

Die radioaktive Markierung des Melaninpigments der Fischhaut mit $[^{35}\text{S}]$ Natriumsulfat

Radioactive Labelling of the Melanin Pigment in Fish Skin with $[^{35}\text{S}]$ Sodium Sulphate

Dieter Plesse und Manfred Lüdicke

Zoologisches Institut, Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. 29 c, 42–47 [1974]; eingegangen am 30. Juli/12. November 1973)

Melanins, Melanomas, $[^{35}\text{S}]$ Sodium Sulphate

$[^{35}\text{S}]$ Sodium sulphate was intraperitoneally injected into adult fishes and its incorporation into melanins examined. Relevant incorporation of the tracer into normal skin and peritoneal melanocytes of *Poecilia reticulata* (Peters) and *Puntius tetrazona tetrazona* (Hamilton) could be detected only in rare cases. Melanocytes of malignant melanomas in the hybrids of *Xiphophorus helleri* (Heckel) and *Platypoecilus maculatus* (Guenther) exhibited a different degree of radioactivity according to their degree of differentiation. The isolation of the melano-protein complex from melanocytes of these melanomas and its subsequent hydrolysis resulted in the following: During melanin synthesis, $[^{35}\text{S}]$ sulphate had been incorporated into the chromophore group as an ester-sulphate, whereas no significant incorporation of the tracer was found in the protein matrix.

Fast alle Pigmentzellen der Vertebraten entstammen der Neuralleiste. Während der Ontogenese werden von ihr mehrere Wanderzell-Typen abgegeben, unter anderem auch Propigmentzellen, die nur in der Embryonalzeit größere Strecken zurücklegen können, da eine Wanderung mit zunehmendem Alter des Organismus durch starke Gewebsverdichtung verhindert wird¹. Diese Wanderzellen dringen in die verschiedensten Gewebe ein, wo sie sich ortspezifisch differenzieren.

Das einzige Gewebe mit autochthonen Pigmentzellen ist das retinale Pigmentepithel des Auges.

Der rasche physiologische Farbwechsel erfolgt durch zentrifugale bzw. zentripetale Wanderung der einzelnen Pigmentkörper innerhalb der Chromatophoren². Länger andauernde Reize können einen morphologischen Farbwechsel hervorrufen, der auf die Produktion neuen Pigments oder auf den zeitweisen Verlust von Pigment zurückzuführen ist. Auch eine Vermehrung der Farbzellen durch Teilung ist möglich.

Von den bei Fischen vorkommenden Farbstoffen sind nur die braunen und schwarzen Melanine der Melanophoren sehr beständig und bleiben auch nach dem Tode des Tieres erhalten, während die gelben und roten Pigmente von Xantho- und Erythrophoren sich unter Einfluß von Licht und Sauerstoff unterschiedlich rasch zersetzen.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M. Lüdicke, Zoologisches Institut der Universität Heidelberg, Abteilung für Wirbeltiermorphologie, D-6900 Heidelberg, Berliner Str. 15.

Bei den Melaninen handelt es sich um Mischungen von Makromolekülen, die durch Copolymerisation verschiedener Vorstufen entstanden sind, wobei die wichtigste 5,6-Indochinon ist³. Die verschiedenen Melanogene sind wahrscheinlich über ihre Chinonbindungen an Amino- oder Sulfhydrylgruppen der Proteinmatrix der Pigmentgrana angeheftet⁴. Melanin- und Proteinkomponente können nicht ohne weiteres durch milde chemische Prozesse getrennt werden⁵.

Die meisten Melanine sind wahrscheinlich irreguläre Polymere. Aus dieser Tatsache in Verbindung mit der Unlöslichkeit der Melanine und ihrer Eigenschaft, daß sie chemisch schwer zu behandeln sind, resultiert ein sehr langsamer Fortschritt der Erforschung ihrer Strukturen und die Schwierigkeit, eine präzise Definition der Zusammensetzung zu geben^{6–8}.

In Untersuchungen von Lüdicke und Mitarbeitern an Vögeln^{9–12} und Lepidopteren^{13–16} konnte gezeigt werden, daß radioaktiver Schwefel für die Markierbarkeit von Farbarealen besonders geeignet erscheint und bestimmte Schritte des Farbstoffwechsels aufzuzeichnen vermag.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher unter anderem besondere Bedeutung der Klärung folgender Fragen beigemessen: Wird der den Fischen als $[^{35}\text{S}]$ Natriumsulfatlösung applizierte Schwefel in das Melaninmolekül selbst oder in dessen Träger-eiweiß bzw. in beide eingebaut und wird der so gebotene Schwefel direkt als Sulfat oder in anderer Form in das Molekül aufgenommen?



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Material und Methoden

Als Versuchstiere dienten Guppies *Poecilia reticulata* (PETERS), Sumatrabarben *Puntius tetrazona tetrazona* (HAMILTON), sowie Gattungs-Bastarde der Zahnkarpfen *Xiphophorus helleri* (HECKEL) und *Platypoecilus maculatus* (GUENTHER) mit verschieden starker Melanombildung.

Alle Fische wurden nach Arten getrennt in Sammelaquarien bei ca. +20 °C und natürlichem Tageslicht gehalten. Zur schmerzfreien Applikation des radioaktiven Tracers erwiesen sich Narkoselösungen von MS-222 (Sandoz) 1:10.000 als besonders geeignet. Zum Abtöten der Tiere wurden diese für ca. 15 min in konzentrierte Narkoselösungen (1:5.000) eingebracht.

Jeder Fisch erhielt eine einmalige intraperitoneale Injektion vonträgerfreiem [³⁵S]Natriumsulfat in isotonischer Kochsalzlösung. Die injizierte Aktivität betrug je nach Gewicht des Tieres zwischen 20–40 µCi. Nach 4–7 Tagen wurden die Tiere abgetötet.

Für die autoradiographischen Untersuchungen dienten histologische Schnitte der Tiere sowie Totalpräparate von Flossen und Peritoneen. Flossen und Peritoneen wurden auf Objektträger aufgezogen und vor der Exposition mit Filmmaterial zunächst im Kryostaten getrocknet. Paraffinschnitte wurden vor dem Autoradiographieren durch zweifaligen Durchgang durch Xylol entparaffiniert und anschließend durch die absteigende Alkoholreihe geführt. Zur Verhinderung chemischer Einflüsse des Präparates auf den Film taucht man zuvor den Objektträger in 0,5-prozentige Gelatinelösung, der 0,05% Chromalaun beigegeben ist, wodurch sich über dem Präparat ein Schutzfilm von 1–2 µm Dicke bildet. Für Makroautoradiographien von Flossenpräparaten fand DuPont-Röntgenfolienfilm Verwendung, für Mikroautoradiographien Kodak-Strippingfilm AR 10.

Die reinen Melanine wurden auf zwei verschiedene Arten gewonnen: In dem homogenisierten, melanotischen Gewebe wurden durch enzymatische Hydrolyse nach der Methode von Chavin¹⁷ sämtliche Eiweiße zerstört, so daß nach Filtration und gründlichem Waschen das reine Melanin-Pigment übrigblieb. In einem zweiten Verfahren wurde zur Melanosomen-Präparation das Zellhomogenat des Melanoms durch differentielle Zentrifugation fraktioniert¹⁸. Aus der so gewonnenen Melanosomen-Fraktion wurde der Eiweiß-Träger des Pigments durch salzaure Hydrolyse abgebaut und durch Filtration von der eigentlichen chromophoren Gruppe, dem Melanin, abgetrennt. Die reinen Melanine wurden auf ihre Radioaktivität geprüft.

Ergebnisse

Autoradiographische Untersuchungen der malen Melanophoren mit normalem Pigmentstoffwechsel zeigen nach Applikation von [³⁵S]Natriumsulfat meist keine wesentlich unterschiedliche Markierbarkeit. Da die Silberkornsdichte über dem umgebenden Hautbindegewebe vielfach die gleiche ist wie über den Pigmentzellen, kann über die Markierungsdichte der Pigmentzellen keine Aussage getroffen werden. Nur äußerst selten gelang eine stärkere radioaktive Markierung von Melanophoren durch [³⁵S]Natriumsulfat. Die kleinen Melanophoren zeigen eine starke Strahlungsaktivität, woraus man schließen kann, daß es sich um junge, bezüglich des Pigmentstoffwechsels sehr aktive Farbzellen handelt; denn die dichten Silberkornabscheidungen haben das zelluläre Muster oftmals vollkommen überdeckt, so daß die randliche Streustrahlung kaum mehr die Zellkonturen erkennen läßt (Abb. 1*). Metabolisch aktive Melanophoren traten nie einzeln, sondern immer in charakteristischen Zellgruppen auf. Die große dendritische und die große kugelige peritoneale Melanophore (Abb. 1) zeigen keine Radioaktivität, es dürften alte metabolisch inaktive Pigmentzellen sein. Auch die Melanophoren der Iris und des retinalen Pigmentepithels zeigen keine Markierbarkeit durch [³⁵S]Natriumsulfat.

Da bei malignen Melanomen die Pigmentbildung gegenüber entsprechenden nicht pathologischen Geweben auffallend erhöht ist, sind diese für autoradiographische Untersuchungen des Pigmentmetabolismus besonders geeignet. Bei Gattungsbastarden von *Platypoecilus* und *Xiphophorus* wird die Pigmentzellvermehrung einschließlich Melaninsynthese so stark gesteigert, daß sich auf dem Körper hervorragende dicke schwarze Pigmentzellen- und Pigmentansammlungen bilden (Abb. 2). In diesen Gebieten mit besonders starker Melaninanhäufung finden sich keine Schuppen mehr. Die meisten Melanome sitzen an der unteren Schwanzflossen-Körpergrenze oder in deren Nähe. Das Gen für Schwarzfärbung von *Platypoecilus* ist also in seiner Wirkung bedeutend gesteigert, wenn es mit der Erbmasse des *Xiphophorus* zusammengebracht wird. Diese Steigerung ist um so stärker, je größer der Anteil des *Xiphophorus* am Aufbau des Bastard-Individuum ist. Durch Gattungskreuzung können also in diesem

* Abb. 1 und 2 siehe Tafel auf Seite 44 a.

Fall bestimmte Repressoren eliminiert werden, so daß die differenzierte Leistung und Funktion der Zelle im Rahmen des harmonischen Ganzen nicht mehr gewährleistet ist, was zur Bildung von Melanomen führt^{19, 20}.

Makroautoradiographien melanotischer Areale, die vom Schwanzstiel auf die Schwanzflosse reichen, zeigen nach [³⁵S]Natriumsulfat-Applikation eine stärkere radioaktive Markierbarkeit des Melanomgewebes gegenüber dem übrigen Gewebe der Kaudalflosse (Abb. 3 **). Um die Möglichkeit auszuschalten, daß die Markierbarkeit solcher Areale ausschließlich durch Gewebeverdickungen hervorgerufen sein könnte, werden histologische Schnitte durch Melanome des Schwanzstiels von Zahnkarpfenbastarden mikroautoradiographisch untersucht. Dies läßt eine Aussage der Aktivitätsverteilung bezüglich melaninbildender Zellen und des Tumorstromas zu. Die unterschiedlichen Strahlungsaktivitäten, die wiederholt nach [³⁵S]Applikation erhalten wurden, zeigen den verschiedenen Differenzierungsgrad atypischer Pigmentzellen an. Über den helleren, jungen, aktiv Melanin synthetisierenden Melanophoren ist die Silberkorndichte größer als über dem übrigen Bindegewebsmaterial des Melanoms (Abb. 4). Alte, sogenannte Melaninspeicherzellen lagern kaum radioaktives Material ein. Das heißt, sie haben ihre Pigmentbildung zur Zeit der Applikation des radioaktiven Tracers weitgehend eingestellt. Eine Pigmentzelle, deren Pigmentgehalt zwischen dem jünger aktiver und dem älterer inaktiver Melanophoren liegt, nimmt auch bezüglich der Inkorporation des radioaktiven Substrats eine Mittelstellung ein, indem eine stärker pigmentierte Melanophore nur eine etwas geringere Strahlungsaktivität als jüngere Melanophoren aufweist, was besonders durch die periphere Streustrahlung zu erkennen ist (Abb. 4). Hier dürfte es sich um eine in ihrer Reife fortgeschrittene Melanophore handeln, die ihre Pigmentproduktion noch nicht vollkommen eingestellt hat. Die Silbergranulierung über dem Bindegewebe des Melanoms nach [³⁵S]Natriumsulfat-Applikation röhrt von sulfatierten Mucopolysacchariden her, die sich aus einer Eiweißkomponente und einer mit Sulfat veresterten Zuckerkomponente zusammensetzen und durch sehr kurze biologische Halbwertszeiten ausgezeichnet sind.

Die Mikroautoradiographien zeigten nun, daß die funktionelle Aktivität der Melanophoren eines Me-

lanoms von starker Melanogenese bis zur völligen Einstellung der Melaninsynthese reicht. Autoradiographische Untersuchungen lassen aber im Hinblick auf die Art und Weise des Einbaus von [³⁵S]Natriumsulfat in Melanophoren noch einige Fragen offen, beispielsweise die, ob der Tracer als unverändertes Sulfat oder verändert in Form eines seiner Derivate direkt in das Melaninmolekül selbst oder in seine Trägereiweiße eingebaut wird, an welche die eigentliche Farbkomponente als prosthetische Gruppe stets gebunden ist. Auch beide Möglichkeiten wären nebeneinander denkbar. Besonders bei Makroautoradiographien könnte auch vielfach die Markierbarkeit der Melanine mit [³⁵S]Natriumsulfat durch die Aktivität des Bindegewebsmaterials des Melanoms überdeckt werden. Um Fehlinterpretationen auszuschließen und obige Fragen beantworten zu können, muß das Melanoprotein aus dem Tumorgewebe isoliert werden, das Protein von der eigentlichen chromophoren Gruppe abgetrennt und Melanin, Proteinmatrix und Bindegewebsmaterial getrennt auf ihre Aktivität geprüft werden.

a. *Abtrennung von Melanosomen durch differentielle Zentrifugation*

Reine Melanosomen werden nach Homogenisieren des Melanomgewebes in isotonischer Rohrzuckerlösung durch Zentrifugation gewonnen (Tab. I). Zur Aktivitätsbestimmung der Melanosomenfraktion (= Sediment III, Tab. I) wird diese mit wenig Wasser aufgenommen und 48 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert, anschließend durch ein 100 nm Sartorius-Membranfilter abfiltriert, mehrmals mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet (48 Stunden bei + 25 °C und 20 min bei + 90 °C). Die Aktivität der Probe wird auf dem Filter mittels Methandurchflußzähler bestimmt (Tab. II). Um die Proteinkomponente und mögliche Sulfatgruppen des Melanoproteinkomplexes der Melanosomen abzutrennen, werden diese mit 15 ml 6 N Salzsäure in ein Bombenrohr eingebracht, einige Male alternierend mit Stickstoff durchspült und evakuiert, schließlich unter Vakuum abgeschmolzen und vier Tage bei 140 °C hydrolysiert. Das Evakuieren erfolgt stets nach Eingefrieren des Substrats mit flüssigem Stickstoff. Nun wird das unlösliche Restmelanin, ohne Sulfatgruppen und Proteinmatrix, abfiltriert, gründlich gewaschen, getrocknet und die Aktivität festgestellt (Tab. II). Aus dem Filtrat, welches das Proteinhydrolysat und eventuell Sulfationen enthält, erfolgt die Probe auf radio-

** Abbn. 3 and 4 siehe Tafel auf Seite 44 b.

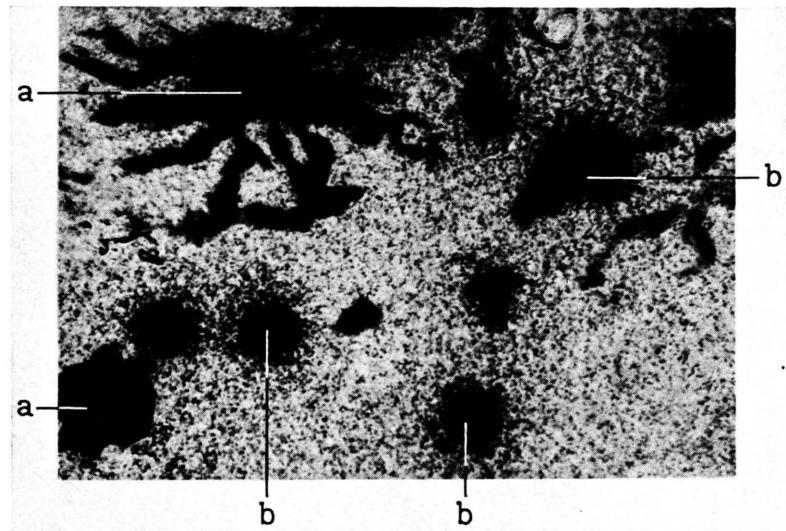


Abb. 1. Mikroautoradiographie älterer und jüngerer peritonealer Melanophoren von *Poecilia reticulata*. Tötung 4 Tage nach Injektion von $30 \mu\text{Ci} [^{35}\text{S}]$ Natriumsulfat. Expositionszeit 60 Tage. Pigmentzellen etwas mit Diaphanol gebleicht. (a = ältere, b = jüngere Melanophoren). Vergrößerung 213-fach.

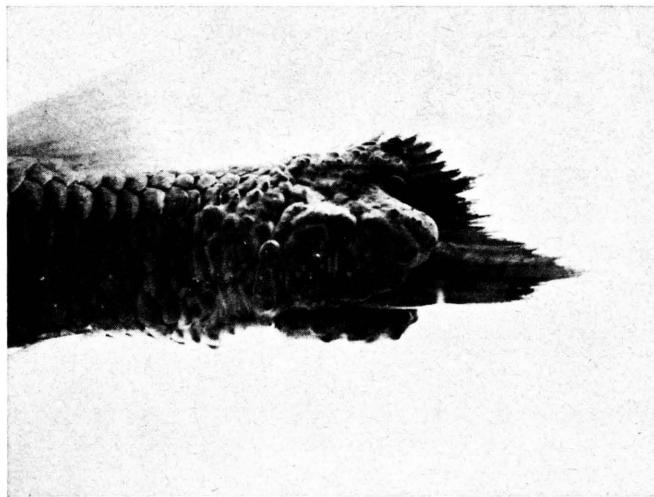


Abb. 2. Ventrolateralansicht eines bösartigen Melanoms am Schwanzstiel eines Gattungsbastards von *Platypoecilus* und *Xiphophorus*. Kaudal in Richtung auf das Melanom ist eine zunehmende Reduktion der Schuppenstrukturen zu verzeichnen. Vergrößerung 2-fach.

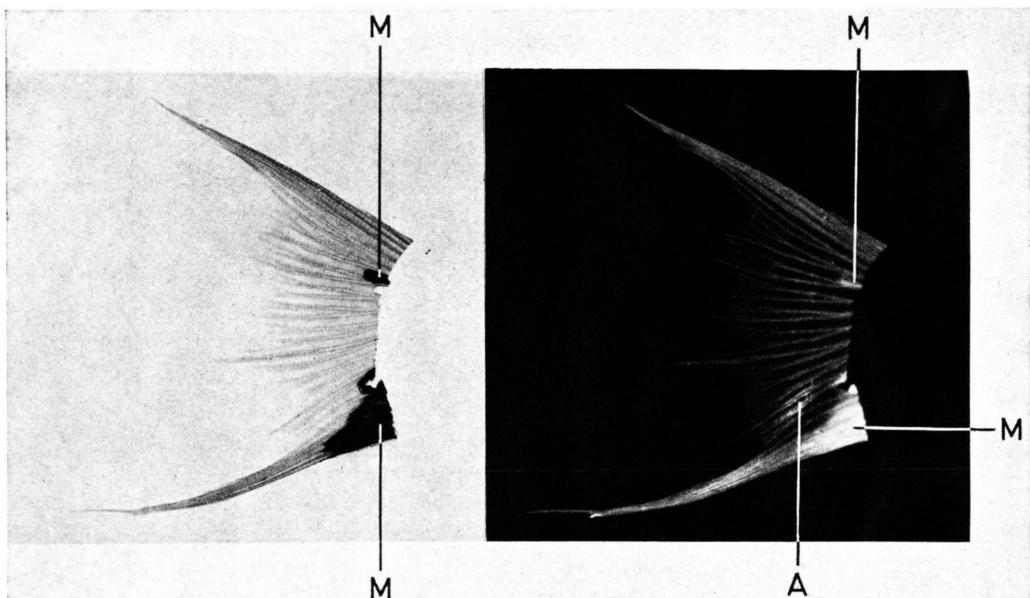


Abb. 3. Kaudalflosse eines Gattungsbastards von *Platypoecilus* und *Xiphophorus* mit zwei Melanomflecken (links) und das entsprechende Negativ der Autoradiographie (rechts). A = Artefakt, M = Melanomflecken. Tötung 4 Tage nach Injektion von 40 μ Ci [35 S] Natriumsulfat. Expositionzeit 40 Stunden. Vergrößerung 0,85-fach.

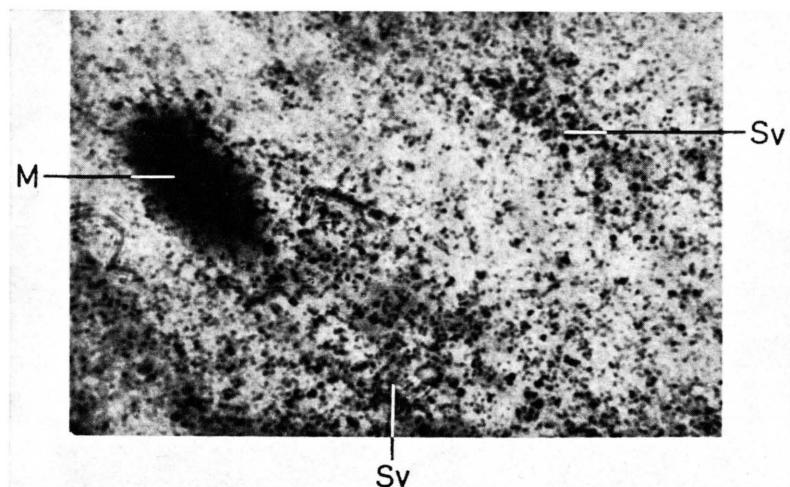
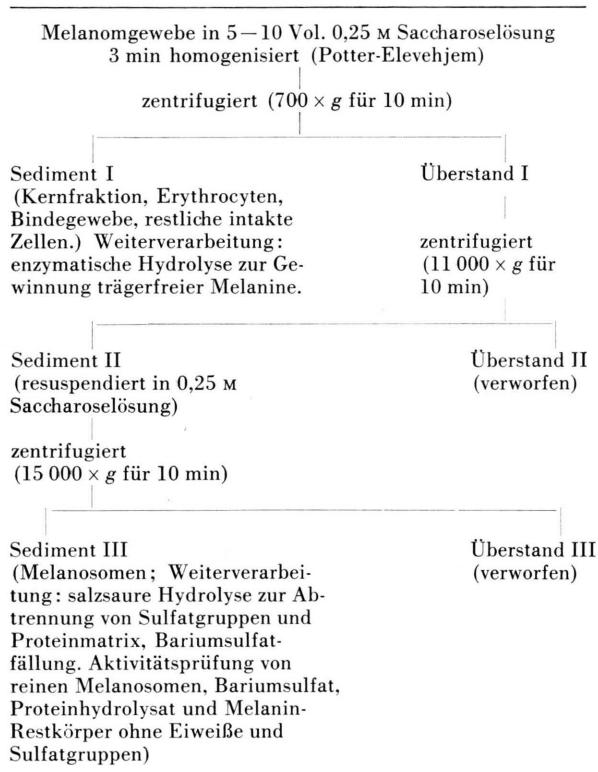


Abb. 4. Mikroautoradiographie eines Melanoms eines Gattungsbastards von *Platypoecilus* und *Xiphophorus*. Tötung 4 Tage nach Injektion von 40 μ Ci [35 S] Natriumsulfat. Expositionzeit 150 Tage. Paraffinschnitt. M = ältere noch aktive Melanophore, Sv = Silberkornverdichtung über jungen Melanophoren. Vergrößerung 563-fach.

Tab. I. Trennungsschema für Melanosomen (alle Stufen bei 0–4 °C; nach M. Seiji *et al.*, 1963¹⁸ verändert).

Tab. II. Beispiel einer Aktivitätsmessung von Melanosomen, Restmelanin ohne Proteinmatrix und Sulfatgruppen, Bariumsulfatfällung und des Eiweißhydrolysates der Proteinmatrix.

	cpm	cpm ohne Null- effekt	% der Ge- samtakti- vität ohne Nulleffekt	Menge
Nullwert	45			
Melano- somen	5.722	5.677	100	3,2 mg
Restmelanin (ohne Pro- tein u. Sul- fatgruppen)	60	15	ca. 0,3	0,6 mg
Bariumsulfat- fällung	222	5.662	ca. 99,7	249,8 mg ^x
Bariumsulfat- fällung (Blindwert)	50			278,3 mg ^x
Nullwert	21 ⁺			100 µl
Protein- hydrolysat	21,5 ⁺			100 µl

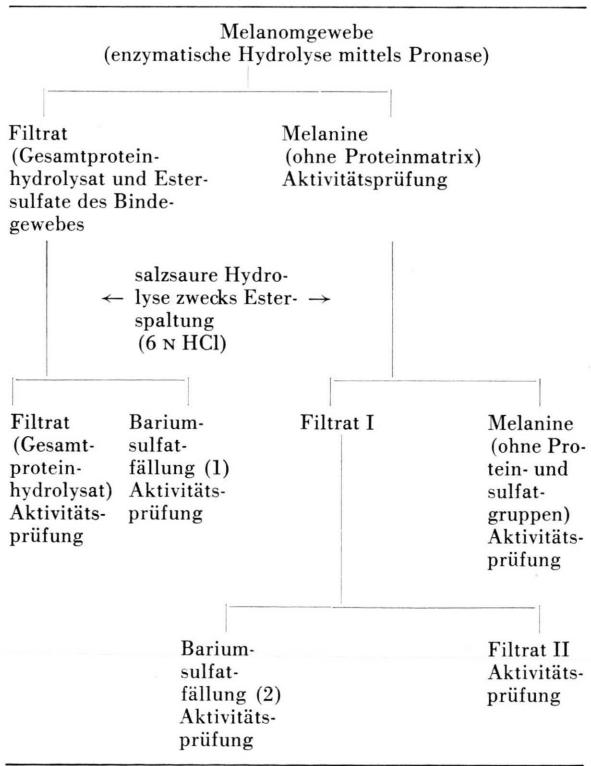
⁺ Flüssigkeitsszintillationsmessung, ^x inklusive Sulfatfällung nach Zugabe von ca. 0,04 ml Schwefelsäure (1,84).

aktives Sulfat durch Bariumsulfatfällung. Nach Abfiltrieren des Bariumsulfats wird es getrocknet und die Aktivität mittels eines Methandurchflußzählers bestimmt. Die Aktivität des Filtrats (Proteinhydrolysat) ermittelt man durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Tab. II). Da die radioaktiven Sulfationen, um eine quantitative Fällung zu garantieren, zusammen mit einem Zusatz inaktiver Sulfationen gefällt werden, ist bei Aktivitätsmessungen die erhöhte Selbstabsorption des Fällungsproduktes zu berücksichtigen und der Meßwert dementsprechend zu korrigieren.

b. Enzymatische Abtrennung reiner Melanine ohne Proteinmatrix

Reine Melanine können aus Melanomen extrahiert werden, indem man das ganze Melanomgewebe enzymatisch hydrolysiert und von den unlöslichen Melaninen abtrennt¹⁷. Zur Prüfung der Aktivitätsverteilung werden dann sowohl die Melanine als auch das restliche Melanom-Hydrolysat nochmals einer salzauren Hydrolyse unterworfen. Die beiden

Tab. III. Trennungsschema von reinen Melaninen aus Melanomen durch enzymatische Hydrolyse und Weiterverarbeitung von Melaninen und Hydrolysat für Aktivitätsprüfungen.



Hydrolysate werden getrennt auf radioaktives Sulfat bzw. radioaktives Protein und Sulfat untersucht (Tabn. III und IV).

Tab. IV. Beispiel einer Aktivitätsmessung von Melaninen ohne Proteinmatrix, von Melaninen ohne Proteinmatrix und ohne Sulfatgruppen, von Bariumsulfatfällungen und Gesamtproteinhydrolysat.

	cpm	cpm ohne Null- effekt	% der Ge- samtkap- tivität ohne Nulleffekt	Menge
Nullwert	45			
Melanine (ohne Pro- tein)	4.191	4.146	100	17,3 mg
Melanine (ohne Pro- tein und Sul- fatgruppen)	65	20	ca. 0,5	9,0 mg
Bariumsulfat- fällung (1)	1.635			230,3 mg ^x
Bariumsulfat- fällung (2)	447	4.126 (korri- giert)	ca. 99,5	192,9 mg ^x
Bariumsulfat- fällung (Blindwert)	50			278,3 mg ^x
Nullwert	21 ⁺			100 μ l
Gesamtpro- teinhydro- lysat (ohne Sulfate)	19,8 ⁺			100 μ l
Filtrat II	24,5 ⁺			100 μ l

Die Prüfung der Aktivitätsverteilung in Melanomen von Zahnkarpfen-Bastarden nach $[^{35}\text{S}]$ -Natriumsulfat-Applikation ergibt die größte Aktivitätsmenge im Bindegewebe, wobei der radioaktive Schwefel in Form einer Sulfatesterbindung sulfatierter Mucopolysaccharide vorliegt, deren Proteinkomponente frei von Radioaktivität war. Außerdem fand sich eine beachtliche Aktivität im Melanoproteinkomplex der Melanophoren. Die Untersuchung zeigt, daß auch hier der applizierte Schwefel in der prosthetischen Gruppe, dem Melanin selbst, in Sulfatesterbindung vorkommt, während die Proteinmatrix keine nachweisbare Radioaktivität zeigt.

Diskussion

Die Schwierigkeit, bei Melaninen eine strukturelle Information zu bekommen, ist darin begründet, daß dies eine gewisse Regelmäßigkeit voraussetzt. Hier-

durch unterscheidet sich die Klasse der heteropolymeren Melanine grundsätzlich von der der Nucleinsäuren, Proteine und Polysaccharide⁸. Die Angaben über den Schwefelgehalt der Melanine weichen in der Literatur stark voneinander ab. Einige Autoren fanden keinen, andere bis zu 11% Schwefel. Die ganz verschiedenen Angaben über die Zusammensetzung der Melanine beruhen zum Teil darauf, daß nicht zwei Autoren die gleiche Darstellungsmethode angewandt haben, daß keine der angewandten Methoden die Gewähr einer definierten Abbaustufe bietet²¹. Dazu kommt, daß Melanine verschiedenster Genese miteinander verglichen wurden. Fast allen Schwefelbestimmungen war eine Behandlung der Melanine mit starken Säuren, oft auch mit heißen starken Laugen vorausgegangen^{3, 6, 22}. Bei der gleichen drastischen Behandlungsmethoden bleiben zwar Sulfhydrylgruppen bzw. in einem heterocyclischen Ring eingebauter Schwefel weitgehend erhalten, läge jedoch der Schwefel in der prosthetischen Gruppe ausschließlich in Sulfatester-Bindung vor, so ist es nicht verwunderlich, wenn auf diese Art und Weise ein zuweilen negatives Ergebnis bezüglich des Schwefelgehaltes der proteinfreien Melanine vortäuscht wird. Das Pigment, das ursprünglich gebildet wurde, wird meist sehr lange in der Zelle zurückgehalten²³. Sehr lange Retentionszeiten des einmal gebildeten Melanin sprechen für die Langlebigkeit und für den geringen Umsatz oder Verlust von Melanin, was die meist ausbleibende Markierbarkeit durch radioaktiven Schwefel erklärt. Diese Befunde werden durch Untersuchungen von Fitzpatrick und Kukita²⁴ gestützt, die feststellen, daß beim adulten Huhn, Maus und Menschen die Tyrosinaseaktivität im Pigmentepithel und somit auch die Pigmentsynthese fehlten. Wie Mikroautoradiographien von Melanomen nach Radio-Sulfatinfektion zeigen, dürfte die Melaninsynthese in jungen Pigmentzellen größer sein als in reiferen, wodurch eine Aussage über das physiologische Potential der sich entwickelnden Pigmentzelle möglich ist. Die unterschiedliche Markierbarkeit der einzelnen Melanophoren eines Melanoms kann daher durch ein quantitativ unterschiedliches Verhältnis von Prämelanosomen, Melanosomen und reifer Melaninigrana in den entsprechenden Pigmentzellen bedingt sein.

Die Analyse des Melanomtrockenpulvers ergibt, daß der radioaktive Schwefel zum überwiegenden Teil in den sulfatierten Mucopolysacchariden des Melanom-Bindegewebes lokalisiert und zum gerin-

gen Teil im Melanoproteinkomplex enthalten ist. Es gilt allgemein als gesichert, daß Ruminantier²⁵ und Hühner²⁶ über die Mikroorganismen des Verdauungstraktes in geringem Umfang aus anorganischem Sulfat Proteinschwefel synthetisieren können. Aus diesem Grund muß auch bei Fischen der mögliche Einbau von Sulfatschwefel in Disulfidbrücken bzw. Sulfhydrylgruppen der Proteinmatrix der Melanine durchaus in Erwägung gezogen werden. Nach Abtrennung der Melanine vom Trägereiweiß und Untersuchung des letzteren auf Radioaktivität kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Wenn bei Fischen der Melanoproteinkomplex nach [³⁵S]Natriumsulfat-Applikation nun aber eine radioaktive Markierbarkeit zeigt, in den Trägereiweißen aber keine meßbare Aktivität nachzuweisen ist, so muß sich die Aktivität wesentlich auf die chromophore Gruppe beschränken. Hieraus resultieren Fragen nach der Art und Weise der Inkorporation des Schwefels im Melaninmolekül. Wird das radioaktive Sulfat als solches unverändert, z.B. als Schwefelsäureester in das Melanin eingebaut? Erfolgt der Einbau des Schwefels nach Reduktion in Form einer Sulfhydrylgruppe oder befindet er sich gar in einem heterocyclischen Ring der Farbgruppe? Es konnte jedoch gezeigt werden, daß bei den vorliegenden Versuchen an Gattungsbastarden von *Platypoecilus* und *Xiphophorus* markierte Derivate des radioakti-

ven Sulfats sich weder im bindegewebigen Anteil des Melanoms noch im Melanin selbst in erfassbaren Mengen vorfinden. Bariumsulfat-Fällungen lieferten den Beweis, daß der als Sulfat applizierte Schwefel auch im Melaninmolekül in unveränderter Form vorliegt.

Unter den Melanogenen findet sich nach dem bekannten Raper-Mason-Schema 5,6-Dihydroxyindol. Linnell und Raper²⁷ entdeckten im Harn von Patienten mit malignen Melanomen Thormählen positive Verbindungen, die sie als Glucuronoside bzw. Schwefelsäure-Ester von 5,6-Dihydroxyindol identifizierten. In weiteren Untersuchungen wurden die Harnmelanogene als Derivate von 5,6-Dihydroxyindol erkannt, deren Pyrrolringe und Hydroxylgruppen in Position-5 unbesetzt sind und die über das Hydroxyl in 6-Stellung mit einem der beiden Substituenten verknüpft sind²⁸. Anderson²⁹ bestätigte diese Befunde, denn nur Monosubstitutionsprodukte des 5,6-Dihydroxyindol zeigen Thormählen positive Reaktion. Aufgrund der eigenen Befunde und der Ergebnisse vorgenannter Autoren spricht alles dafür, daß bei Markierbarkeit von Melaninen nach Applikation von radioaktivem Sulfat der Schwefel in Form einer Schwefelsäureester-Bindung von 5,6-Dihydroxyindol in das heteropolymere Melaninmolekül eingebaut wird.

- 1 R. Danneel, Naturw. Rdsch. **21**, 420 [1968].
- 2 R. Breithauer, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **159**, 273 [1967].
- 3 R. A. Nicolaus, Melanins, Verlag Hermann, Paris 1968.
- 4 M. Seiji, Structure and Control of the Melanocyte, G. Della Porta and O. Mühlbock, eds., Springer-Verlag, Heidelberg 1966.
- 5 K. Hempel, Structure and Control of the Melanocyte, G. Della Porta and O. Mühlbock, eds., Springer-Verlag, Heidelberg 1966.
- 6 J. A. Serra, Chem. Products chem. News [London] **12**, 31 [1947].
- 7 J. Duchon, Parfümerie u. Kosmet. **49**, 97 [1968].
- 8 M. S. Blois, Biology of normal and abnormal Melanocytes, T. Kawamura, T. B. Fitzpatrick, and M. Seiji, eds., University Park Press, Baltimore 1971.
- 9 M. Lüdicke, Z. vergleich. Physiol. **44**, 133 [1961].
- 10 M. Lüdicke, Naturwissenschaften **49**, 189 [1962].
- 11 M. Lüdicke, Biol. Zbl. **85**, 555 [1966].
- 12 M. Lüdicke, Z. Morph. Ökol. Tiere **58**, 429 [1967].
- 13 M. Lüdicke u. H. Peterhansel, Naturwissenschaften **52**, 113 [1965].
- 14 M. Lüdicke u. D. Plesse, Z. Naturforsch. **25b**, 399 [1970].
- 15 M. Lüdicke, Z. Morph. Tiere **71**, 1 [1972].
- 16 R. Hamm u. M. Lüdicke, Z. Naturforsch. **27b**, 1258 [1972].
- 17 W. Chavin, Biology of normal and abnormal Melanocytes, T. Kawamura, T. B. Fitzpatrick, and M. Seiji, eds., University Park Press, Baltimore 1971.
- 18 M. Seiji, K. Shimao, M. S. C. Birbeck u. T. B. Fitzpatrick, Ann. New York Acad. Sci. **100**, 497 [1963].
- 19 F. Anders, K. Klinke u. U. Vielkind, Biologie in unserer Zeit **2**, 35 [1972].
- 20 R. Süss, V. Kinzel u. J. D. Scribner, Krebs, Heidelberger Taschenbücher Bd. 82, Springer-Verlag, Berlin 1970.
- 21 H. Waelisch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **213**, 35 [1932].
- 22 R. A. Nicolaus, M. Piatelli u. E. Fattorusso, Tetrahedron [London] **20**, 1163 [1964].
- 23 S. S. Greenberg u. M. J. Kopac, Ann. New York Acad. Sci. **100**, 887 [1963].
- 24 T. B. Fitzpatrick and A. Kukita, Pigment Cell Biology, M. Gordon, ed., Academic Press Inc., Publishers — New York, N. Y. 1959.
- 25 P. J. Block, J. A. Stekol u. J. K. Loosli, Arch. Biochem. and Biophysics **33**, 353 [1951].
- 26 L. J. Machlin, P. B. Pearson, C. A. Denton u. H. R. Bird, J. biol. Chemistry **205**, 213 [1953].
- 27 L. Linnell u. H. S. Raper, Biochem. J. **29**, 76 [1935].
- 28 G. Leonardi, Naturwissenschaften **42**, 17 [1955].
- 29 A. B. Anderson, Biochem. J. **83**, 10 P [1962].