III}	G _{III}	G _I	G _{II}	
	Tris/HCl, pH 8,5		Acetatp. pH 4,6				Tris/HCl, pH 8,5		
Lagertemperatur			-18 °C					+4 °C	
Ausgangsaktivität IE/min/ml	6	4,6	7,4	7,4	13	13	6,8	4,4	
Aktivitätsmessung nach			3 Wochen			2 Wochen			
		Wochen	Wochen						
IE/min/ml	6	4,3	4,5	5,2	6,8	12,8	6,8	4,4	
IE/min/ml nach 30 min	6	4,3	4	5,1	6,7	12,8	6,8	4,4	
IE/min/ml nach 60 min	6	4,3	3,7	4,8	6,5	12,5	6,8	4,4	
IE/min/ml nach 5 h	6	4,3	3,65	4,8	6,4	12,3	6,8	4,4	

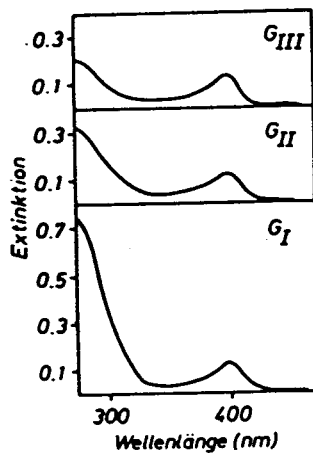


Fig. 4: Absorption spectra of the three groups of peroxidase isoenzymes. The maximum at 401 nm, typical for Ferriperoxidases, is identical for all 3 groups. Protein absorption at 275 nm is different.

stand gelagert. Die Gruppen G_I und G_{II} blieben dabei längere Zeit (9–18 Wochen) ohne jeden Aktivitätsverlust. G_{III} zeigte bereits nach 2 Wochen Lagerung einen Aktivitätsverlust bis 50%. Dieser war unabhängig vom pH-Wert und der Art des Puffers (Tab. 2). Die Lagerung der Gruppen bei 4 °C führte innerhalb von 2 Wochen bei keiner Gruppe zu einem Verlust an Aktivität.

6. Das Absorptionsspektrum der Peroxidase-Gruppen

Alle 3 Peroxidase-Gruppen zeigen das für Ferriperoxidasen charakteristische Absorptionsmaximum bei 401 nm (Abb. 4) (vgl. SHANNON et al., 1966). Der Quotient aus Absorption 401 nm/Absorption 275 nm erlaubt Aussagen über die Reinheit des Enzymes (SHANNON et al., 1966). Für hochgereinigte Peroxidase liegt er zwischen 3 und 4. Unsere Peroxidase-Gruppen hatten wesentlich niedrigere Werte, 0,173 für G_I , 0,395 für G_{II} und 0,620 für G_{III} . Aber auch hier zeigt sich wie bei den spezifischen Aktivitäten die deutlich geringere Reinheit von G_I gegenüber G_{II} und G_{III} .

Diskussion

Wie Tabelle 3, die eine Zusammenfassung der Ergebnisse enthält, zu entnehmen ist, unterscheiden sich die drei Peroxidase-Isenzymgruppen in einigen biochemischen Eigenschaften. Aufgrund der Absorptionsspektren handelt es sich bei allen drei Gruppen um echte Ferriperoxidasen. Die unterschiedliche Lokalisation und Physiologie der Gruppen (vgl. MÄDER et al., 1975 b und MÄDER et al., 1976) ist erwartungsgemäß mit der Ausbildung verschiedenartiger biochemischer Charakteristika der einzelnen Gruppen verknüpft. So ist z. B. nur G_{III} empfindlich gegenüber Einfrieren. Andererseits wird G_I bei 50 °C hitzeinaktiviert, G_{II} und G_{III} aber erst ab 70 °C. Auch bei den Molekulargewichten weicht G_I deutlich von den anderen beiden Gruppen ab. Ein Vergleich der DE-Muster der Gruppen mit den Mustern der

Table 3: Summary of main results.

	Disk- elektrophorese	Isoelektrische Fokussierung	Absorptions- maximum 401 nm	Glyko- protein	Molekular- gewicht	Hitze- inaktivierung	Kälte- inaktivierung
G_I			+	+	27 000	50°C	-
G_{II}			+	+	47 000	70°C	-
G_{III}			+	+	45 000	70°C	+

EF zeigt besonders für G_I und G_{II} Unterschiede, die vorläufig noch nicht interpretiert werden können (MÄDER und BOPP, 1976).

Durch Affinitätschromatographie mit Concanavalin A konnte für alle drei Peroxidase-Gruppen Glykoproteincharakter nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in gewissem Widerspruch zu dem von POWELL et al. (1975), die nur für eines von 4 Isoenzymen aus Tabak-Gewebekulturen Glykoproteincharakter fanden. Diese Autoren führten den Nachweis durch spezifische Färbung auf Kohlehydrat nach DE-Trennung der Enzyme. Wie wir jedoch zeigen konnten, liegen die Peroxidasen in den Gelen trotz hoher Guajakol-Aktivität in kaum nachweisbaren Proteinmengen vor. Möglichenfalls resultieren die unterschiedlichen Ergebnisse aus den verschiedenartigen Nachweismethoden. In der Regel handelt es sich bei den Peroxidasen jedoch um Glykoproteine (SAUNDERS et al., 1965; KAY et al., 1967) und es ist sehr unwahrscheinlich, daß die Tabak-Peroxidasen hierin eine Ausnahme machen.

Auch bei den MW'en kommen POWELL et al. (1975) zu anderen Ergebnissen. Während das höchste von uns ermittelte MW 50 000 beträgt, geben POWELL et al. (1975) für ein Isoenzym im kathodischen Bereich 68 000 und für eines im anodischen Bereich 89 000 an, bei Anwendung ähnlicher Methoden (SDS-Elektrophorese). Aber auch mit der anderen von uns eingesetzten Technik (Dünnschichtchromatographie) erhielten wir keine anderen Molekulargewichte.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, daß G_I gegenüber den beiden anderen Gruppen G_{II} und G_{III} eine gewisse Sonderstellung in biochemischer Hinsicht einnimmt, was mit den bisherigen Befunden über Physiologie und Lokalisation der 3 Gruppen gut übereinstimmt.

Wir danken Herrn Dr. H. P. BLASCHKOWSKI für Beratungen zur Ionenaustauschchromatographie; Herrn Prof. Dr. M. BOPP und Herrn Dr. H. BOTHE für Diskussionen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfe.

Literatur

- DARBYSHIRE, B.: The glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots. *Physiol. Plant.* 29, 293-297 (1973).
- FIELDS, M. A., and H. TYSON: Total phenolic content and peroxidase isozymes in *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry* 12, 2133-2143 (1973).
- GORDON, A. R., and N. A. ALLDRIDGE: Cytochemical localisation of peroxydase A' in developing stem tissues of extreme dwarf tomato. *Can. J. Bot.* 49, 1487-1496 (1971).
- KAY, E., L. M. SHANNON, and J. Y. LEW: Peroxidase Isozymes from horseradish roots. II Catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 242, 2470-2473 (1967).
- LOWRY, H. O., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- MACHOLD, O.: Molekulargewichtsbestimmung von Chloroplastenproteinen durch Dodecylsulfat-Gelelektrophorese. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)* 166, 149-162 (1974).
- MÄDER, M., Y. MEYER, und M. BOPP: Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L. *Planta (Berl.)* 122, 259-268 (1975 a).

- MÄDER, M., P. MÜNCH, und M. BOPP: Regulation und Bedeutung der Peroxidase Musteränderungen in sproßdifferenzierenden Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* (Berl.) 123, 257-265 (1975 b).
- MÄDER, M., und M. BOPP: Neue Vorstellungen zum Problem der Isoperoxidasen anhand der Trennung durch Disk-Elektrophorese und Isoelektrische Fokussierung. *Planta* (Berl.) 128, 247-253 (1976).
- MÄDER, M., Y. MEYER, und M. BOPP: Zellwandregeneration und Peroxidase-Isoenzym-Synthese isolierter Protoplasten von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* (Berl.) 129, 33-38 (1976).
- MÄDER, M.: Die Lokalisation der Peroxidase Isoenzymgruppe G_I in der Zellwand von Tabak-Geweben. *Planta* (Berl.) 131, 11-15 (1976).
- MORRIS, C. J. O. R.: Thin layer chromatography of proteins on Sephadex G-100 and G-200. *J. Chromatogr.* 16, 167-175 (1964).
- MURASHIGE, T., and F. SKOOG: A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* (CpH) 15, 473-457 (1962).
- NEVILL, D. M., and H. GLOSSMANN: Molekular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. *Methods in Enzymology* 32, 92-102 (1974).
- SAUNDERS, B. C., A. G. HOLMES-SIEDLE, and B. P. STARK: Peroxidase. Butterworth Washington D.C. (1964).
- SHANNON, I. M., E. KAY, and J. Y. LEW: Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241, 2166-2172 (1966).
- SHEEN, S. Y.: The distribution of polyphenols, chlorogenic acid oxidase and peroxidase in different plant parts of tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Phytochemistry* 8, 1839-1847 (1969).
- SIEGEL, B. Z., and A. W. GALSTON: The isoperoxidasen of *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 42, 221-226 (1967).
- POWELL, B. L., J. W. PICKERING, S. H. WENDER, and E. C. SMITH: Isoperoxidasen from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 14, 1715-1717 (1975).
- Dr. A. NESSEL und Dr. M. MÄDER, Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Hofmeisterweg 4, D-6900 Heidelberg, W-Germany.

Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften

II. pH-Optima, Michaelis-Konstanten, Maximale Oxidationsraten

On the Physiological Significance of the Isoenzyme Groups of Peroxidase from Tobacco Demonstrated by Biochemical Properties

II. pH-Optima, Michaelis-Constants, Maximal Oxidation-Rates

M. MÄDER, A. NESSEL und M. BOPP

Mit 7 Abbildungen

Eingegangen am 1. Oktober 1976 · Angenommen am 30. Oktober 1976

Summary

The present communication describes the determination of apparent Michaelis-constants of three peroxidase-isoenzyme-groups for several artificial (chemicals which are active in the peroxidase catalysed reaction) and natural substrates (compounds which are found in plants and which possibly act as electrondonors for H_2O_2 -reduction by peroxidases *in vivo*). G_I (cell wall located group) has lowest Michaelis-constants for artificial, G_{III} (protoplast located group) for natural substrates. Scopoletin is no substrate for G_{III} , but for G_I particularly and to some extent for G_{II} . Maximal oxidation rates of different flavan-derivatives are highest for G_I or G_{II} and lowest for G_{III} . The *in vitro* polymerisation of cumaryl- and coniferylalcohol to lignin-like-substances is catalysed by G_I and G_{II} to a substantial rate but hardly by G_{III} . All the isoenzyme groups exhibit indole-3-acetic oxidase but no phenol-oxidase-activity. The results are discussed in connection with several hypotheses of peroxidase-function and with the localisation of peroxidase-isoenzyme-groups in tissues of tobacco.

Key words: peroxidase, isoenzymes, kinetics, callus cultures, *Nicotiana tabacum*.

Einleitung

Die physiologische Rolle der Peroxidasen bleibt wegen der fast unbegrenzten Zahl künstlicher und natürlicher Substrate weiterhin unklar (vgl. BERLIN und BARZ, 1975). Unter künstlichen Substraten verstehen wir solche organische Verbindungen (meist Phenolderivate), die *in vitro* als Elektronendonatoren für die Reduktion des

H_2O_2 durch Peroxidasen verwendet werden können. Natürliche Substrate sind dagegen Verbindungen, die in pflanzlichen Zellen vorkommen und von Peroxidasen oxidiert werden.

Das Spektrum der natürlichen Substrate von Peroxidasen ist sehr mannigfaltig. Die Hauptschwierigkeit für den Nachweis einer bestimmten Funktion der Peroxidase ergibt sich nun daraus, daß es nicht ohne weiteres möglich ist zu zeigen, ob eine *in vitro* von der Peroxidase katalysierte Reaktion in der Zelle auch tatsächlich eine Rolle spielt. Das Problem wird dadurch noch kompliziert, daß stets mehrere Isoenzyme der Peroxidasen in einer Zelle vorkommen, die sich jedoch in Gruppen enger Verwandtschaft zusammenfassen lassen (NESSEL und MÄDER, 1977). Insbesondere die gleichartige Lokalisation der Isoenzyme einer Gruppe in der Zelle läßt auf eine ähnliche oder gleiche Funktion schließen. Um dieser Funktion näher zu kommen, sollen im Folgenden verschiedene physiologische und biochemische Eigenschaften der verschiedenen Gruppen untersucht werden, vor allem soll die Affinität verschiedener künstlicher und natürlicher Substrate für die 3 Isoenzymgruppen bestimmt und zu ihrer natürlichen Lokalisation in Beziehung gesetzt werden. Daraus lassen sich einige Anhaltspunkte über eine mögliche Funktion der Isoenzyme der Tabak-Peroxidasen ableiten.

Material und Methoden

Bereitung der Extrakte und Trennung der Gruppen

erfolgte nach den in Teil I (NESSEL und MÄDER, 1977) beschriebenen Methoden.

Bestimmung der pH-Optima mit verschiedenen Substraten

Zur Messung der pH-Optima der 3 Peroxidase-Isoenzymgruppen für die Substrate Guajakol, Benzidin und Chlorogensäure wurden für die einzelnen pH-Bereiche die nachstehenden Puffer eingesetzt: pH = 4–5,5 Acetatpuffer, pH = 5,8–8 Phosphatpuffer, pH = 9–10 Glycin/NaOH-Puffer. Die einzelnen Testansätze (insgesamt 3 ml) hatten folgende Zusammensetzung: für *Guajakol*; 0,1 M Puffer, 2 mM Guajakol, 2 mM H_2O_2 , 0,1 ml Enzymextrakt. Für *Benzidin*; 0,1 M Puffer, 1,7 mM Benzidin, 8 mM H_2O_2 , 20–50 μ l Enzymextrakt. Für *Chlorogensäure*; 0,1 M Puffer, 1 mM Chlorogensäure, 8 mM H_2O_2 , 50 μ l Peroxidase-Gruppen. Alle Reaktionen wurden durch Zugabe von H_2O_2 gestartet. Die Extinktionen wurden alle 15 sec (insgesamt 2 min) bei den Wellenlängen 470 nm für Guajakol, 600 nm für Benzidin und 400 nm für Chlorogensäure gemessen. Benzidin wurde in Methanol gelöst. Das Methanol lag im Ansatz jedoch sehr stark verdünnt vor. Kontrollversuche stellten sicher, daß das Lösungsmittel die Reaktion nicht beeinflusste.

Herstellung des Anthocyanrohextraktes aus Begonienblättern (Begonia dregei)

35 g Begonienblätter wurden mit 140 ml Aqua dest. 10 min am Rückflußkühler gekocht, danach 10 min abzentrifugiert (26 000 g). Der Überstand ergab den Extrakt, der wegen seines hohen Oxalsäuregehaltes stark sauer war (pH = 2). Für den Test wurde er auf pH = 5,2 eingestellt.

Bestimmung der IES-Oxidase Aktivität

Stammlösung 1: 2,4 Dichlorphenol $2,5 \times 10^{-4}$ M; Stammlösung 2: $MnCl_2 \times 4 H_2O$ 5×10^{-4} M; Stammlösung 3: Indole-3-Essigsäure $5,7 \times 10^{-4}$ M. Alle Stammlösungen wur-

den mit Phosphatpuffer pH = 5,8 angesetzt. Salkowski-Reagenz (nach GORDON und WEBER, 1951): 200 ml $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (5 %); 574 ml H_2O ; 225,5 ml H_2SO_4 (96 %). Nach PSENAKOVA und KOLEK (1972) verändert wurden je 3 ml Stammlösungen vereint und mit 6 ml verdünntem Peroxidaseextrakt gemischt. In Abständen von 5 min (Gesamtmeßdauer 1 h) wurde je 1 ml des Reaktionsgemisches entnommen und mit 2 ml Salkowski-Reagenz versetzt. Nach einer weiteren Stunde wurde die Extinktion bei 530 nm gemessen.

Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstanten (K_m)

Bei den verschiedenen Substraten wurden die K_m -Werte durch Auftragung nach Lineweaver-Burk bestimmt.

Testansätze für die Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstanten der künstlichen Substrate

Guajakol, gelöst in Puffer: 0,1 M Phosphatpuffer pH = 5,8; 3,3 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 470 nm. **p-Phenylendiamin**, gelöst in Methanol: 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6,4; 1,67 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 485 nm; **Benzidin**, gelöst in Methanol: 0,1 M Acetatpuffer pH = 4,8; 8 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 600 nm; **o-Tolidin**, gelöst in Methanol: 0,1 M Acetatpuffer pH = 5,8; 3 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 620 nm; **o-Dianisidin**, gelöst in Äthylenglykolmonomethyläther: 0,1 M Acetatpuffer pH = 5; 16 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 460 nm.

Testansätze für die Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstanten der natürlichen Substrate

Kaffeensäure, gelöst in Methanol: 0,1 M Acetatpuffer pH = 5; 14 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 450 nm. **Chlorogensäure**, gelöst in Puffer: 0,1 M Acetatpuffer pH = 5,5; 8 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 400 nm. **Ferulasäure**, gelöst in Methanol: 0,1 M Acetatpuffer pH = 5,5; 0,2 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 320 nm nach MACHACKOVA et al. (1975). **Scopoletin**, gelöst in Methanol: 0,1 M Phosphatpuffer pH = 5,8; 5 mM H_2O_2 ; Extinktionsmessung bei 600 nm.

Testansätze für Quercetin und Rutin

Gesamtmenge der Ansätze 3 ml. **Quercetin**, gelöst in Methanol: 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6; 0,33 mM H_2O_2 ; 33 mM Quercetin; 10 μl Peroxidaseextrakt. **Rutin**, gelöst in Puffer: 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6; 0,33 mM H_2O_2 ; 0,07 mM Rutin; 100 μl Peroxidaseextrakt. Die Peroxidasegruppen wurden vor Versuchsbeginn alle auf gleiche Guajakol-Aktivität eingestellt. Die Extinktionsabnahme wurde alle 15 sec bei 366 nm für Quercetin und alle 60 sec bei 350 nm für Rutin gemessen.

Testansatz für Anthocyanabbau (verändert nach JÜRGENSMEIER, 1972)

13,2 ml Anthocyanextrakt (siehe oben) pH 5,2; 0,6 mM H_2O_2 ; 0,1 ml Peroxidaseextrakt. Die Peroxidasegruppen wurden vor Versuchsbeginn mit Guajakol auf gleiche Aktivität eingestellt. In Abständen von 5 Minuten (Gesamtreaktionsdauer 30 min) wurde 1 ml des Reaktionsgemisches entnommen, mit der gleichen Menge 2 n HCl versetzt und bei 520 nm gemessen.

Testansatz für die Polymerisation von Coniferyl- bzw. Cumarylalkohol

0,1 M Phosphatpuffer pH = 5,8; 1 mM Coniferyl- bzw. p-Cumarylalkohol, gelöst in Methanol; 8 mM H_2O_2 ; 0,1 ml Peroxidaseextrakt. Die Peroxidasegruppen wurden vor Versuchsbeginn mit Guajakol auf gleiche Aktivität eingestellt. Messung der Zunahme der optischen Dichte der Lösung durch Bildung des Dehydrierungspolymerisates in Intervallen von 1 min bei 620 nm. Dauer der Messung 10 min.

Testansätze für die Bestimmung der Phenoloxidase-Aktivität

Gesamtmenge der Ansätze 3 ml. DOPA (*Dihydroxyphenylalanin*), gelöst in Methanol, Ansatz nach CONSTANTINIDES und BEDFORD (1967): 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6; 14 mM DOPA; 50–100 μ l Peroxidaseextrakt; Messung alle 30 sec bei 475 nm nach HOROWITZ et al. (1960). Chlorogensäure, gelöst in Puffer, Ansatz a) nach HOFER (1964): 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7; 3 mM Chlorogensäure; Extinktionsmessung bei 530 nm; Ansatz b) nach STAFFORD und GALSTON (1970): 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6; 1 mM EDTA; 0,1 mM Chlorogensäure; Messung der Extinktionsabnahme bei 326 nm. Brenzkatechin, gelöst in Methanol, Ansatz nach SHINSHI und NOGUCHI (1974): 0,1 M Phosphatpuffer pH = 6,5; 1 mM Brenzkatechin, Extinktionsmessung bei 420 nm.

Ergebnisse

1. Die pH-Optima der drei Peroxidase-Gruppen

Die pH-Optima der Peroxidase-Isozymgruppen wurden für die Substrate Guajakol, Benzidin und Chlorogensäure bestimmt. Bei ein und demselben Substrat sind die Unterschiede der pH-Optima zwischen den 3 Gruppen gering (Tab. 1). Bei den pH-Optima der verschiedenen Substrate gibt es jedoch Abweichungen. Der optimale Bereich der Peroxidase-Reaktion liegt nach diesen Messungen bei pH = 4,5–6. Das stimmt mit Werten von POWELL et al. (1975) und LEE (1973) für Tabak-Kallusperoxidase überein.

Table 1: Optimum pH of the 3 groups of peroxidase isoenzymes acting on different substrates.

Substrat	pH-Optimum		
	G _I	G _{II}	G _{III}
Guajakol	5,5	5,8	6,0
Benzidin	4,5	4,9	4,8
Chlorogensäure	5,8	5,5	5,5

Benzidin fällt zwischen pH = 5,8 und 6,8 aus, die Ausflockung ist bei pH = 6 am stärksten. Die pH-Optima der Peroxidase-Gruppen liegen aber außerhalb dieses nicht meßbaren pH-Bereichs (Tab. 1). Die exakte Bestimmung der pH-Optima an derer Substrate war nicht möglich, da sich die Absorptionsmaxima der Oxidationsprodukte mit dem pH-Wert der Lösung änderten (Abb. 1).

Phenylendiamin wird im sauren Bereich (bis pH = 5,8) allein durch H₂O₂ ohne Enzymzugabe oxidiert. Im alkalischen Bereich findet diese Reaktion nicht statt.

2. Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstanten für verschiedene künstliche Substrate

In der Gruppe der künstlichen Substrate wurden fünf organische Verbindungen zusammengefaßt, die normalerweise nicht in der pflanzlichen Zelle vorkommen. Es

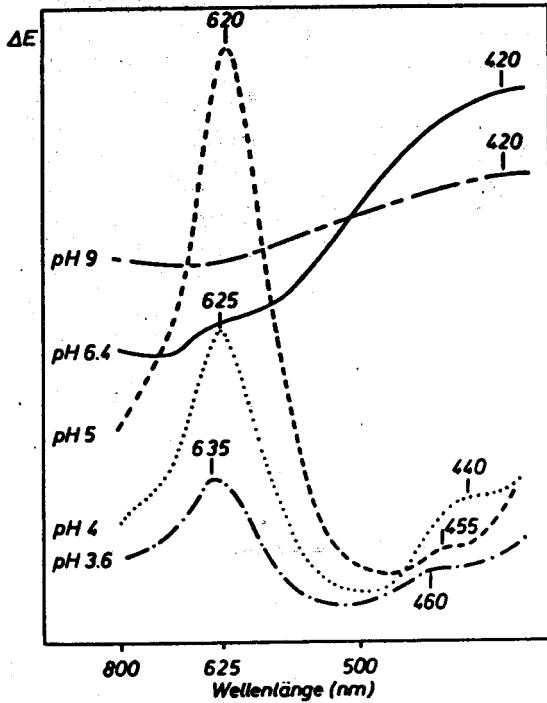


Fig. 1: Change of absorption in different pH values of the oxidation product of Tolidine.

handelt sich um Substanzen, die am häufigsten für den Nachweis von Peroxidase-Aktivität benutzt werden. Von diesen Substraten besitzt Guajakol die höchsten und o-Tolidin die geringsten K_m -Werte (Tab. 2). Vergleicht man die Affinitäten der 3 Peroxidase-Gruppen zu den verschiedenen künstlichen Substraten (Tab. 3), ergibt sich ein einheitliches Bild: Die G_I -Isoenzyme haben jeweils die höchste, die G_{III} -Isoenzyme die geringste Affinität.

Table 2: The affinity of the different artificial substrates for the 3 groups of peroxidase isoenzymes (K_m values).

Substrat	K_m -Werte (mM)		
	G_I	G_{II}	G_{III}
Guajakol	3,28	5,26	3,85
p-Phenylendiamin	0,29	2,27	1,35
Benzidin	0,285	0,6	0,37
o-Tolidin	0,07	0,39	0,32
o-Dianisidin	0,25	0,95	0,63

Table 3: Comparison of the affinity of the isoenzyme groups for «artificial» substrates. The sequence of affinity is the same for all the substrates tested.

Substrat	Affinitäten der Peroxidasegruppen
Guajakol	$G_I > G_{III} > G_{II}$
p-Phenylendiamin	$G_I > G_{III} > G_{II}$
Benzidin	$G_I > G_{III} > G_{II}$
o-Tolidin	$G_I > G_{III} = G_{II}$
o-Dianisidin	$G_I > G_{III} > G_{II}$

3. Bestimmung der apparenten Michaelis-Konstanten für verschiedene natürliche Substrate

Für diese Versuche wurden 4 Substanzen gewählt (Kaffeensäure, Chlorogensäure, Ferulasäure und Scopoletin), die alle in pflanzlichen Geweben, auch im Tabak, vorkommen. Sie sind als Substrate für Peroxidaseen bekannt (IMBERT und WILSON 1972; PICKERING et al., 1973; REIGH et al., 1973). Die K_m -Werte dieser Substrate für die 3 Peroxidase-Gruppen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Am auffälligsten ist, daß Scopoletin zu G_{III} keine Affinität besitzt. Von REIGH et al. (1973) wurde die Spezifität von Scopoletin für ein einziges Isoenzym aus Tabak-Gewebekulturen beschrieben.

Ein Vergleich der Substrataffinitäten der 3 Isoenzymgruppen (Tab. 5) ergibt anders als bei den künstlichen Substraten für G_{III} die höchste Affinität; G_I oder G_{II} .

Table 4: The affinity of the different «natural» substrates for the 3 groups of peroxidase isoenzyme (K_m values).

Substrat	K_m -Werte (mM)		
	G_I	G_{II}	G_{III}
Kaffeensäure	0,51	0,43	0,31
Chlorogensäure	0,625	0,8	0,15
Ferulasäure	0,125	0,11	0,057
Scopoletin	0,235	0,95	-

Table 5: Comparison of the affinity of the isoenzyme groups for «natural» substrates. The sequence of affinity is different from that of artificial substrates and not identical for all natural substances.

Substrat	Affinitäten der Peroxidasegruppen
Kaffeensäure	$G_{III} > G_{II} > G_I$
Chlorogensäure	$G_{III} > G_I > G_{II}$
Ferulasäure	$G_{III} > G_{II} = G_I$
Scopoletin	$G_I > G_{II}$

haben jeweils die niedrigeren Werte. Das Bild, das die natürlichen Substrate in der Reihenfolge ihrer Affinität zu den einzelnen Gruppen zeigen, ist uneinheitlicher. Darin deutet sich möglicherweise eine Spezifität der natürlichen Substrate an, die von physiologischer Bedeutung sein könnte.

4. Abbau verschiedener Flavanderivate durch die Peroxidase-Gruppen

Für alle nachfolgenden Substrate wurden nicht die apparenten Michaelis-Konstanten, sondern lediglich die Umsatzraten bzw. die maximalen Oxidationsraten (V_{max}) bestimmt. Es wurde stets im Substratüberschuß gearbeitet. Die Mengen des Enzyms wurden vor jeder Messung nach gleicher Guajakol-Aktivität eingestellt.

Der im zellfreien System untersuchte Abbau von Flavonolen durch Peroxidasen führt über 2,3 Dihydroxyflavanone zu einer Spaltung des Flavonoidgerüsts, wobei aus dem B-Ring die entsprechenden Benzoesäuren entstehen (HÖSEL et al., 1972). Verwendet für den Abbau wurde Quercetin und das Quercetin-Glycosid Rutin.

Ein Vergleich der Abbauraten zeigt, daß Rutin langsamer umgesetzt wird als sein Aglycon Quercetin (vgl. HÖSEL et al., 1975). Die Umsatzgeschwindigkeiten der einzelnen Gruppen sind für G_{III} oder G_{II} am geringsten und für G_I oder G_{II} am höchsten (Abb. 2 und 3). Auffallend ist das unterschiedliche Aktivitätsverhältnis von G_{II} in bezug auf Glycosid und Aglycon. Einmal hat G_{II} die höchste (Glycosid), einmal die niedrigste (Aglycon) Aktivität.

Die Anthocyane können nach JÜRGENSMEIER (1972) ebenfalls von Peroxidasen entfärbt werden. Die Untersuchung des Anthocyanabbaus durch die 3 Peroxidase-Gruppen (Abb. 4) zeigt, daß G_{III} wiederum die geringste Aktivität besitzt, so daß die hier untersuchten Flavonoide alle bevorzugt von G_I und G_{II} oxidiert werden.

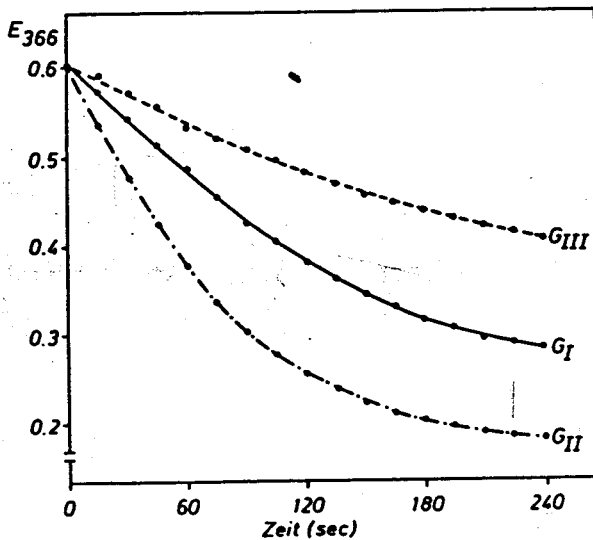


Fig. 2: Rate of turnover (V_{max}) of Quercetin by the 3 groups of peroxidase isoenzymes.

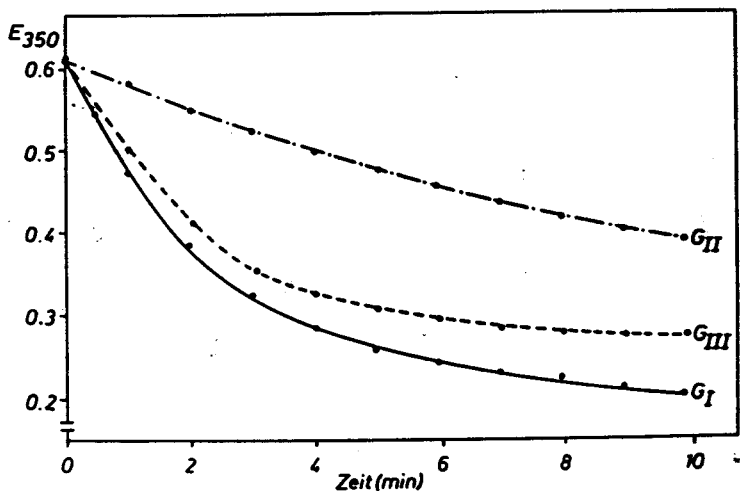


Fig. 3: Rate of turnover (V_{\max}) of Rutin by the 3 groups of peroxidase isoenzymes.

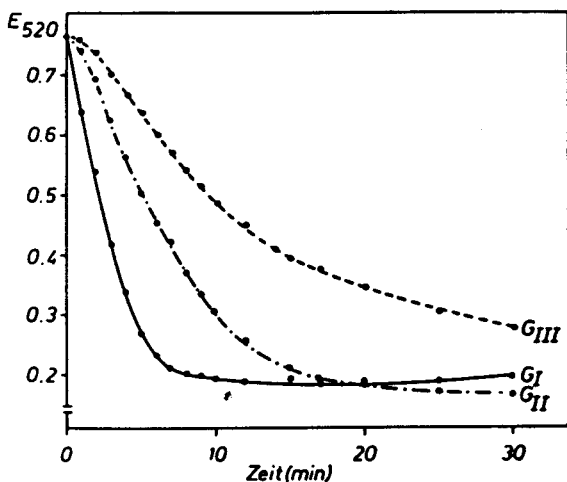


Fig. 4: Rate of oxidation of Anthocyanin by the 3 groups of peroxidase isoenzymes.

5. Polymerisation von Coniferyl- und Cumarylalkohol

Die natürlichen Vorstufen des Lignins Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapylalkohol, liegen normalerweise als Glykoside in der Pflanze vor. An den Orten der Ligninbildung (Zellwände) werden die Alkohole durch Glucosidasen freigesetzt und durch

oxidierende Enzyme (Peroxidase, Laccase) in das unlösliche Polymerisat Lignin überführt. Das Reaktionsprodukt entsteht nach einem über Radikale verlaufenden Kupplungsmechanismus (FREUDENBERG et al., 1952). *In vitro* läßt sich aus Coniferyl- bzw. Cumarylalkohol, nicht jedoch aus Sinapylalkohol, durch Zugabe von Laccase oder Peroxidase und H_2O_2 ein künstliches Lignin erzeugen, das nach FREUDENBERG (1956) dem natürlichen ähnlich ist.

Im vorliegenden Versuch wurde die Polymerisation von Coniferyl- und Cumarylalkohol durch die 3 Peroxidasegruppen untersucht. G_{III} zeigt im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen fast gar keine Reaktion, G_I ist in beiden Fällen die aktivste Gruppe (Abb. 5 und 6).

6. IES-Oxidase Aktivität der Peroxidase-Gruppen

Die Peroxidase oxidiert ohne H_2O_2 aber mit Mn^{2+} und Dichlorphenol als Cofaktoren IES. Es ist noch nicht klar, ob diese *in vitro* Reaktion eine physiologische Bedeutung hat. Die Untersuchung des IES-Abbaus durch die Peroxidasegruppen sollte

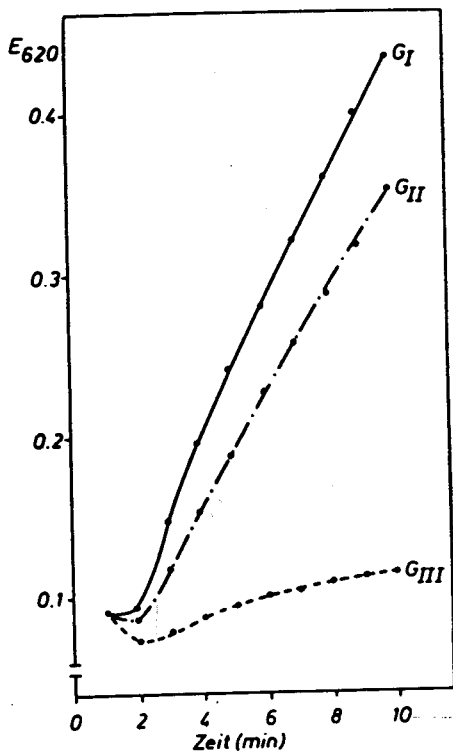


Fig. 5: Rate of polymerisation of Coniferylalcohol by the 3 groups of peroxidase isoenzyme.

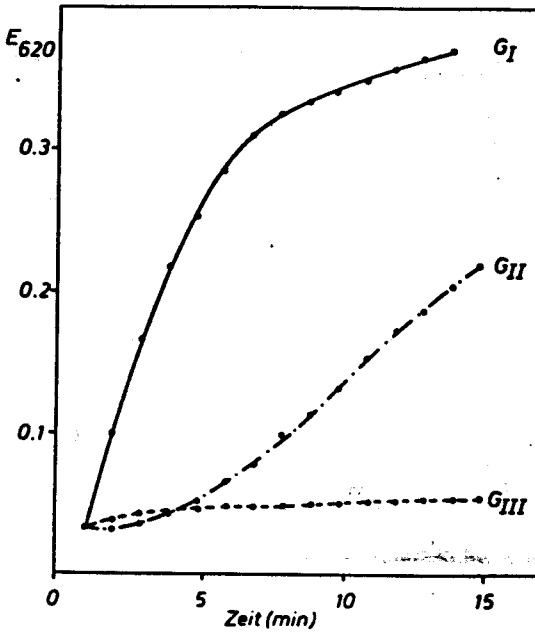


Fig. 6: Rate of polymerisation of Coumarylalcohol by the 3 groups of peroxidase isoenzyme.

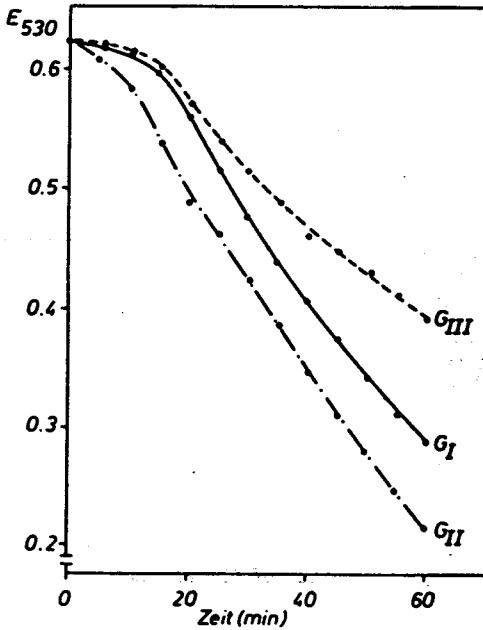


Fig. 7: Rate of oxidation of IAA by the 3 groups of peroxidase isoenzymes.

zeigen, ob möglicherweise die im Protoplasten lokalisierte G_{III} diese Reaktion bevorzugt katalysiert. G_{III} hat aber entgegen den Erwartungen eine geringere Aktivität als G_{II} und G_I (Abb. 7).

7. Phenoloxidase-Aktivität der Peroxidase-Gruppen

Eine Untersuchung der Phenoloxidase Aktivität der 3 Peroxidase-Gruppen mit den Substraten Dihydroxyphenylalanin, Chlorogensäure und Brenzkatechin ergab folgendes: Chlorogensäure und Brenzkatechin wurden ohne H_2O_2 Zugabe überhaupt nicht umgesetzt. Dihydroxyphenylalanin wurde bei Verwendung hoher Enzymkonzentrationen in geringem Maße oxidiert. Dabei war der Umsatz bei allen 3 Gruppen etwa gleich, was auf eine gewisse Verunreinigung der Peroxidasepräparationen mit Phenoloxidase schließen läßt.

Diskussion

Wenn wir annehmen, daß große Affinität auch hohe Umsatzraten beinhaltet, dann ist Scopoletin neben den beiden Ligninvorstufen Coniferyl- und Cumarylalkohol zweifellos das auffallendsten der getesteten Substrate. Es besitzt sehr hohe Affinität zur Isoenzymgruppe G_I , mittlere zu G_{II} und überhaupt keine zu G_{III} . Die ionisch in der Zellwand gebunden, ansonsten aber im Protoplasten lokalisierte Gruppe G_{III} (MÄDER et al., 1975 a) setzt demnach Scopoletin überhaupt nicht um. SCHAFFER et al. (1971) sowie REIGH et al. (1973) berichteten bereits von der Spezifität eines einzigen Isoenzym, A_3 , aus Tabak-Gewebekulturen zu Scopoletin (A_3 entspricht der Hauptbande von G_I). Sowohl SCHAFFER et al. (1971) als auch REIGH et al. (1973) arbeiteten jedoch mit sehr niedrigen Enzymkonzentrationen und fanden möglicherweise aus diesem Grunde nur für dieses eine Isoenzym aus Tabak-Kallus Scopoletin-Umsatz. Nach den vorliegenden Untersuchungen wird Scopoletin aber auch von G_{II} oxidiert. Die deutliche unterschiedlichen K_m -Werte von G_I und G_{II} schließen eine Verunreinigung von G_{II} durch G_I aus.

Scopoletin ist außer durch seine Spezifität gegenüber einigen Peroxidase-Isoenzymen noch durch seine Wirkung auf die IES-Oxidation von Interesse (IMBERT und WILSON, 1970). Aufgrund dieser Befunde wurde zeitweilig eine regulatorische Funktion von Scopoletin und anderen Cumarinen bei IES-Oxidation und Wachstum angenommen (SIROIS und MILLER, 1972). Inzwischen hat sich aber gezeigt, daß auch andere Verbindungen wie z. B. Chlorogensäure oder Kaffeesäure (IMBERT und WILSON, 1972) die gleichen Effekte ausüben und alle diese Substanzen kompetitive Hemmstoffe der IES-Oxidation sind, weil sie selbst umgesetzt werden (MILLER et al., 1975).

Die Gruppe G_I , die hohe Affinität zu Scopoletin besitzt, ist ausschließlich in der Zellwand lokalisiert (MÄDER, 1976) und zeigt hohe Umsatzraten für IES. Die im Protoplasten lokalisierte Gruppe G_{III} , für die vornehmlich eine Funktion beim IES-Abbau zu erwarten wäre, sofern die IES-Wirkung im Protoplasten stattfindet,

überhaupt keine Affinität zu Scopoletin und setzt IES von allen drei Gruppen am wenigsten um. Nach diesen Ergebnissen könnte eine Regulation der IES-Oxidation durch Cumarine nur in der Zellwand erfolgen.

Ist Scopoletin tatsächlich ein natürliches Substrat für die Peroxidase, dann sollte es in der Zellwand zu finden sein. Es müßte weiterhin geklärt werden, in welchen physiologischen Zusammenhängen die Scopoletin-Oxidation eine Bedeutung hat.

Die Lignifizierung der Zellwände erfolgt bekanntlich durch Polymerisation der Zimtsäurederivate Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapylalkohol in wechselnder Zusammensetzung (FREUDENBERG et al., 1952). Zunächst vermutete man in der Laccase das Enzym (FREUDENBERG, 1956), das diese Reaktion auch *in vivo* steuert. An die Stelle der Laccase trat später die Peroxidase (vgl. HARKIN und OBST, 1973). Bei der *in vitro* ablaufenden Polymerisation von Coniferyl- bzw. Cumarylalkohol mittels Peroxidase und H_2O_2 sind wieder die Gruppen G_I und G_{II} sehr aktiv, wohingegen G_{III} in dieser Reaktion kaum Aktivität zeigt. Allerdings ist G_{III} auch in den Zellwänden (MÄDER et al., 1975 a) in größeren Mengen vorhanden.

Die starke Polymerisationsreaktion der Gruppe G_I kann als Argument für die Lignifizierungshypothese gewertet werden, denn G_I ist die Gruppe der typischen Zellwandperoxidasen (MÄDER, 1976). Sie steht in physiologischem Zusammenhang mit der Ausbildung der Sekundärwände (MÄDER et al., 1976). Soeben wurde von ELSTNER und HEUPEL (1976) die Beteiligung von Zellwandperoxidasen an einer H_2O_2 -bildenden Reaktion beschrieben, was die physiologische Bestätigung der FREUDENBERGSCHEN Hypothese in greifbare Nähe rücken läßt.

Sieht man von den Flavanderivaten ab, dann zeigt sich für die Affinitäten der künstlichen und natürlichen Substrate ein klares Bild. Die künstlichen Substrate haben alle höchste Affinität zu G_I und die natürlichen zu G_{III} . Die hohe Affinität von G_{III} zu den natürlichen Substraten entspricht den Erwartungen, Enzym und Substrat sind innerhalb des Protoplasten lokalisiert. Die hohe Affinität von G_I zu den künstlichen Substraten kann mit einer weiteren Hypothese der Peroxidase-Funktionen, der Infektionsabwehr (SEEVERS et al., 1971), in Zusammenhang gebracht werden. Verstehen wir unter Infektionsabwehr nicht nur die gezielte Abwehr pathogener Organismen, sondern ganz allgemein die Unschädlichmachung fremder Stoffe, dann könnte die hohe Affinität von G_I zu den künstlichen Substraten eine sinnvolle Erklärung finden. Bei diesen wie bei allen anderen Untersuchungen ist vorauszusetzen, daß die Affinitäten (nicht zufallsbedingt durch die Stereochemie der Moleküle) tatsächliche physiologische Relevanz besitzen.

Die Substrate Quercetin, Rutin, Anthocyan und IES, die in der Regel im Protoplasten vorkommen, werden alle von G_I und G_{II} besser umgesetzt als von G_{III} . Konsequenterweise würden die Ergebnisse bedeuten, daß es sich nicht um natürliche Substrate für Tabak-Peroxidasen handelt. HÖSEL et al. (1975) sowie BERLIN und BARZ (1975), die eingehend den Abbau von Flavonolen an Suspensionskulturen von *Cicer arietinum* und anderen Pflanzen untersuchten, halten aufgrund ihrer Ergebnisse eine Beteiligung der Peroxidase *in vivo* für wahrscheinlich.

Alle drei Gruppen besitzen keine Phenol-Oxidase-Aktivität. Das stimmt überein mit Ergebnissen von SHEEN und CALVERT (1969) sowie SHINSHI und NOGUCHI (1975).

Wann auch die natürlichen Funktionen der Peroxidasen weiterhin hypothetischen Charakter haben, so konnte doch eindeutig gezeigt werden, daß die Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks nicht nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation und Bildung, sondern auch aufgrund ihrer Biochemie, verschiedenartige physiologische Funktionen ausüben müssen.

Wir danken Herrn Prof. H. GRIEBACH für Anregungen zu dieser Arbeit, Herrn Prof. H. NIMZ für die Überlassung von Coniferyl- und Cumarylalkohol und Herrn Dr. H. BOTHE für Diskussionen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen.

Literatur

- CONSTANTINIDES, S. M., und C. L. BEDFORD: Multiple forms of phenoloxidase. *J. Food Science* 32, 446-450 (1967).
- ELSTNER, E. E., und A. HEUPEL: Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* GILIB.). *Planta* 130, 175-180 (1976).
- FREUDENBERG, K.: Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angew. Chemie* 68, 508-512 (1956).
- FREUDENBERG, K., H. REZNIK, H. BOESENBERG, und D. RASENACK: Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. *Chem. Berichte* 85, 641-647 (1952).
- GORDON, S. A., und R. P. WEBER: Colorimetric estimation of indole-acetic acid. *Plant Physiol.* 26, 192-195 (1951).
- HARKIN, J. M., und J. R. OBST: Lignification in tress: Indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180, 296-297 (1973).
- HOFER, A.: Die intrazelluläre Lokalisation von Phenolasen im Tabakblatt. *Planta* 62, 137-159 (1964).
- HOROWITZ, N. H., M. FLING, H. L. MACLEOD, und N. SUEOKA: Genetic determination and enzymatic induction of tyrosinase in *Neurospora*. *J. Mol. Biol.* 296 (1960).
- HÖSEL, W., P. D. SHAW, und W. BARZ: Über den Abbau von Flavonolen in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen. *Z. Naturforschung* 27 b, 946-954 (1972).
- HÖSEL, W., G. FREY, und W. BARZ: Über den Abbau von Flavonolen durch pflanzliche Peroxidasen. *Phytochemistry* 14, 417-422 (1975).
- IMBERT, M. P., und L. A. WILSON: Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAA oxidase preparations from sweet potato. *Phytochemistry* 9, 1787-1794 (1970).
- - Effects of Chlorogenic and caffeic acids on IAA oxidase preparations from sweet potato roots. *Phytochemistry* 11, 2671-2676 (1972).
- JÜRGENSMEIER, H. L.: Untersuchung über ein Anthocyan-entfärbendes System und seine Wirkungsweise *in vitro* in *Begonia dregei*. Dissertation Heidelberg 1972.
- LEE, T. T.: On extraction and quantitation of plant peroxidase isozymes. *Physiol. Plant.* 29, 198-203 (1973).
- MACHACKOVA, I., K. GANCEVA, und Z. ZMRHAL: The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat. *Phytochemistry* 14, 1251-1254 (1975).
- MÄDER, M., Y. MEYER, und M. BOPP: Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 122, 259-268 (1975 a).
- MÄDER, M., P. MÜNCH, und M. BOPP: Regulation und Bedeutung der Peroxidase-Musteränderungen in sproßdifferenzierenden Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 123, 257-265 (1975 b).

- MÄDER, M., Y. MEYER, und M. BOPP: Zellwandregeneration und Peroxidase-Isoenzymen in diesen isolierter Protoplasten von *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 129, 33-38 (1976).
- MÄDER, M.: Die Lokalisation der Peroxidase-Isoenzymgruppe G₁ in der Zellwand von Tabak-Gewebe. *Planta* 131, 11-15 (1976).
- NESSEL, A., und M. MÄDER: Einige biochemische Eigenschaften der Peroxidase-Isoenzymgruppen aus Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* L. I. Trennung, Reinigung, chemische und physikalische Daten. *Z. Pflanzenphysiol.* 82, 235-246 (1977).
- PICKERING, J. W., B. L. POWELL, S. H. WENDER, und E. C. SMITH: Ferulic acid: A substrate for two isoperoxidases from *Nicotiana tabacum* tissue cultures. *Phytochemistry* 12, 2639-2643 (1973).
- POWELL, B. L., J. W. PICKERING, S. H. WENDER, und E. C. SMITH: Isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 14, 1715-1717 (1975).
- PSENAKOWA, T., und J. KOLEK: Studium der Enzymdegradation der Indolyl-3-Essigsäure in der Wurzel von Getreidemais (*Zea mays* L.). *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)* 163, 536-544 (1972).
- REIGH, D. L., S. H. WENDER, und E. C. SMITH: Scopoletin: a substrate for an isoperoxidase from *Nicotiana tabacum* tissue culture W-38. *Phytochemistry* 12, 1265-1268 (1973).
- SCHAFFER, P., S. H. WENDER, und E. C. SMITH: Effect of Scopoletin on two anodic isoperoxidases isolated from tobacco tissue culture W-38. *Plant Physiol.* 48, 232-233 (1971).
- SEEVERS, P. M., J. M. DALY, und F. F. CATEDRAL: The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiol.* 48, 353-360 (1971).
- SHINSHI, H., und M. NOGUCHI: Relationships between peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 14, 1255-1258 (1975).
- SIROIS, J. C., und R. W. MILLER: The mechanism of the scopoletin induced inhibition of the peroxidase catalysed degradation of indole-3-acetate. *Plant Physiol.* 49, 1012-1018 (1972).
- STAFFORD, H. A., and A. W. GALSTON: Ontogeny and hormonal control of polyphenol-oxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiol.* 46, 763-767 (1970).

Dr. M. MÄDER, Dr. A. NESSEL und Prof. Dr. M. BOPP, Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Hofmeisterweg 4, D-6900 Heidelberg, W.-Germany.