Über die Einwirkung von Tyrosinase auf Proteine

Von GUSTAV-ADOLF KAUSCHE und FRIEDRICH HAHN
Aus dem Institut für Virusforschung, Heidelberg

(Z. Naturforschg. **4 b**, 223—226 [1949]; eingegangen am 7. Mai 1949)

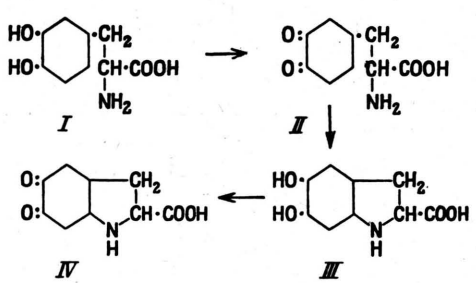
Durch kolorimetrische Tyrosin-Bestimmung wurde die Wirkung der Tyrosinase auf verschiedene Substrate verfolgt. In den untersuchten Proteinen: Eialbumin, Casein, Tabakmosaikvirus-Protein und Spaltprotein aus Tabakmosaikvirus ist das im Peptidverband enthaltene Tyrosin durch Tyrosinase nicht oxydierbar. Die fermentative Aktivität von Pepsin wird durch Tyrosinase-Einwirkung nicht spezifisch gehemmt.

Es ist anzunehmen, daß cyclische Aminosäuren, vor allem Tyrosin, eine besondere Bedeutung für die biochemischen Funktionen von Proteinen besitzen. So fanden Herriot und Northrop[1] und Herriot[2], daß Acetylierung mit Keten beim Pepsin zur Inaktivierung führt, wenn die Reaktion so weit fortschreitet, daß die OH-Gruppen des Tyrosins davon erfaßt werden. Ferner stellte Herriot[3] fest, daß Jodierung des Pepsins ebenfalls zum Aktivitätsverlust führt. Dabei wird das Jod von den Phenylresten des Tyrosins aufgenommen; aus dem hydrolysierten Jodpepsin konnte Dijodtyrosin isoliert werden.

Analoge Versuche wurden am Tabakmosaikvirus (TMV) durchgeführt. Anson und Stanley[4] studierten die Jodeinwirkung auf TMV und stellten fest, daß zwar eine Oxydation der SH-Gruppen zur Disulfidstufe die pathogene Aktivität des Virusproteins nicht beeinflußt, daß jedoch die Einführung von Jod in die Tyrosinreste des Proteins völligen Aktivitätsverlust und teilweise Denaturierung bewirkt. Auch in diesem Falle reagieren die Tyrosinreste unter Bildung von Dijodtyrosin. Schramm und Müller[5,6] berichteten über die Einwirkung von Keten und Phenylisocyanat auf das TMV, wobei zunächst voll-aktive Derivate der Aminogruppen erhalten wurden, ein Befund, der von Miller und Stanley[7] bestätigt werden konnte. Der bei längerer Ketenein:wirkung beobachtete Aktivitätsverlust wurde von Schramm und Müller in Analogie zu den Herriotschen Arbeiten[1,2] auf die Veresterung der Hydroxylgruppen des Tyrosins zurückgeführt, ohne daß allerdings eine quantitative analytische Bestimmung der Umsetzungsrate geglückt wäre.

Durch die zitierten Untersuchungen wurde gezeigt, daß die *intakten* Tyrosinreste für die Aktivität der Proteine notwendig sind. Es liegt daher der Gedanke nahe, durch genau definierte chemische Eingriffe in diese Tyrosinreste die Bedeutung dieser Gruppen für die biochemische Aktivität weiter zu studieren.

Als derartiger spezifischer Eingriff wurde die Wirkung der Tyrosinase angesehen. Bei diesem Ferment handelt es sich um eine den Hämocyaninen verwandte kupferhaltige Oxydase, die den molekularen Sauerstoff der Luft auf Phenole überträgt. Nach Raper (1923—1935) bewirkt die Tyrosinase am Tyrosin zuerst die Bildung von Dioxyphenylalanin (I), aus dem durch Dehydrierung der beiden phenolischen OH-Gruppen das o-Chinon (II) entsteht. Dann erfolgt ein Ringschluß, wobei der freiwerdende Wasserstoff an die Chinon-Sauerstoffatome wandert (III). Diese Substanz wird wiederum dehydriert zu jener charakteristischen roten Substanz (IV), die bei der



[1] R. M. Herriot u. J. Northrop, J. gen. Physiol. **18**, 35 [1934].
[2] R. M. Herriot u. J. Northrop, J. gen. Physiol. **19**, 283 [1935].
[3] R. M. Herriot u. J. Northrop, J. gen. Physiol. **20**, 335 [1937].
[4] M. L. Anson u. W. M. Stanley, J. gen. Physiol. **24**, 679 [1941].
[5] G. Schramm u. H. Müller, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **266**, 43 [1940].
[6] G. Schramm u. H. Müller, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 267 [1942].
[7] G. L. Miller u. W. M. Stanley, Science [New York] **93**, 428 [1941].

Tyrosinase-Tyrosin-Reaktion stets beobachtet wird. Der weitere Weg, der zum Melanin als letzter Stufe führt, geht dann ohne Mitwirkung des Ferments vor sich.

Diese Reaktionsfolge spielt sich am freien Tyrosin als Substrat ab. In Proteinen ist das Tyrosin jedoch mit seiner Alaninkette im Peptidverband gebunden. Ein Ringschluß, entspr. dem Stoff III, könnte also dort nicht stattfinden, und es wäre zu erwarten, daß als Ergebnis der Tyrosinase-Einwirkung lediglich der Eintritt einer zweiten OH-Gruppe in die Tyrosinreste erfolgt und der Vorgang bei dieser Dioxyphenylalanin-Stufe stehen bleibt.

Da die der OH-Gruppe im Tyrosin benachbarte Stelle, an die bei der Oxydation zum Dioxyphenylalanin die zweite OH-Gruppe tritt, die gleiche ist, an der bei Jodierung das Jod eintritt, so liegt es auf der Hand, daß in der Tyrosinase-Einwirkung die Möglichkeit gegeben wäre, die Bedeutung dieser Stelle für die biologische Aktivität des betreffenden Proteins zu untersuchen.

Zunächst wurde nun nach einer Reaktion gesucht, die es gestatten sollte, die Bildung von Dioxyphenylalanin in Proteinen unter der Wirkung der Tyrosinase nachzuweisen. Geeignet erschien eine Farbreaktion mit Ammonmolybdat, die von Rae[8] zur Bestimmung von Adrenalin benutzt worden war und spezifisch für *o*-Diphenole ist. Weiterhin fällt die Folinsche Phenolreaktion bei Dioxyphenylalanin viel stärker aus als bei Tyrosin, so daß auch an dem verstärkten Ausfall dieser Reaktion der weitere Eintritt einer OH-Gruppe verfolgbar wäre.

Bei der Prüfung der Reaktion Tyrosin—Tyrosinase wurde aber festgestellt, daß sich mit keinem der beiden Reagenzien eine Bildung von Dioxyphenylalanin nachweisen läßt. Das war auch nicht zu erwarten, da das primär gebildete Dioxyphenylalanin sofort weiter umgesetzt wird und keine analytisch nachweisbaren Konzentrationen erreicht.

Auch bei den untersuchten Proteinen (Eialbumin, Casein und TMV) konnte selbst nach 24-stdg. Einwirkung der Tyrosinase keine positive Farbreaktion auf Dioxyphenylalanin beobachtet werden. Allerdings war die Eigenfarbe der Versuchsansätze ziemlich dunkel, hervorgerufen durch eine schwärzliche Färbung der Fermentpräparate, die sich auch bei einer mehrere Stufen umfassenden Reinigung (s. Beschreibung der Versuche) nicht ausschließen ließ.

Um nun sicher festzustellen, ob die Tyrosinase auf das im Peptidverband befindliche Tyrosin fermentativ einwirkt, wurde die Abnahme des Tyrosins in den Hydrolysaten der entsprechenden Versuchsansätze untersucht. Bernhart[9] hat die Millonsche Reaktion auf Tyrosin zu einer quantitativen kolorimetrischen Mikromethode ausgearbeitet, bei der die zu untersuchenden Proteine einer alkalischen Hydrolyse unterworfen werden.

Zunächst wurde festgestellt, daß Dioxyphenylalanin, das erwartete Produkt der Reaktion mit Tyrosinase, in dem in Frage kommenden Konzentrationsbereich die Millon-Bernhartsche Reaktion *nicht* gibt.

Ferner zeigte sich, daß diese Reaktion auch bei freiem Tyrosin, wenn es in Gegenwart von Proteinen bestimmt werden soll, negativ ausfällt. Durch die Abnahme des Tyrosins im Versuchsansatz läßt sich daher die Tyrosinase-Wirkung bestimmen. Daraufhin wurden die Mischungen von Ferment und den jeweiligen Substraten (Tyrosin, TMV, TMV-Spaltprotein[10] und Eialbumin) im ganzen hydrolysiert. Die bei Versuchsbeginn gefundenen Tyrosingehalte setzen sich additiv aus dem Eigengehalt des Ferments, der als Blindwert betrachtet wird, und den Gehalten der Substrate zusammen.

Beobachtet wurde, daß in dem Tyrosin-Tyrosinase-Ansatz der Tyrosingehalt im Verlaufe von 8 Stdn. bis fast auf den Eigengehalt des Fermentpräparats heruntergeht. Das Substrat-Tyrosin wurde also im Laufe dieser Zeit durch die Tyrosinase quantitativ umgesetzt.

Bei den untersuchten Proteinen blieb der Tyrosin-Anfangswert jedoch über 24 Stdn. Einwirkungszeit hinweg konstant. Es erfolgte also keine Umsetzung des Substrat-Tyrosins unter dem Einfluß der Tyrosinase. Nach diesen Versuchen scheint Tyrosinase nicht imstande zu sein, an den Tyrosinresten in Proteinen oxydierend anzugreifen. Um dieses Resultat auch physiologisch-chemisch zu stützen, wurde die Wirkung von Tyrosinase auf die Aktivität von Pepsin untersucht.

Als Substrat diente das TMV-Spaltprotein, das von einer 0,05-proz. Pepsinlösung bei p_H 3,0 in etwa 6 Stdn. abgebaut wird. Pepsin, das über

[8] J. Rae, Pharmac. J. **125**, 451 [1930].
[9] F. W. Bernhart, J. biol. Chemistry **123** [1938].
[10] E. Pfannkuch, Biochem. Z. **306**, 125 [1940].

Nacht bei p_H 6,5 (dem Optimum der Tyrosinase) der Wirkung von Tyrosinase ausgesetzt war, wurde mit solchem Pepsin verglichen, das unbehandelt war, bzw. solchem, dem erst zu Versuchsbeginn bei p_H 3,0 (bei dem Tyrosinase unwirksam ist) eine entsprechende Menge Tyrosinase zugesetzt worden war. Beide tyrosinasehaltigen Pepsinpräparate zeigten eine geringe Hemmung in den ersten 2 Stdn. der Verdauung, während der Verlauf von der 3. Stde. an mit demjenigen der unbehandelten Kontrolle gleichlaufend war. Eine spezifische Hemmung der Pepsinwirkung durch Tyrosinase wurde also nicht beobachtet. Die anfängliche unspezifische Hemmung kann auf die mit dem Tyrosinase-Präparat zugefügten Ballaststoffe zurückgeführt werden.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der Tyrosinase

5 kg gut gewaschene Kartoffeln werden mit der Schale durch den Fleischwolf gedreht und mit Eisstücken vermischt. Dann wird der Saft abgepreßt, die ausfallende Stärke abzentrifugiert und die Flüssigkeit mit 1/4 ihres Volumens eiskaltem Chloroform 20 Min. geschüttelt. Wichtig ist, daß eine innige Durchmischung des Preßsaftes mit dem Chloroform erfolgt. Darauf wird die Hauptmenge des Chloroforms im Scheidetrichter abgetrennt und der Preßsaft in den Eisschrank gestellt. Am nächsten Tage wird das herausgealterte Eiweiß zusammen mit Chloroformresten abzentrifugiert und der klare Überstand mit so viel Ammoniumsulfat z. A. versetzt, daß die Sättigung 70% beträgt (52 g auf 100 cm³ Preßsaft). Dann wird zentrifugiert, das Sediment in 0,1-proz. Natriumcarbonatlösung gelöst (aus 1,6 *l* Preßsaft 700 cm³ gelöstes Sediment) und mehrere Tage lang in der Kälte gegen häufig gewechselte 0,1-proz. Natriumcarbonatlösung dialysiert, bis es frei von Sulfationen ist. Die Fermentlösung ist klar, jedoch schwärzlich gefärbt. Sie ist im Eisschrank einige Wochen haltbar, wobei die Aktivität allmählich absinkt.

Bestimmung der Aktivität: Je 0,5 cm³ Fermentlösung werden einmal mit 4,5 cm³ Phosphat-Puffer (p_H 6,5) und einmal mit 4,5 cm³ gesättigter Tyrosinlösung in dem gleichen Puffer versetzt. Als Maß für die Aktivität dient die Zeit in Minuten, die bis zum ersten Auftreten einer Rotfärbung in dem tyrosinhaltigen Ansatz, verglichen mit der Kontrolle, auftritt. Bei den nach vorliegender Vorschrift gewonnenen Fermentpräparaten beträgt diese Zeit etwa 10 Minuten.

Nach der Methode von Willstätter und Stoll[11] wurde festgestellt, daß das Fermentpräparat frei von Peroxydase war. Eine wasserstoffperoxydfreie Kontrolle ergab die gleiche Purpurogallinzahl wie der Versuchsansatz mit H_2O_2.

Molybdatreaktion auf Dioxyphenylalanin

Abgestufte Mengen einer 0,01-proz. Lösung von Brenzcatechin oder Dioxyphenylalanin wurden mit 0,5 cm³ 10-proz. Ammonmolybdatlösung versetzt und auf 11 cm³ mit Wasser aufgefüllt. Die Gelbfärbung wurde im lichtelektrischen Lange-Kolorimeter in 10-mm-Mikroküvetten mit Filter BG 5 gegen Wasser als Vergleichslösung kolorimetriert. Bis zur Konzentration von 0,5 mg Brenzcatechin bzw. 0,8 mg Dioxyphenylalanin erwies sich das Lambert-Beersche Gesetz als gültig. Wahrscheinlich reicht dessen Gültigkeitsbereich noch in erheblich höhere Konzentrationen hinauf. Bei Prüfung von dioxyphenylalaninhaltigen Lösungen mit Eigenfarbe muß gegen eine entspr. verdünnte wäßrige Blindlösung dieser Versuchsprobe kolorimetriert werden.

Verfolgung der Tyrosinase-Wirkung durch Tyrosin-Bestimmung

Je 0,5 cm³ der folgenden Substrate wurden mit 0,25 cm³ Ferment und 0,25 cm³ Boratpuffer (p_H 7) versetzt: TMV 10 mg/cm³, Spaltprotein daraus[10] mit etwa 8,5 mg/cm³, Eialbumin 10 mg/cm³ und Tyrosin gesättigt etwa 0,4 mg/cm³. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 Stdn. wurde durch Zugabe von 1 cm³ 50-proz. NaOH unterbrochen und anschließend durch 5-stdg. Erhitzen im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Als Blindwert wurde eine Probe von 0,25 cm³ Ferment + 0,75 cm³ Wasser in gleicher Weise mit 1 cm³ 50-proz. NaOH hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 3 cm³ 7-*n*. Schwefelsäure sowie mit 1,5 cm³ 15-proz. $HgSO_4$ (gelöst in 5-*n*. Schwefelsäure) versetzt. Dann wurde 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 10 Min. bei 3500 U/min zentrifugiert und vorsichtig abgegossen. Dann wurde je 1 cm³ 7-*n*. Schwefelsäure und

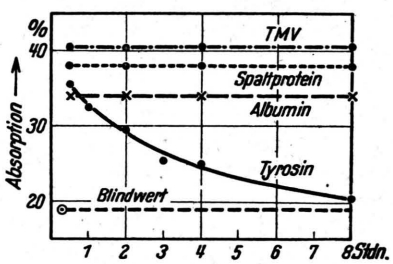


Abb. 1. Einwirkung von Tyrosinase auf Tabakmosaikvirus, Tabakmosaikvirus-Spaltprotein, Eialbumin und Tyrosin. Tyrosin-Eigengehalt der Tyrosinase als Blindwert.

0,2-proz. $NaNO_2$ hinzugefügt, umgeschüttelt, auf 11 cm³ aufgefüllt und nochmals umgeschüttelt. Nach 15 Min. wurde in 10-mm-Mikroküvetten gegen Wasser als Blindlösung mit dem Grünfilter VG 9 (Schwerpunkt bei 530 mμ) im Lange-Kolorimeter kolorimetriert. Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit der Absorptionen von

[11] Rona, Fermentmethoden, Springer, Berlin 1931, S. 379.

der Einwirkungszeit der Tyrosinase. In dem Versuchsansatz, der Tyrosin als Substrat enthält, geht der Tyrosingehalt auf den Blindwert (Tyrosin-Eigengehalt des Ferments) zurück, während alle anderen Substrate keine Abnahme ihrer Tyrosingehalte unter dem Einfluß der Tyrosinase zeigen.

Prüfung der Tyrosinasewirkung auf die fermentative Aktivität von Pepsin

Eine Lösung von 0,5 g Pepsin in 5 cm³ 10-proz. NaCl + 5 cm³ Glycerin wurde mit 500 cm³ Wasser verdünnt. Von dieser Stammlösung wurden 50 cm³ mit 45 cm³ Phosphatpuffer ($m/20$, p_H 6,5) und 5 cm³ Tyrosinase versetzt und 20 Stdn. bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen.

Am nächsten Tage wurde eine Probe der Pepsin-Stammlösung mit Citratpuffer ($m/10$, p_H 3,0) auf den gleichen Verdünnungsgrad wie der Versuchsansatz gebracht und weiterhin ein Ansatz gemacht, der ebenfalls mit dem Puffer p_H 3,0 verdünnt wurde, aber außerdem die gleiche Tyrosinase-Menge enthielt wie der Versuchsansatz. Von diesen drei Pepsinproben wurden je 15 cm³ mit 15 cm³ Citratpuffer (p_H 3,0) versetzt; als Substrat wurde 0,5 cm³ TMV-Spaltprotein hinzugefügt. Die dabei trübe werdenden Ansätze wurden in die 30-mm-Mikroküvetten des Lange-Kolorimeters (mit Hals und eingeschliffenem Stopfen) eingefüllt und bei 37° in den Brutschrank gestellt. Als Vergleichslösung diente bei den tyrosinasehaltigen Proben eine mit Wasser verdünnte Tyrosinaselösung von dem Verdauungsansatz entsprechender Konzentration, bei der tyrosinasefreien Kontrolle Wasser. Unter Verwendung von *einer* Photozelle wurde die Durchlässigkeit der Vergleichslösungen jeweils auf 100% eingestellt und die Aufhellung der Trübung in den Verdauungsansätzen stündlich gemessen.

Abb. 2 zeigt den Verlauf der Pepsineinwirkung auf das Substratprotein. Wie ersichtlich, erfahren die bei-

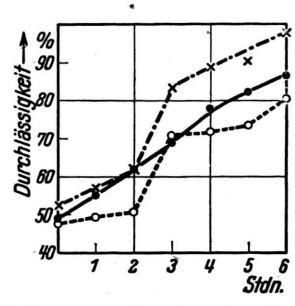


Abb. 2. Aktivität von Pepsin, das der Wirkung von Tyrosinase ausgesetzt war. ------ Versuch; —·—·— tyrosinasehaltige, ——— tyrosinasefreie Kontrolle.

den tyrosinasehaltigen Proben eine Hemmung in den ersten zwei Versuchsstunden. Von da ab verlaufen alle drei Reaktionskurven etwa gleich. Eine spezifische Hemmung des Pepsins, das vorher der Wirkung der Tyrosinase ausgesetzt war, ist nicht zu beobachten.

Strahlenbiologische Versuche mit schnellen Elektronen und Röntgenstrahlen an Drosophila-Puppen

Von Wolfgang Dittrich, Wolfgang Paul, Gotthold Salz und Gerhard Schubert

Aus der Universitäts-Frauenklinik Göttingen
und dem II. Physikalischen Institut der Universität Göttingen

(Z. Naturforschg. **4b**, 226—229 [1949]; eingegangen am 14. April 1949)

An 12—24 Stdn. alten Puppen von *Drosophila melanogaster* wurde nach Bestrahlung mit schnellen Elektronen (4 MeV) die Absterberate in Abhängigkeit von der Dosis bestimmt. Parallelversuche wurden mit Röntgenstrahlung (180 kV, 0,25 mm Cu) durchgeführt. Die Halbwertdosis für schnelle Elektronen wurde etwas größer als die Halbwertdosis für Röntgenstrahlung gefunden. Der Unterschied liegt aber innerhalb der Ungenauigkeit, mit der der Absolutwert der Dosis bekannt ist. Die beobachtete wahrscheinlichste formale Trefferzahl ist für schnelle Elektronen kleiner als für Röntgenstrahlung. Die Größe des formalen Treffbereiches wird angegeben.

Die Puppe der Taufliege *Drosophila melanogaster* erschien uns nach den bisher in der Literatur niedergelegten Erfahrungen[1] geeignet, die Wirksamkeit schneller Elektronen und Röntgenstrahlen auf biologische Objekte vergleichend zu überprüfen und die sich ergebenden Schädigungskurven theoretisch zu deuten.

In sämtlichen Versuchen[2] wurde ein genotypisch einheitlicher Wildstamm („normal Berlin") von *Drosophila melanogaster* benutzt. Das Heranzüchten der Larven erfolgte in weithalsigen Glasgefäßen auf

[1] A. Liechti, W. Minder u. J. H. Müller, Strahlenbiologische Versuche mit Drosophila-Puppen. Strahlentherap. **63**, 689 [1938]; A. Liechti u. J. H. Müller, Strahlentherap. **57**, 284 [1936].

[2] Die experimentellen Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Landesversicherungsanstalt Hannover durchgeführt.