

zusätzlichen chemischen Verschiebungen einander gegenübergestellt sind. Interessant ist das Verhalten des 3- und des 7-Ketons im Vergleich zu den entsprechenden konjugierten Ketonen. Eine Deutungsmöglichkeit für diesen Effekt bietet die BUCKINGHAM'sche Theorie¹⁸⁾, die nachweist, dass die durch polare Gruppen in Nachbaranteilen der Molekel oder in Lösungsmittelmolekeln induzierte Polarisierung zu einer zusätzlichen chemischen Verschiebung führen kann.

Abschliessend lässt sich feststellen, dass, wie zu erwarten war, die Einflüsse der Funktionen an den Ringen A, B und C am stärksten sind. Beim Aufklären unbekannter Strukturen kann daher in erster Näherung in manchen Fällen auf eine Kenntnis der Substituenten am Ring D verzichtet werden.

Diese Untersuchung konnte nur durchgeführt werden dank der Mithilfe von Herrn Prof. T. REICHSTEIN (Universität Basel), der uns in grosszügiger Weise seine Steroid-Sammlung zur Verfügung stellte und uns in verschiedenen Diskussionen wertvolle Hinweise gab, wofür wir ihm zu grossem Dank verpflichtet sind. Wir danken ferner den Chemikern der Forschungslaboratorien der pharmazeutischen Abteilung der CIBA AG für die Bereitstellung der Substanzen. Besondere Dank schulden wir den Herren Dres. K. HEUSLER, J. KALVODA und J. SCHMIDLIN für verschiedene Diskussionen und die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit sowie den Herren E. LÄNGIN und E. ENG für die Aufnahme der Spektren.

SUMMARY

The proton NMR spectra of 160 known steroids have been measured as 0.1 molar solutions in deuterio-chloroform. It is shown that the influences of the different substituents and double bonds on the position of the C-19-methyl-signal are additive to a high approximation. Most chemical shifts can therefore be predicted with an accuracy of ± 0.01 ppm. A table of the additional chemical shifts as a function of the nature and position of the substituents is given, which permits the calculation of the chemical shift of the 19-hydrogen atoms of unknown steroids.

CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Physikalisches Laboratorium

¹⁸⁾ A. D. BUCKINGHAM, *Canad. J. Chemistry* **38**, 300 (1960).

172. Mikrosomale Tyrosinase aus Puppen der *Drosophila melanogaster*

Kurze Mitteilung

von E. Jenny, A. Hicklin und F. Leuthardt

(6. VI. 61)

Tyrosinase, auch Phenolase oder Polyphenoloxydase genannt, ist ein im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitetes Enzym. Es katalysiert die Umwandlung von Monophenolen zu Diphenolen (Kresolaseaktivität) und die Oxydation der Diphenole zu den entsprechenden Chinonen (Catecholaseaktivität)¹⁾. Je nach der phylogenetischen Stufe erfüllen diese Chinone verschiedene Aufgaben²⁾. Bei Insekten sind Pigmentie-

¹⁾ A. B. LERNER, *Advances Enzymol.* **14**, 73 (1953).

²⁾ H. S. MASON, *Advances Enzymol.* **16**, 105 (1955).

rung und Härtung der Cuticula wesentlich durch Tyrosinase-katalysierte Reaktionen mitbestimmt³⁾. Während der Enzymkomplex in Pflanzen – vor allem untersucht sind Pilze – in kolloidal gelöster Form vorliegt, ist er bei Vertebraten an Strukturen gebunden, die meist noch Bernsteinsäureoxydase und Cytochromoxydase enthalten und deshalb eine gewisse Verwandtschaft mit Mitochondrien aufweisen¹⁾. Auch in melanotischen Geschwülsten ist das Enzym an mikroskopische Strukturen gebunden⁴⁾.

Das Phenoloxidasystem der Insekten ist vor allem aus zwei Gründen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Erstens wegen der in ihrem Mechanismus noch nicht geklärten Selbstaktivierung von Enzympräparationen⁵⁾ und zweitens wegen der Beeinflussung des Enzymkomplexes durch das Hormon Ecdyson, die für die Metamorphose von grosser Wichtigkeit ist⁶⁾. Wir suchten deshalb festzustellen, ob das Enzym in gelöster Form vorliegt oder strukturgebunden ist. Schon HOROWITZ & FLING⁵⁾ sowie KARLSON & SCHWEIGER⁶⁾ hatten bemerkt, dass sich Insektentyrosinase durch kurz-dauerndes Zentrifugieren bei rund 20000 g nicht sedimentieren lässt. Wir zentrifugierten deshalb Homogenate von *Drosophila*-Puppen während 10–15 Min. bei 15000 g, um Mitochondrien und Zelltrümmer zu entfernen. Das Überstehende wurde darauf erneut 60–120 Min. bei 105000 g zentrifugiert. Dabei erhielten wir ein Sediment, das man in Anlehnung an die Verhältnisse bei Säugetieren als mikrosomal bezeichnen kann. Dieser Ausdruck soll sich im vorliegenden Fall nur auf das Sedimentationsverhalten beziehen und über die Art der Teilchen nichts aussagen.

Diese Mikrosomen besitzen eine sehr aktive Tyrosinase, die sowohl Tyrosin wie Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) über eine rote Zwischenstufe zu blauschwarzen Pigmenten umsetzt. Mikrosomen aus *Drosophila*-Larven zeigten jedoch bei unserer Aufarbeitungsmethode im Gegensatz zu den Puppen keine Tyrosinaseaktivität. Orientierende Versuche ergaben, dass auch in Puppen von *Musca domestica* (Hausfliege),

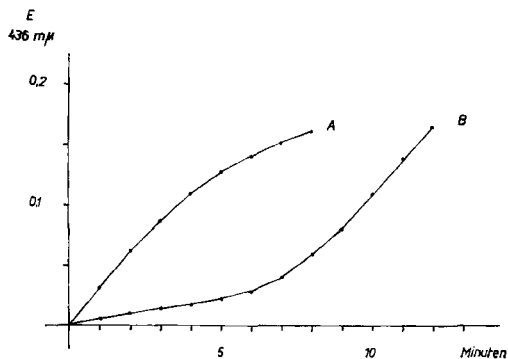


Fig. 1. *Kresolase- und Catecholaseaktivität mikrosomaler Tyrosinase*

A. L-(-)-3,4-Dihydroxyphenylalanin, 6×10^{-3} M

B. L-(-)-Tyrosin, 4×10^{-3} M

³⁾ M. G. M. PRYOR, Proc. Roy. Soc. (London), B 128, 393 (1940).

⁴⁾ A. B. LERNER, T. B. FITZPATRICK, E. CALKINS & W. H. SUMMERSON, J. biol. Chemistry 178, 185 (1949).

⁵⁾ N. H. HOROWITZ & M. FLING, in A Symposium on Amino Acid Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 207–218.

⁶⁾ P. KARLSON & A. SCHWEIGER, Z. physiol. Chem. 323, 199 (1961).

Ephestia kühnielli (Mehlmotte), *Tenebrio molitor* (Mehlwurm) und *Dermestes lardarius* (Speckkäfer) wenigstens ein Teil der Tyrosinaseaktivität ebenfalls an Mikrosomen gebunden zu sein scheint.

Die Enzymaktivitäten wurden in einem «MEDEOR»-Spektrophotometer durch Messen der Extinktionszunahme entsprechender Ansätze bei 436 m μ bestimmt, da ein Zwischenprodukt der Tyrosinoxydation, Dopachrom (λ_{\max} 475 m μ), nur sehr langsam weiter umgesetzt wird¹⁾.

Das mikrosomale Enzym weist folgende für Tyrosinasen charakteristische Eigenschaften auf:

1. Es besitzt sowohl Kresolase- wie auch Catecholaseaktivität (Fig. 1).
2. Die Tyrosinoxydation erfolgt mit einer konzentrationsabhängigen Induktionsperiode⁴⁾ (s. Tab.).

Abhängigkeit der Induktionsperiode von der Tyrosinkonzentration

Substrat L-(-)-Tyrosin. 30 Einheiten Kresolaseaktivität pro ml in allen Ansätzen

Tyrosinkonz. (Molarität)	2×10^{-3}	10^{-3}	$0,75 \times 10^{-3}$	$0,125 \times 10^{-3}$	10^{-4}
Induktionsperiode (min)	14	11	8	3	2

3. Die Induktionsperiode wird durch Zugabe eines Diphenols aufgehoben⁴⁾ (Fig. 2).

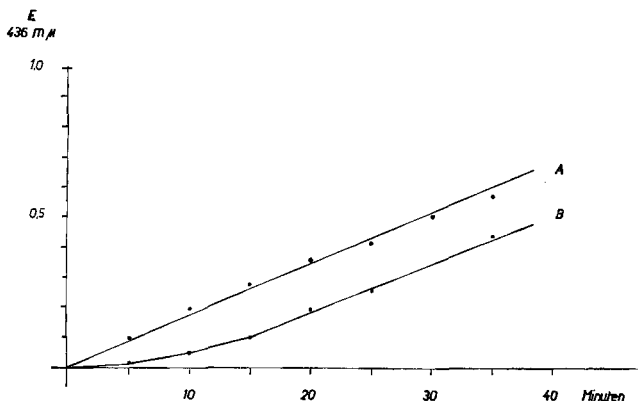


Fig. 2. Ausschaltung der Induktionsperiode beim Umsatz von Tyrosin durch ein Diphenol

- A. L-(-)-Tyrosin, 2×10^{-3} M, Protokatechusäure 10^{-3} M
- B. L-(-)-Tyrosin, 2×10^{-3} M

4. Kresolase- und Katecholaseaktivität werden durch Phenylthioharnstoff, Dimercaptopropanol (BAL), Cystein, p-Nitrophenol und α, α' -Dipyridyl gehemmt¹⁾.

Die scheinbare MICHAELIS-Konstante liegt für die Oxydation von Tyrosin um rund 7×10^{-4} M, für die Oxydation von Dopa um 9×10^{-4} M. Diese Werte sind höher als jene, die für gereinigte Pilztyrosinase ermittelt wurden⁷⁾. Bei einem mikrosomal gebundenen Enzym dürften jedoch Permeationsfaktoren eine Rolle spielen. Unter äquivalenten Substratkonzentrationen wird Dopa vielfach schneller umgesetzt als Tyrosin, in Übereinstimmung mit den Resultaten von BROWN und Mitarb. für Tyro-

⁷⁾ Y. KARKHANIS & E. FRIEDEN, J. biol. Chemistry 236, PC 1 (1961).

sinase aus HARDING-PASSEY-Melanom⁸⁾). Mikrosomenpräparationen enthalten rund 400 Einheiten (Definition siehe Experimentelles) Kresolaseaktivität und etwa 1500 Einheiten Catecholaseaktivität pro mg Eiweiss, doch schwanken die Werte von Präparation zu Präparation erheblich. Bewahrt man Enzymlösungen bei -30° auf, so ist über Tage kaum ein Abfall der Aktivität festzustellen. Auch nach Ultrazentrifugation von 150 Min. Dauer ist im Überstehenden immer noch eine geringe Aktivität vorhanden. Ob sie an unter den Versuchsbedingungen nicht sedimentierbare Partikel gebunden ist oder auf eine echt gelöste Tyrosinase zurückgeführt werden kann, wissen wir noch nicht.

Mikrosomale Tyrosinase wird beim Umsatz von Dopa inaktiviert, nicht jedoch bei der Oxydation von Tyrosin (Fig. 1). Sie verhält sich in dieser Beziehung wie Tyrosinase aus Pflanzen⁹⁾¹⁰⁾ und unterscheidet sich vom Säugetierenzym⁴⁾. Zur Berechnung der Aktivitäten muss deshalb beim Umsatz von Dopa die initiale Geschwindigkeit zugrunde gelegt werden, beim Umsatz von Tyrosin die Reaktionsgeschwindigkeit nach Ablauf der Induktionsphase.

Da *Drosophila*-Tyrosinase beim Stehen aktiviert werden kann und noch nicht genau definierte Hemmkörper die Aktivität beeinflussen, sind bei der Beurteilung der Resultate gewisse Unsicherheitsfaktoren in Betracht zu ziehen.

Interessant ist die Feststellung, dass das Enzym durch Chloramphenicol [D-(–) Threo-1-p-nitrophenyl-2-dichloracetyl-aminopropandiol-(1,3)] gehemmt wird (Fig. 3). Ob diese Hemmung mit der bekannten bakteriostatischen Wirkung in Zusammenhang steht, ist uns nicht bekannt. Die Hemmung ist weder kompetitiv noch inkompetitiv, sondern entspricht sowohl für Dopa wie für Tyrosin einem gemischten Typ.

Alle Versuche, die Tyrosinase in eine echt gelöste Form zu bringen, schlugen bisher fehl. Wohl gelang es durch Behandlung mit Na-Desoxycholat etwa 80% des mikro-

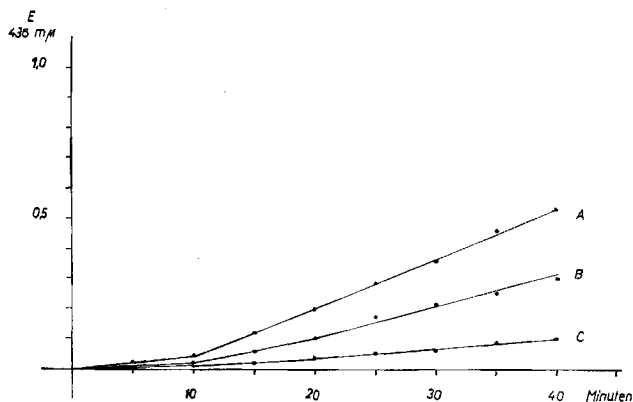


Fig. 3. Hemmung der mikrosomalen Tyrosinase durch Chloramphenicol

- A. L-(–)-Tyrosin, $2 \times 10^{-3} M$
 B. L-(–)-Tyrosin, $2 \times 10^{-3} M$, Chloramphenicol $10^{-4} M$
 C. L-(–)-Tyrosin, $2 \times 10^{-3} M$, Chloramphenicol $10^{-3} M$

⁸⁾ F. C. BROWN & D. N. WARD, J. biol. Chemistry 233, 77 (1958).

⁹⁾ I. ASIMOW & C. R. DAWSON, J. Amer. chem. Soc. 72, 820 (1950).

¹⁰⁾ J. M. NELSON & C. R. DAWSON, Advances Enzymol. 4, 99 (1944).

somalen Eiweisses in Lösung zu bringen, die Präparationen waren aber auch nach Dialyse und Kupferionenzusatz inaktiv. Die spezifische Aktivität der Mikrosomen nahm dabei nur wenig zu, doch wurde die Induktionsperiode bei gleichen Aktivitäten kürzer. Möglicherweise wurde durch Desoxycholat ein Inhibitor freigesetzt, der nach neuesten Untersuchungen mit kupferfreier Tyrosinase identisch sein könnte¹¹⁾.

Experimentelles. – 1. *Methodik:* Fliegen der Spezies *Drosophila melanogaster*, Wildtyp, wurden auf Hefe enthaltenden Maisböden gezüchtet. Nach Erreichen des Puppenstadiums wurden die Tiere gesammelt, auf einer Porzellannutsche mit *Aqua dest.* sauber gewaschen und während einer Viertelstunde luftgetrocknet. Pro Versuch wurden 8–20 g Puppen verwendet. Die Puppen wurden portionenweise unter Zugabe von 2,3 ml Medium A (siehe unten) pro Gramm in einem Porzellanmörser zerquetscht, der Brei abgessen und in einem Glashomogenisator mit Teflon-Pistill während 30 Sek. homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 15 000 g während 10 Min. wurde das Überstehende im Verhältnis 1:1 mit Medium B verdünnt und in einer präparativen Ultrazentrifuge (Modell SPINCO) bei 105 000 g während 60–120 Min. zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen wurden in so viel Medium A aufgenommen, dass in einem ml ungefähr das Äquivalent von 1,5 g Puppen vorhanden war, was 2–4 mg Mikrosomeneiweiss entspricht. Die Eiweissbestimmungen erfolgten mit der von BEISENHERZ und Mitarb.¹²⁾ modifizierten Biuretmethode. Die Aktivitäten wurden in einem «MEDEOR»-Spektrophotometer mit Durchlaufthermostaten durch Messung der Extinktionszunahme bei 436 m μ bestimmt. Die Ansätze enthielten die entsprechenden Substratkonzentrationen gelöst in Medium A in einem Endvolumen von 2 ml. Die Ablesungen erfolgten meist alle Min. In der Zwischenzeit wurde der Kuvetteninhalt mit einem am Ende breitgedrückten Glasstab ständig durchgemischt, um eine genügende Sauerstoffsättigung zu garantieren. Dieser einfache Test ist wegen des geringen Arbeitsaufwandes andern Methoden überlegen (vgl. ¹⁰⁾). Er eignet sich vor allem zur Bestimmung relativ reiner Tyrosinasepräparationen. In Rohextrakten können Nebenreaktionen mit der Bildung von Farbstoffen unbestimmten Spektrums interferieren.

Als Einheit der Kresolaseaktivität definierten wir zum Laborgebrauch eine Extinktionszunahme von 0,001 bei 436 m μ pro Min. und pro ml Ansatz bei einer Tyrosinkonzentration von 2×10^{-3} M und bei 25°. Die Einheit der Catecholaseaktivität definierten wir in analoger Weise für eine Dopakonzentration von 6×10^{-3} M. Die gemessenen Aktivitäten sind im Bereich von 30–160 Einheiten den zugegebenen Eiweissmengen proportional. Durch stärkere Verdünnung können die Lösungen inaktiviert werden⁵⁾, bei hohen Konzentrationen wird die Sauerstoffsättigung kritisch.

2. *Lösungen und Reagenzien:* Medium A: Saccharose 0,35 M, MgCl₂ 0,004 M, KCl 0,025 M, Trihydroxymethylaminomethan/HCl-Puffer 0,05 M, pH 7,6.

Medium B: Saccharose 0,90 M, MgCl₂ 0,004 M, KCl 0,025 M.

L(-)-Tyrosin, L(-)-3,4-Dihydroxyphenylalanin und α, α' -Dipyridyl stammten von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Chloramphenicol von der Firma LE PETIT (Handelsname Synthomycetin). Die übrigen Reagenzien waren Handelspräparate vom besten erhältlichen Reinheitsgrad.

SUMMARY

Microsomes of *Drosophila melanogaster* (*pupae*) contain tyrosinase showing both cresolase and catecholase activity. Some properties of the particle-bound enzyme are described. Attention is paid to the fact that both activities are inhibited by chloramphenicol.

Biochemisches Institut
der Universität Zürich

¹¹⁾ Y. KARKHANIS & E. FRIEDEN, *Biochem. biophysic. Research Communications* 4, 303 (1961).

¹²⁾ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GABARDE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 86, 555 (1953).