

sodium diethylbarbiturate buffer, pH 8.6, ionic strength 0.1, for 12 h. The strips were then stained with amylo-schwarz. Under the present conditions, 4 protein components were seen (Fig.). Their percentage distribution (average of 10 determinations) was respectively 26.1, 18.4, 33.2, and 22.3.

MARIA ASSUNTA DIANZANI MOR

Istituto di Patologia generale della Università di Genova (Italia), July 26, 1959.

Riassunto

Viene descritta la presenza, nel succo dei sarcosomi del muscolo di ratto, di 4 componenti proteici separabili mediante elettroforesi su carta. I 4 componenti sono rappresentati nella misura di rispettivamente 26.1, 18.4, 33.2 e 22.3 per 100 delle proteine totali.

Über die Aktivität der Tyrosinase in Tabaksamen

Bei Untersuchungen über die Verbräunung des Tabaks wird oft auf die Rolle der Tyrosinase hingewiesen. BÄBLER¹ konnte zeigen, dass die Tyrosinase der Tabakblätter die Chlorogensäure zu oxydieren vermag, wobei braune oder unter Einwirkung anderer Stoffkomponenten rotbraune bis schwarze Pigmente entstehen. Er erklärte die Chlorogensäure neben Rutin als das für die Verbräunung wichtigste Substrat. Diese war bei unter Glas gezogenen Tabakpflanzen in viel geringerer Menge vorhanden als bei Freilandtabak, und die Blätter verbräunten in der Folge sehr unvollständig oder überhaupt nicht. Die geringe Chlorogensäurekonzentration konnte durch künstliche Belichtung auf den normalen Wert gebracht werden². EICHENBERGER³ stellte fest, dass die Aktivität der Tyrosinase stark von der Insertionshöhe und vom Alter der Blätter abhängt. Eine Bedeutung für die Terminaloxydaseaktivität spricht er ihr bei Tabakblättern ab, weist jedoch auf die Rolle bei der Pigmentbildung hin.

Da in den genannten Arbeiten unseres Institutes die Wichtigkeit des Systems Tyrosinase-Chlorogensäure immer wieder in Erscheinung trat, war es von Interesse, die Tyrosinase in Tabaksamen nachzuweisen und ihr Verhalten gegenüber Chlorogensäure und anderen Phenolen zu charakterisieren, sowie Auskunft über die Lebensdauer zu erhalten. Es wurde daher ein Vergleich der Tyrosinaseaktivität in frischen (Ernte 1958) und gelagerten (Ernte 1955) Samen angestellt.

Die wässrigen und gepufferten Enzymextrakte erhielten wir nach einer für Samen von *Secale cereale* beschriebenen Methode^{4,5}. 4 g Samen der Varietät *Mont Calme brun* wurden mit Wasser oder 1/15 M Phosphatpuffer pH 5,6 während 3 min im Homogenisator «Bühler» zerschlagen und in der «Wifug»-Zentrifuge bei 6000 Touren/min während 5 min zentrifugiert. Die überstehende Lösung filtrierte man durch einen Seitzfilter, und das klare, farblose Filtrat wurde mit Wasser bzw. Puffer auf 200 ml verdünnt.

Zur Bestimmung der Cresolaseaktivität verwendeten wir *p*-Cresol, für die Catecholaseaktivität L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oder Chlorogensäure. Die Inkubation erfolgte bei 30 oder 37°C. Die Aktivität des Enzymextraktes wurde durch periodische Extinktionsmessung mit Hilfe eines Pulfrich-Photometers (Filter S47, Wellenlänge 463 mμ) ermittelt. Die letzte Ablesung wurde bei *p*-Cresol nach 24 h, bei DOPA nach 1 h gemacht. Die Zunahme der Extinktion mit der Zeit zeigen die Diagramme der Abbildungen 1 und 2.

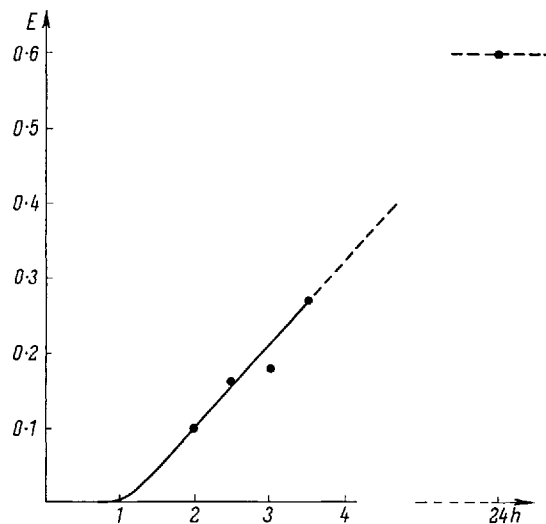


Abb. 1. Cresolaseaktivität. 10 ml gepufferter Enzymextrakt, 8 ml 1/15 M Phosphatpuffer, 10 mg *p*-Cresol, pH 5,6, Temperatur 30°C. Küvettentiefe 5 cm

Ausserdem haben wir den Einfluss des Thioharnstoffs – ein mit Kupfer stabile Komplexe bildendes Reagens – als Inhibitor der Tyrosinase⁶ auf die Aktivität des Enzymextraktes untersucht. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefasst.

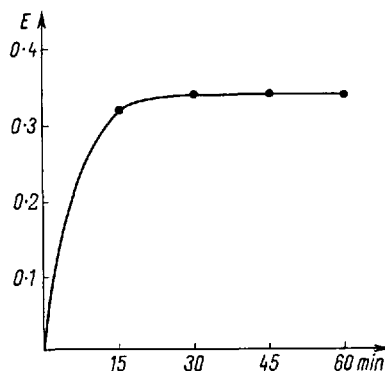


Abb. 2. Catecholaseaktivität. 15 ml gepufferter Enzymextrakt, 5 ml 1/15 M Phosphatpuffer, 15 mg DOPA, pH 5,6, Temperatur 30°C. Küvettentiefe 5 cm

Da Tabaksamen sehr lange keimfähig bleiben, war es von besonderer Bedeutung festzustellen, ob 3 1/2 Jahre alte Samen durch die Lagerung eine Einbusse ihrer Tyrosinaseaktivität, verglichen mit frischem Saatgut, erlitten

¹ S. BÄBLER, Diss. ETH, Zürich 1957.

² A. FREY-WYSSLING und S. BÄBLER, Exper. 13, 399 (1957).

³ E. EICHENBERGER, Diss. ETH, Zürich 1952.

⁴ J. W. SZARKOWSKI, Acta biochim. Polon. 4, 129 (1957).

⁵ J. W. SZARKOWSKI, Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, 5, 1 (1957).

⁶ C. R. DAWSON und W. B. TARPLEY, *The Enzymes*, Vol. II, P. I (J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, Academic Press, New York 1951), p. 454.

Tabelle I

Hemmung der Tyrosinase durch Thioharnstoff. 15 ml gepufferter Enzymextrakt, 5 ml 1/15 M Phosphatpuffer oder gepufferte Thioharnstofflösung, 15 mg DOPA, pH 5,6, Temperatur 30°C, Inkubationszeit 1 h, Küvettentiefe 5 cm

Endkonzentration des Thioharnstoffs <i>M</i>	<i>E</i>
—	0,32
10 ⁻³	0,33
10 ⁻²	0,00
10 ⁻¹	0,00

hatten. Die relativen Aktivitätseinheiten wurden hierzu bestimmt durch die Extinktion nach einer einstündigen Inkubation mit DOPA, bezogen auf den Gesamt-N des Extraktes, berechnet als Eiweiss. Die Stickstoffanalysen erfolgten nach der Methode von Parnas und Wagner. Der erhaltene Quotient wurde mit 1000 multipliziert. Die Resultate sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II

Tyrosinaseaktivität in alten und frischen Tabaksamen. 15 ml wässriger Enzymextrakt, 15 mg DOPA, Temperatur 37°C, Inkubationszeit 1 h, Küvettentiefe 3 cm

	<i>E</i>	Eiweissgehalt in 15 ml des Enzymextraktes mg	Aktivitäts- einheiten $\frac{E \cdot 1000}{\text{mg Eiweiss}}$
Alte Samen (1955)	0,31	3,56	87,1
Frische Samen (1958)	0,32	3,75	85,3

Unsere Messungen beweisen die Gegenwart aktiver Tyrosinase in den Tabaksamen. Ihre Wirksamkeit ist bei drei Jahre alten Samen gleich wie in frischen Samen. Sie weist sowohl die Cresolase- wie auch die Catecholaseaktivität auf. Die Induktionsperiode, die bei der Inkubation mit *p*-Cresol immer zu beobachten ist, dauerte etwa 1 h. Obwohl die Enzymextrakte mit DOPA sehr rasch reagierten (Catecholaseaktivität), konnte nach Inkubation mit Chlorogensäure keine Extinktionszunahme festgestellt werden, weder bei alten noch bei frischen Samen. Wir sehen darin einen Unterschied der Tyrosinase aus Samen gegenüber jener der Tabakblätter, welche Chlorogensäure sehr rasch oxydiert.

A. FREY-WYSSLING und J. W. SZARKOWSKI

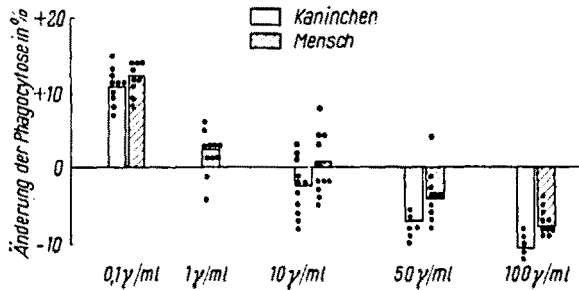
Institut für Allgemeine Botanik der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, 23. Mai 1959.

Summary

Water or buffered extracts from tobacco seeds (*Mont Calme brun*) showed both cresolase and catecholase activity of tyrosinase, which was inhibited by 10⁻² M thiourea. No difference of activity could be observed in extracts from old and fresh seeds. Unexpectedly, chlorogenic acid is not oxidized by this tyrosinase.

Prednisolon-Na-succinat
und die Phagozytose der Leukozyten

Seitdem sich die Möglichkeit ergeben hat, dass zwischen den Hormonen der Nebennierenrinde und der Leukozytenphagozytose Beziehungen bestehen, haben wir uns mit dieser Frage mehrmals beschäftigt¹. Wir stellten fest, dass die normale Leukozytenphagozytose von einer parenteral verabreichten grösseren pharmakologischen Cortisonosis deutlich herabgesetzt wird, während *in vitro* kein signifikanter Unterschied auftritt². ESSELIER *et al.* fanden, dass die Phagozytose der eosinophilen Leukozyten *in vitro* nicht durch Cortison, hingegen durch Hydrocortison vermindert werden konnte³. ACTH ergibt je nach der Grösse der parenteral angewandten Dosis Senkung oder Erhöhung⁴. CRAHÉ beobachtete gesteigerte Phagozytentätigkeit nach kleinerer parenteraler Cortisonosis⁵.



Die Wirkung von P auf die Leukozytenphagozytose *in vitro*

Da in letzter Zeit mehrere wirksame antiphlogistische Corticosteroide erkannt wurden, untersuchten wir die Wirkung des in letzter Zeit therapeutisch oft verwendeten, wasserlöslichen Prednisolon-Na-succinat (P).

Die Phagozytenuntersuchungen haben wir mit aus dem Kreislauf entnommenem Blut nach der eingehend beschriebenen Methode von PLATONOW-LUDÁNY-VAJDA durchgeführt⁶. Die Fehlergrenze (Streuung) der Zählung beträgt: $\sigma < \pm 8\%$.

Zuerst untersuchten wir die Bakterienphagozytose der aus dem kreisenden Blut entnommenen Granulozyten, die nach intravenöser Verabreichung von 3 mg/kg P (Solu-Dacortin «Merk», Di-Adreson-F-Aquosum «Organon») verändert wird. Bei an 5 Kaninchen durchgeführten Untersuchungen hatte die Freistätigkeit der weissen Blutzellen nach 24 h um durchschnittlich -30 [$24/-36$]/% , nach Ablauf von 48 h um -10 [$-2/-19$]/% abgenommen. Am 3. Tage trat eine Erhöhung auf $+20$ [$+12/-+31$]/% ein, die am 4. Tage bereits verschwunden war. Nach mehr-tägiger Ruhepause trat nach intravenös injiziertem 0,3 mg/kg P eine Erhöhung der Tätigkeit der weissen Blutzellen beim selben Kaninchen schon nach 1 h durchschnittlich um $+30$ [$+26/-+36$]/% ein, die nach 2 h auf $+19$ [$+16/-+24$]/% , nach 6 h auf $+10$ [$+5/-+15$]/%

¹ F. KORAS, G. LUDÁNY und Gy. VAJDA, Quart. J. exp. Physiol. 36, 89 (1951).
² G. LUDÁNY, Gy. VAJDA und R. BACKHAUSZ, Arch. int. Pharmacodyn. 89, 229 (1952).
³ A. F. ESSELIER, P. JEANNERET, L. CARMEN und N. WINKELSTEIN, Int. Arch. Allergy 6, 129 (1955).
⁴ G. HORVÁTH, G. LUDÁNY und Gy. VAJDA, Tag. d. Ung. Physiol. Ges. Pécs, 15-18, 7, 1953; Acta physiol. hung. Suppl. 1953; Acta physiol. hung. 7, 431 (1955).
⁵ J. CRAHÉ, Acta endocrinol. 21, 41 (1956).
⁶ G. LUDÁNY, Gy. VAJDA, A. DÖRLEN und Li BOK NAM, Acta neuroveg. 20, 50 (1959).