

Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kai Uwe Salzbrunn
geb. in Mainz

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Tyrosinase - eine Polyphenoloxidase	1
1.2	Die Struktur der Tyrosinase	3
1.3	Der Reaktionsmechanismus der Tyrosinase	6
1.4	Die Melaninbiosynthese.....	9
1.5	Bakterielle Tyrosinasen	12
1.6	Biologische Funktion und biotechnologische Anwendung der Polyphenoloxidasen	15
1.7	Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen	17
1.8	Ziele dieser Arbeit	20
2.	Material und Methode	22
2.1	Geräte und Hilfsmittel	22
2.2	Chemikalien	26
2.3	Mikrobiologische Methoden	29
2.3.1	Bakterien-Stämme	29
2.3.2	Medien	29
2.3.3	Kultivierung von <i>Streptomyces spec.</i>	31
2.3.3.1	Anlegen von Dauerkulturen	31
2.3.3.2	Herstellung von Sporensuspensionen	31
2.3.3.3	Kultivierung von <i>S. antibioticus</i> im Labormaßstab und Aufarbeitung der Kulturüberstände.....	31
2.3.3.4	Kultivierung von <i>S. antibioticus</i> im halb-technischen Maßstab und Aufarbeitung der Kulturüberstände	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	34
2.4.1	Bakterien-Stamm	34
2.4.2	Plasmid	34
2.4.3	Medien	35
2.4.4	Puffer und Lösungen	36
2.4.5	Protoplastierung	37
2.4.6	Transformation	38
2.4.7	Kultivierung des Produktionsstamms	38
2.5	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1	Puffer und Lösungen	39
2.5.2	Aufreinigung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand	42
2.5.2.1	Kationen-Austausch-Säulen... ..	42
2.5.2.2	Kationen-Austausch (batch-Verfahren)	43
2.5.2.3	Anionen-Austausch (batch-Verfahren)	43

2.5.2.4	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	43
2.5.3	Isolation von Hämocyanin aus der Hämolymphe von <i>Eurypelma californicum</i>	44
2.5.4	Extraktion von Proteinen aus der Kutikula von <i>Eurypelma californicum</i>	44
2.5.5	Proteinbestimmung	44
2.5.5.1	Bradford-Test	45
2.5.5.2	Lowry-Test	45
2.5.5.3	Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm	46
2.5.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	46
2.5.6.1	SDS-PAGE	47
2.5.6.2	Native PAGE	48
2.5.6.3	Coomassie-Färbung	49
2.5.6.4	Silber-Färbung	49
2.5.7	Western Blot	49
2.5.7.1	Elektrotransfer auf PVDF-Membranen	50
2.5.7.2	N-terminale Sequenzierung	50
2.5.7.3	Elektrotransfer auf Nitrocellulose-Membranen	50
2.5.7.4	Immunochemische Detektion	51
2.5.8	Massenspektrometrie	51
2.5.9	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	52
2.5.9.1	Analytische IEF	52
2.5.9.2	Präparative IEF	53
2.5.10	Spektroskopie	54
2.5.10.1	Absorptions-Spektroskopie	54
2.5.10.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	54
2.5.11	Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität	55
2.5.11.1	Dopachrom-Assay	55
2.5.11.2	MBTH-Assay	56
2.5.11.3	Sauerstoffverbrauchsmessung	57
2.5.12	Enzymkinetiken	59
2.6	Homologie-Modelling	59
3.	Ergebnisse	61
3.1	Reinigung der Tyrosinase aus <i>Streptomyces antibioticus</i>	61
3.1.1	Kultivierung von <i>S. antibioticus</i> im Labor-Maßstab	62
3.1.1.1	Einfluss des Kulturmediums auf die Expression der Tyrosinase	62
3.1.1.2	Anreicherung der Tyrosinase aus dem Kulturmedium	66
3.1.1.3	Analytische isoelektrische Fokussierung des Kulturmediums	69
3.1.1.4	Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturmedium	71

3.1.2	Kultivierung von <i>S. antibioticus</i> im halb-technischen Maßstab	76
3.1.2.1	Kultivierungsverlauf	76
3.1.2.2	Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand mittels Kationen-Austausch	78
3.1.2.3	Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand mittels Anionen-Austausch	82
3.1.2.4	Reinigung der Tyrosinase mittels Größenausschluss-Chromatographie	84
3.1.3	Rekombinante Expression der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	92
3.1.3.1	Transformation von <i>S. lividans</i>	92
3.1.3.2	Selektion der Transformanten	92
3.1.3.3	Zellaufschluss	93
3.2	Physiko-chemische Charakterisierung der Tyrosinase aus <i>Streptomyces antibioticus</i>	95
3.2.1	Denaturierende SDS-PAGE und analytische IEF	95
3.2.2	N-terminale Sequenzierung	96
3.2.3	UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie	97
3.3	Homologie-Modell der Tyrosinase aus <i>Streptomyces antibioticus</i> ...	98
3.4	Kinetische Charakterisierung der Tyrosinasen aus <i>Streptomyces antibioticus</i> und <i>Agaricus bisporus</i>	108
3.4.1	Enzyme	108
3.4.2	Substrate	110
3.4.3	Umsatz-Kinetik der Tyrosinase-Reaktion	114
3.4.3.1	Umsatz von L-Dopa	115
3.4.3.2	Umsatz von Dopamin	117
3.4.3.3	Umsatz von Tyramin	119
3.4.3.4	Umsatz von L-Tyrosin-Methylester	121
3.4.4	Inhibition der Tyrosinase-Reaktion	123
3.4.4.1	Inhibition durch Mimosin	124
3.4.4.2	Inhibition durch Homocystein	129
3.4.5	Einfluss von Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Tyrosinase	133
3.5	Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen und SDS-aktiviertes Hämocyanin	141
3.5.1	Quervernetzen von Hämocyanin durch Tyrosinasen	141
3.5.2	Quervernetzen von Albumin durch Tyrosinasen	144
3.5.3	Quervernetzen von Hämocyanin durch Zugabe von SDS-aktiviertem Hämocyanin	146
3.5.4	Quervernetzen von Hämocyanin bei der SDS-Aktivierung	147
3.5.5	Proteinextraktion aus der Kutikula von <i>Eurypelma californicum</i>	149
3.5.5.1	Extraktion der Proteine	150
3.5.5.2	Immunochemische Detektion von Hämocyanin	151

4.	Diskussion	152
4.1	Anreicherung und Reinigung der nativen Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	152
4.1.1	Wahl des Kulturmediums und Festlegung der idealen Kultivierungsbedingungen für <i>S. antibioticus</i>	152
4.1.2	Reinigung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand	153
4.2	Rekombinante Überexpression der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	155
4.2.1	Wahl des Expressionssystems	155
4.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	157
4.3	Die 3-dimensionale Struktur der Tyrosinase aus <i>Streptomyces spec.</i>	158
4.4	Der Reaktionsmechanismus der Tyrosinase	162
4.5	Die Reaktionskinetik der Tyrosinase	165
4.5.1	Unterschiede in der Reaktionskinetik der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>A. bisporus</i>	165
4.5.2	Einfluss von Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i>	167
4.6	Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen und aktiviertes Hämocyanin	170
4.6.1	Unterschiedliche Effizienz beim Einsatz verschiedener Tyrosinasen	170
4.6.2	Die Aktivierung von Hämocyanin zur Polyphenoloxidase	173
4.6.3	Die Rolle des Hämocyanins bei der Quervernetzung von Proteinen während der Häutung und Wundheilung bei Arthropoden	174
5.	Zusammenfassung	176
6.	Literatur	178
7.	Verzeichnisse	198
7.1	Abkürzungsverzeichnis	198
7.2	Abbildungsverzeichnis	201
7.3	Tabellenverzeichnis	204
8.	Anhang	205
8.1	Sequenz-Alignments	205
8.2	Sequenzierungsergebnisse	208
9.	Danksagung	213
10.	Lebenslauf	214

1. Einleitung

In nahezu allen Organismengruppen von den Bakterien bis hin zu den Wirbeltieren findet man kupferhaltige Enzyme, die an der oxidativen Umsetzung von Phenolen zu Chinonen beteiligt sind [1-3]. Diese, oft als Polyphenoloxidasen (PPO) bezeichnete Gruppe von Enzymen beinhaltet Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Laccasen, deren gemeinsames Merkmal ein zweikerniges Typ-3-Kupferzentrum ist [4]. Die von ihnen gebildeten, hoch reaktiven Chinone polymerisieren weitgehend autokatalytisch zu Melanin, dem gelben bis schwarzen Pigment, das für die Bräunung von verletztem Pflanzengewebe ebenso verantwortlich ist, wie für die Farbgebung von Haut, Haaren und Augen beim Menschen.

1.1 Tyrosinase - eine Polyphenoloxidase

Die Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) katalysiert als Schlüssel-Enzym der Melaninbiosynthese zwei unterschiedliche Reaktionen, bei denen molekularer Sauerstoff verbraucht wird. Diese sind zum einen die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen, zum anderen die Zweielektronen-Oxidation der entstehenden *o*-Diphenolen zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen. Beide Reaktionen laufen am gleichen aktiven Zentrum ab [1, 5, 6]. Die beiden Enzymaktivitäten werden nach den umgesetzten Substraten bezeichnet, im ersten Fall also Monophenolase- oder Cresolase-Aktivität, im zweiten Fall Diphenolase- bzw. Catecholase-Aktivität. Namensgebend für das Enzym ist das Monophenol L-Tyrosin, dessen Hydroxylierungs-Produkt 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) gleichzeitig Substrat für die Diphenol-Oxidation ist. Das hierbei entstehende Dopachinon (4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon) bildet dann den Ausgangspunkt der Melaninbildung (Abb. 1.4). Die Tyrosinase-Reaktion stellt somit den limitierenden Schritt dieses Stoffwechsel-Prozesses dar.

Die vor allem in Pflanzen und Pilzen vorkommende Catecholoxidase (E.C. 1.10.3.1) katalysiert ebenso wie die Tyrosinase die Oxidation von *o*-Diphenolen zu *o*-Dichinonen, jedoch ist sie nicht in der Lage, Monophenole zu hydroxylieren [7, 8] (Abb. 1.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Tyrosinase gleichzeitig auch eine Catecholoxidase darstellt, kam es mit der Zeit in der Literatur zu einer recht uneinheitlichen Benennung dieser Enzyme, zumal eine eindeutige Unterscheidung bisweilen schwierig ist.

Viele Autoren verwenden heute neben Catecholoxidase (CO) den Begriff Polyphenoloxidase (PPO) synonym für Tyrosinase. Zudem wird auf diese Weise auch oft zwischen pflanzlichem (PPO) und tierischem (TY) Ursprung unterschieden. Dennoch hat sich PPO als Oberbegriff für Tyrosinasen und Catecholoxidasen aus allen Organismen vielerorts etabliert [9, 10]. Der Begriff Phenoloxidase (PO) wird hingegen meist im Zusammenhang mit Tyrosinasen und Catecholoxidasen aus Arthropoden verwendet. Da sich die Invertebraten-Tyrosinase in einigen biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika, wie Glykosylierungsmuster, Signalpeptid, Substratspezifität und Reaktionsablauf von der Säugetier-Tyrosinase unterscheidet, grenzen einige Autoren auch diese Enzyme namentlich voneinander ab [11, 12]. Der Begriff Phenolase ist hingegen nicht mehr gebräuchlich und nur in frühen Veröffentlichungen zu finden.

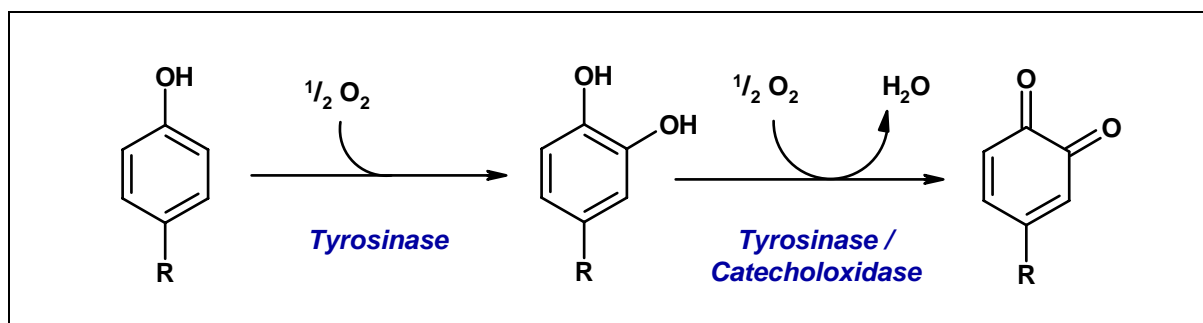


Abb. 1.1: Reaktionen der *Tyrosinase* und der *Catecholoxidase*. *Tyrosinasen* katalysieren die *o*-Hydroxylierung von Monophenolen zu Diphenolen, sowie die Oxidation von *o*-Diphenolen zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen. In beiden Reaktionen wird molekularer Sauerstoff verbraucht. *Catecholoxidasen* katalysieren dagegen lediglich die Bildung von *o*-Dichinonen aus *o*-Diphenolen.

Anders als Tyrosinasen und Catecholoxidasen oxidieren Laccasen (E.C. 1.10.3.2) neben *o*-Dichinonen auch eine Reihe weiterer phenolischer Substrate wie *para*-substituierte Diphenole und Arylamine [13]. Diese Enzyme verfügen neben einem zweikernigen Typ-3-Kupferzentrum zusätzlich über je ein einkerniges Typ-1- und Typ-2-Kupferzentrum. Die Oxidation des Substrats erfolgt am Typ-1-Kupfer durch den Transfer von vier einzelnen Elektronen, die am Typ-3-Kupferzentrum in zwei Schritten paarweise auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Das Typ-2-Kupferzentrum, das mit dem Typ-3-Kupferzentrum einen dreikernigen Komplex bildet, dient zum einen dem Transport der Elektronen vom Typ-1- zum Typ-3-Kupfer, zum anderen reoxidiert es das Typ-1-Kupfer. Bei der Oxidation der Substrate entstehen reaktive Radikale, die durch nicht-enzymatische Kopplung Polymere bilden oder

durch die radikalische Spaltung von kovalenten Bindungen komplexe biologische Polymere abbauen können [14].

Bei den Polyphenoloxidasen handelt es sich wie eingangs erwähnt um Enzyme mit Typ-3-Kupferzentren. Zu dieser Gruppe von Proteinen zählt ebenfalls das Hämocyanin, ein respiratorisches Protein aus Arthropoden und Mollusken, das für den Transport von Sauerstoff in der Hämolymphe verantwortlich ist.

Die Hämocyanine aus Arthropoden und Mollusken unterscheiden sich zwar in Sequenz und Struktur maßgeblich, zeichnen sich aber beide durch die hochkooperative Bindung von Sauerstoff aus [15-17]. Im Gegensatz zu den Polyphenoloxidasen bilden die Hämocyanine sehr große Oligomere, die beim Hämocyanin der Arthropoden aus Hexameren und Vielfachen davon, bis hin zu 8 x 6-meren bestehen, während Hämocyanine aus Mollusken Hohlzylinder aus Dekameren oder Didekameren bilden [15-20]. Das Hämocyanin einiger Crustaceen und Mollusken verfügt im nativen Zustand über eine geringfügige Diphenoloxidase-Aktivität, die sich *in vitro* durch limitierte Proteolyse oder die Zugabe von SDS induzieren lässt [21-26]. Durch SDS-Zugabe können auch latente Polyphenoloxidasen aus Pflanzen und Pilzen aktiviert werden [27, 28].

1.2 Die Struktur der Tyrosinase

Mittlerweile sind Röntgenkristallstrukturen von Vertretern aller Klassen der Typ-3-Kupferproteine bekannt: Das Hämocyanin aus der kalifornischen Languste *Panulirus interruptus* in der *deoxy*-Form [29, 30], das Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* in der *oxy*- und *deoxy*-Form [31, 32], das Hämocyanin aus der Riesenkralke *Octopus dofleini* in der *oxy*-Form [33], das Hämocyanin der marinen Schnecke *Rapana thomasiana* in der *deoxy*-Form [34] und die Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *Ipomoea batatas* in *deoxy*-, *met*- und inhibitorgebundener Form [35].

Die ersten Kristallstrukturen einer Tyrosinase als Komplex mit einem assoziierten Hilfsprotein wurden erst vor einigen Monaten in allen katalyserelevanten Oxidationszuständen, sowie einer kupferfreien und einer inhibitorgebundenen Form mit Auflösungen von 1,2 - 1,8 Å bestimmt [36]. Hierzu wurde das Enzym aus dem Bodenbak-

terium *Streptomyces castaneoglobisporus* verwendet, das rekombinant in großen Mengen hergestellt werden kann [37]. Bereits vor diesem Zeitpunkt war jedoch, ausgehend von spektroskopischen Untersuchungen anzunehmen, dass das aktive Zentrum der Tyrosinase dem von Catecholoxidasen und Hämocyaninen sehr ähnlich sein muss [2, 38]. Vergleichende Untersuchungen an anorganischen Modellkomplexen offenbarten zudem, dass der molekulare Sauerstoff während der Reaktion an Typ-3-Kupferzentren in einer ungewöhnlichen *side-on* Verbrückung ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$) als Peroxid gebunden ist [39, 40]. Dieser Befund wurde erst später, sowohl anhand der Kristallstrukturen von *oxy*-Hämocyaninen aus Arthropoden [32] und Mollusken [33], als auch durch UV/Vis- und Raman-Resonanz-Spektroskopien an oxygenierten Catecholoxidasen bestätigt [41]. Ein *side-on* verbrückend gebundener Peroxidligand konnte erwartungsgemäß auch in der Kristallstruktur der *oxy*-Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* nachgewiesen werden [36].

Die dreidimensionale Struktur der Tyrosinase, sowie eine Darstellung des aktiven Zentrums sind in Abb. 1.2 wiedergegeben.

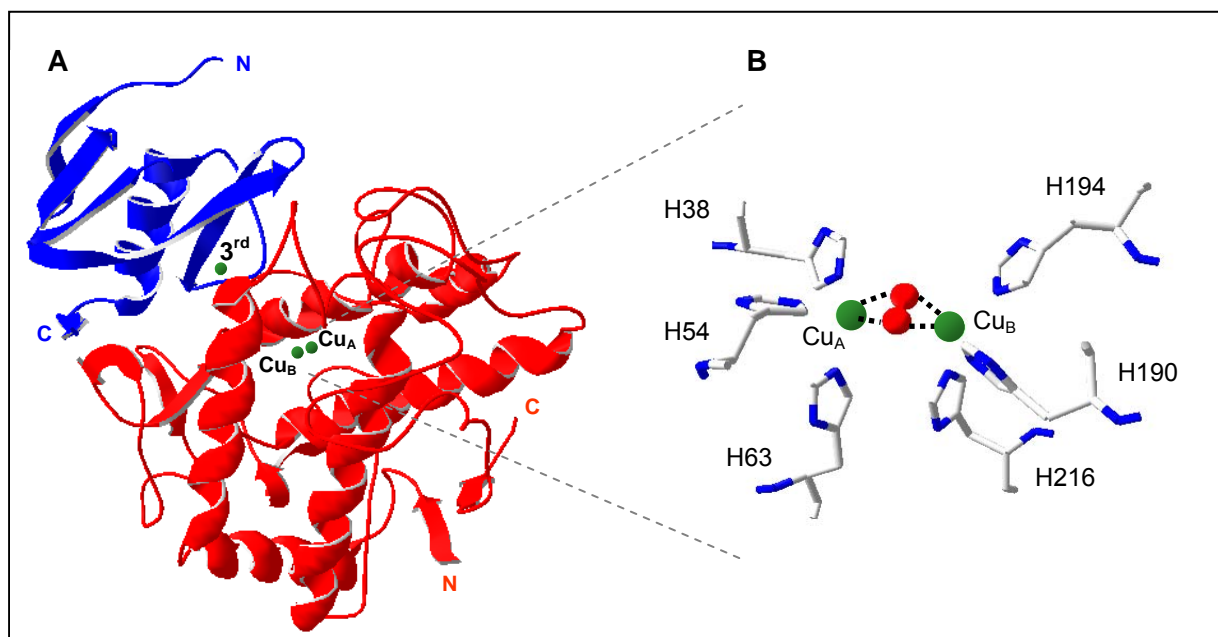


Abb. 1.2: Röntgenkristallstruktur der Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*.

A: Struktur der Tyrosinase (rot) als Komplex mit ORF378 (blau) in der Bänderdarstellung. Drei der insgesamt sechs identifizierten Kupferatome sind dargestellt (grün), zwei davon im aktiven Zentrum der Tyrosinase (Cu_A und Cu_B), das dritte (3rd) an der Oberfläche von ORF378.

B: Das aktive Zentrum der Tyrosinase in der *oxy*-Form. Cu_A wird von den Histidinen H38, H54 und H63 koordiniert, Cu_B von den Histidinen H190, H194 und H216. Zwischen beiden Cu-Atomen ist molekularer Sauerstoff *side-on* verbrückend gebunden.

Die Tyrosinase ist als Komplex mit dem Hilfsprotein ORF378 nahezu ellipsoid mit Abmessungen von 40 x 55 x 60 Å.

Die 31 kDa schwere Tyrosinase beinhaltet neben wenigen β -Faltblatt-Strukturen ausgedehnte α -helicale Bereiche, von denen einige (α_2 , α_3 , α_6 und α_7) in der Mitte des Proteins ein *4- α -helix-bundle* bilden, in welches das katalytische, dinukleare Kupferzentrum eingebettet ist. Beide Kupferatome werden, wie in allen Typ-3-Kupferzentren von jeweils drei Histidinen koordiniert, Cu_A von H38, H54 und H63, Cu_B von H190, H194 und H216. Das aktive Zentrum befindet sich unverdeckt am Grund einer breiten Tasche.

Das co-exprimierte, 13 kDa schwere Hilfsprotein ORF378 bildet mit der Tyrosinase einen binären Komplex und schirmt dabei das aktive Zentrum der Tyrosinase ab. Es besitzt ein sechssträngiges β -Faltblatt, sowie eine α -Helix und verfügt über strukturelle Ähnlichkeit mit SH2-Domänen. ORF378 unterstützt die Faltung und dient dem Transport von Cu(II)-Ionen in das aktive Zentrum der kupferlosen Apotyrosinase. Der Komplex beider Proteine stellt somit ein Intermediat vor der Aktivierung der Tyrosinase durch Abdissoziieren des ORF378 von der vollständig gefalteten, kupferhaltigen Tyrosinase dar. Interessanterweise ragt eine vom Hilfsprotein stammende Tyrosin-Seitenkette (Y98) in die Tasche des aktiven Zentrums, wird aber aufgrund der Distanz zum Cu₂O₂-Komplex nicht hydroxyliert.

Eine ähnliche Konfiguration findet sich auch bei der inaktiven Form der Catecholoxidase und beim Hämocyanin der Arthropoden und Mollusken, wobei in diesen Fällen kein Hilfsprotein, sondern eine weitere Protein-Domäne das aktive Zentrum abschirmt. Beim Hämocyanin aus *L. polyphemus* ragt ein Phenylalaninrest (F49) aus der N-terminalen Domäne I in das aktive Zentrum, das in der zentralen Domäne II lokalisiert ist [24]. F49 ist dabei sehr ähnlich orientiert, wie das Y98 vom ORF378 im aktiven Zentrum der Tyrosinase. Die Orientierung dieser Seitenketten wird unter anderem jeweils durch die hydrophobe Wechselwirkung mit einer Histidyl-Gruppe festgelegt, die an der Koordinierung von Cu_B beteiligt ist (H194 in der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase bzw. H328 im *L. polyphemus*-Hämocyanin). Im Hämocyanin von *O. dofleini* wird der Zugang zum aktiven Zentrum durch die C-terminale Domäne blockiert, aus der ein Leucinrest (L2830) in die Tasche hineinragt, die das aktive Zent-

rum enthält [42]. Somit können Hämocyane im nativen Zustand lediglich Sauerstoff binden und transportieren, während Tyrosinasen nach dem Ablösen ihres Hilfsproteins mono- und diphenolische Substrate umsetzen können, da der Zugang zum aktiven Zentrum freigelegt worden ist [6, 24, 43-45].

Die Catecholoxidasen werden zunächst ebenfalls als inaktive Proenzyme exprimiert, deren aktives Zentrum durch eine C-terminale Domäne blockiert ist. Die Aktivierung erfolgt vermutlich durch limitierte Proteolyse, bei der diese Domäne abgespalten wird. Bei der Catecholoxidase bleibt der Zugang zum aktiven Zentrum jedoch eingeschränkt, da das Cu_A -Atom durch einen Phenylalaninrest (F261) abgeschirmt wird [6, 35, 44]. Dieser Umstand ist möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität von Catecholoxidasen und Tyrosinasen.

1.3 Der Reaktionsmechanismus der Tyrosinase

Zur Erklärung des molekularen Mechanismus der Tyrosinase-katalysierten Reaktion wurden in der Vergangenheit bereits einige Modelle publiziert, die jedoch alle nicht experimentell belegt werden konnten [1, 46-50]. Die Schwierigkeit hierbei besteht vor allem darin, dass neben den beiden Enzymaktivitäten (Mono- und Diphenolase-Aktivität) auch die Lag-Phase erklärt werden muss, die beim Umsatz monophenolischer Substrate zu beobachten ist. Auf der Basis einiger dieser kinetischen Modelle wurde erst kürzlich von Tepper *et al.* ein neues Modell vorgeschlagen [51], das in Abb. 1.3 schematisch dargestellt ist.

Ausgangspunkt der Monophenolase-Reaktion ist die Bindung von molekularem Sauerstoff an das reduzierte Kupferzentrum der Tyrosinase (TY_{red}), das dadurch oxygeniert wird (TY_{oxy}). Monophenolisches Substrat kann nun mit der Hydroxylgruppe an eines der Kupferatome binden (hier: Cu_B) und wird dabei so orientiert, dass nach Abgabe eines Protons an eine Base (B) ein Sauerstoffatom des Peroxids auf das Substrat übertragen werden kann. Das auf diese Weise entstandene Diphenol kann nun entweder abdissoziieren oder direkt zum Dichinon oxidiert werden. Die intermediär vorliegende *met*-Form des Enzyms ($\text{Ty}_{\text{met}}^{\text{D}}$), in der die beiden Kupferatome durch den *o*-Sauerstoff des Phenols verbrückt sind, konnte experimentell belegt werden [52-54] und steht im Gegensatz zu der Annahme, dass die Verbrückung der beiden Kupferatome über ein für die *met*-Form typisches Hydroxid-Ion erfolgt [47,

50, 55-57]. Die Bindung von Monophenolen an Cu_B wurde aus ESR- und NMR-Messungen bei der Bindung von *p*-Nitrophenol an die *halb-met*-Form $[\text{Cu(I)-Cu(II)}]$ der *S. antibioticus*-Tyrosinase gefolgert. Das Strukturmodell dieser Bindung basiert dabei lediglich auf einer semi-quantitativen Datenanalyse, echte Strukturinformationen über das aktive Zentrum des Enzyms lagen nicht vor [51-54]. Die von Decker *et al.* [6, 44] postulierte Wechselwirkung von Monophenolen mit dem Cu_A -Atom, deren Koordination mit Hilfe synthetischer Kupfer-Komplexe belegt werden kann [58], ist mit dem dargestellten Modell vereinbar, da die grundsätzliche Forderung der direkten Umsetzung von Monophenolen zu Dichinonen über ein *oxy*-Monophenol-Intermediat (TY_{oxy}^M) erfüllt ist. Somit entfällt die Unterteilung der Monophenolase-Aktivität der Tyrosinase in zwei aufeinander folgende Reaktionsschritte aus Monophenol-Hydroxylierung und Diphenol-Oxidation, vielmehr erfolgt die Reaktion in einem Schritt, ohne ein Intermediat zu entlassen.

Die Bindung von Monophenolen an die *met*-Form der Tyrosinase führt zur Bildung eines *dead end* Komplexes (TY_{met}^M), an dem keine Hydroxylierungsreaktion stattfinden kann [50]. Hieraus erklärt sich die Lag-Phase, die bei der Umsetzung von Monophenolen zu beobachten ist [48, 61, 62]. Da die Tyrosinase unter Standardbedingungen nur zu etwa 10-15 % in der *oxy*-Form und zu etwa 85-90 % in der *met*-Form vorliegt [63, 64], kann nur ein kleiner Anteil des Enzyms Monophenole umsetzen. Erst die entstehenden Diphenole können die *met*-Form in die reduzierte Form überführen, welche dann wiederum Sauerstoff binden und Monophenole umsetzen kann. Das Erreichen eines *steady state* wird dadurch mehrere Minuten verzögert. Die Dauer der Lag-Phase ist abhängig vom biologischen Ursprung des Enzyms [65], der Monophenol- [66] und Enzymkonzentration [67], sowie der Anwesenheit katalytischer Mengen *o*-Diphenol [68] oder Übergangsmetall-Ionen (z. B. Fe^{2+}) [69], die die Lag-Phase verkürzen oder völlig aufheben. Die Lag-Phase ist nur bei monophenolischen Substraten zu beobachten, da Diphenole sowohl mit der *oxy*-Form, als auch mit der *met*-Form der Tyrosinase reagieren können und somit bei diesen Substraten sehr schnell ein *steady state* erreicht wird.

Ausgangspunkt der Diphenolase-Reaktion ist ebenfalls die Bindung von Sauerstoff und die darauf folgende Wechselwirkung von Substrat mit dem oxygenierten Kupferzentrum der Tyrosinase (TY_{oxy}). Nach der Zweielektronen-Oxidation des Diphenols und dem Abdissoziieren des Dichinons, verbleibt das Kupferzentrum mit einem verbückenden Hydroxid-Ion in der *met*-Form (TY_{met}). In diesem Zustand kann die Bin-

dung eines zweiten Diphenols erfolgen (TY_{met}^D), welches auch zum Dichinon oxidiert wird. Dadurch wird das Kupferzentrum in die reduzierte Ausgangsform (TY_{red}) überführt und kann für den nächsten Zyklus molekularen Sauerstoff binden. In der Summe werden zwei *o*-Diphenole zu zwei *o*-Dichinonen oxidiert, wobei ein Molekül Sauerstoff zu zwei Molekülen Wasser reduziert werden [50]. Die Oxidation der Diphenole erfolgt offensichtlich über den Transfer von jeweils zwei Elektronen, da keine Semichinon-Intermediate nachgewiesen werden konnten [59, 60].

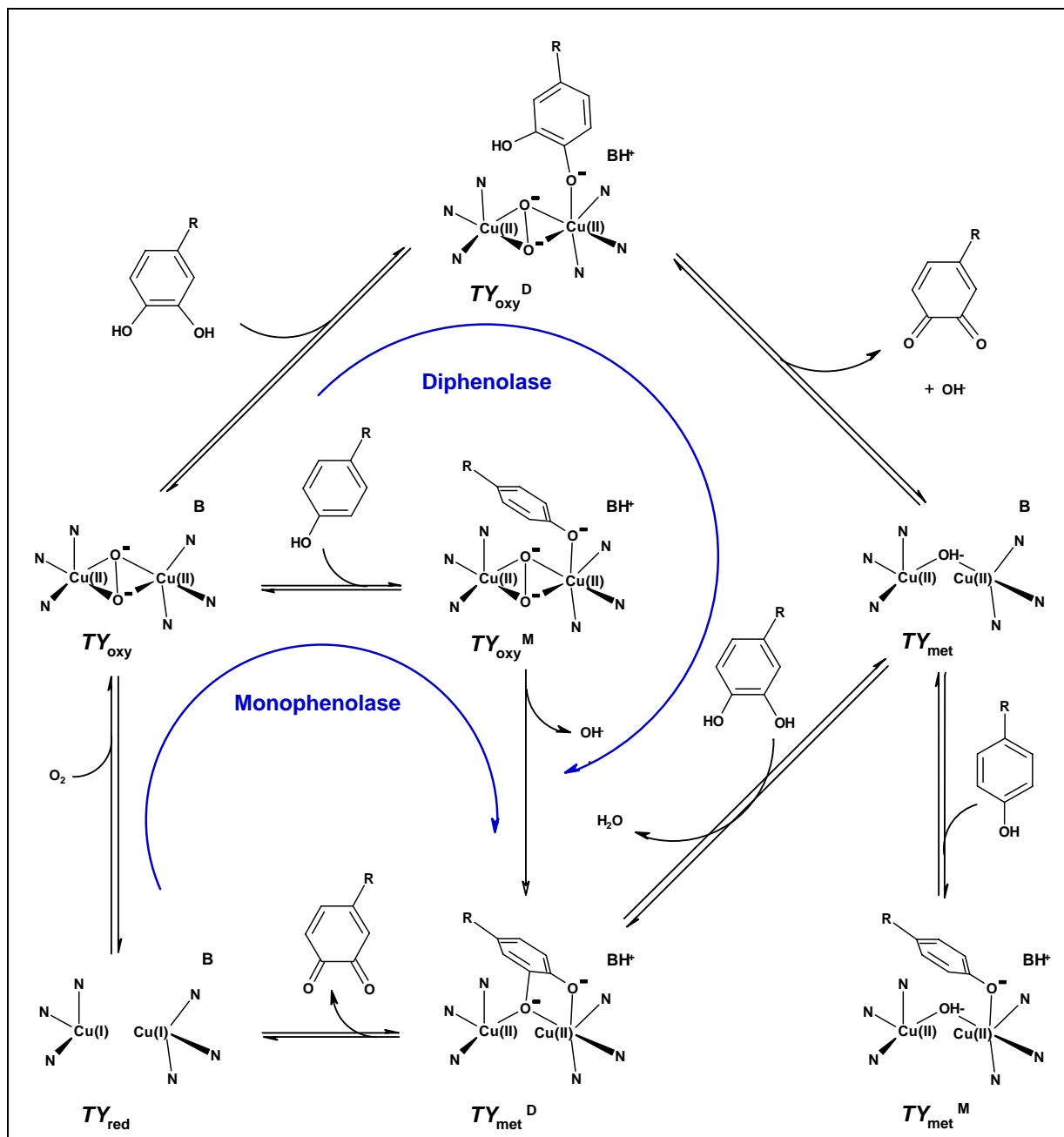


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Tyrosinase nach dem Modell von Tepper *et al.*, 2005 [51], verändert. Die Substratbindung an das Cu_B -Atom (rechts) ist dabei nicht zwingend erforderlich, sondern kann prinzipiell auch an Cu_A erfolgen. Erläuterungen im Text.

Der Diphenolase-Mechanismus des oben dargestellten Modells ist prinzipiell auch für Catecholoxidasen anwendbar. Eine dem Modell analoge Orientierung von monophenolischem Substrat wird im Fall der Catecholoxidase aus *I. batatas* allerdings durch das im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt Phenylalanin an der Position 261 verhindert, welches das Kupferzentrum teilweise verdeckt und schon als mögliche Erklärung für die fehlende Monophenolase-Aktivität der Catecholoxidasen in Betracht gezogen wurde. Zudem scheint eines der kupfer-kordinierenden Histidine an der Orientierung von Substraten im aktiven Zentrum von Tyrosinasen und Catecholoxidasen maßgeblich beteiligt zu sein. In der Kristallstruktur der inhibitorgebundenen Catecholoxidase wird der Phenylring des Inhibitors Phenylthioharnstoff (PTU), ein Substrat-Analogon, durch das kupfer-kordinierende Histidin 244 stabilisiert. Bei der inaktiven Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* ist ein Tyrosin (Y98) des Hilfsproteins auf sehr ähnliche Weise in der Nähe des kupfer-kordinierenden Histidin 194 orientiert und im Hämocyanin von *L. polyphemus* befindet sich ein Phenylalanin (F49) nahe dem ebenfalls kupfer-kordinierenden Histidin 328 (siehe oben).

Betrachtet man den Phenylring von PTU als potentiell Substrat, bleibt festzustellen, dass im Falle der Catecholoxidase die Abschirmung durch F261 dazu führt, dass keine effektive Annäherung des Substrats an das Cu_A -Atom möglich ist [6, 35, 44, 51]. Dies stützt zwar die Annahme, dass Monophenole für die Hydroxylierung an Cu_A binden, die Kristallstrukturen der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* lassen jedoch auch die Möglichkeit zu, dass Monophenole an Cu_B binden, um hydroxyliert zu werden. Der Vergleich mit der Struktur der Catecholoxidase, sowie der hypothetischen Struktur von aktiviertem Hämocyanin deutet jedoch darauf hin, dass die Hydroxylgruppe der Monophenole an Cu_A binden muss [6, 42].

Somit liefert selbst die exakte Kenntnis über die räumlichen Verhältnisse am aktiven Zentrum der Tyrosinase *a priori* keine eindeutigen Hinweise auf die tatsächlichen Mechanismen der Katalyse. Die Klärung dieser Fragestellung steht somit noch aus und ist Gegenstand aktueller Studien [6, 70].

1.4 Die Melaninbiosynthese

Melanin ist ein in der Natur sehr weit verbreitetes, strukturell inhomogenes, polyphenolisches Biopolymer, das als Pigment in vielen Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tie-

ren zu finden ist. Neben der Farbgebung ist es auch für den Schutz vor UV-Strahlung und toxischen, freien Radikalen verantwortlich.

In Abb. 1.4 ist der Ablauf der Biosynthese des Melanins schematisch in Anlehnung an Sanchez-Ferrer *et al.* [50], Kobayashi *et al.* [71] und Seo *et al.* [72] dargestellt.

Der Biosyntheseweg der Melaninbildung (Melanogenese) wurde größtenteils bereits von Raper [73], Mason [74] und Lerner [61] aufgeklärt und lässt sich in eine proximale und in eine distale Phase unterteilen.

In der proximalen Phase der Melanogenese erfolgt die Hydroxylierung und Oxidation von Tyrosin bzw. Dopa durch die Tyrosinase, wobei das entstehende *o*-Dopachinon spontan zum instabilen Leukodopachrom zyklisiert und sehr schnell autokatalytisch zum Dopachrom oxidiert wird [75, 76]. Dieser Reaktionsweg wird in alkalischem Milieu begünstigt, in saurem Milieu wird jedoch die Protonierung der Aminogruppe des Dopachinons gefördert und durch den dadurch verhinderten Ringschluss die Bildung von Leukodopachrom erschwert. Zudem wird bei niedrigem pH-Wert die Bildung von Dopachrom aus Leukodopachrom behindert, da die hierfür erforderliche Deprotonierung der Hydroxylgruppe erschwert wird [50, 77]. Unter diesen Bedingungen kommt es vermehrt zu der Bildung von 2,4,5-Trihydroxyphenylalanin (Topa) aus Dopachinon, welches auf einem Nebenweg über *p*-Topachinon zu Dopachrom umgesetzt wird [75-78].

Die der Dopachrombildung nachfolgenden Reaktionsschritte in der distalen Phase der Melanogenese verlaufen zum Teil nicht-enzymatisch, werden aber in den meisten Fällen auch durch die Beteiligung weiterer Enzyme reguliert.

Bei Säugetieren sind hierbei in erster Linie die 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylat-Oxidase und die Dopachrom-Tautomerase involviert, die häufig auch als *tyrosinase related protein* (TRP)-1 und TRP-2 bezeichnet werden [79-82]. Im Anschluss an die langsame Decarboxylierung des Dopachroms zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) kommt es zur Oxidation zu Indol-5,6-chinon, welche wiederum durch die Tyrosinase katalysiert wird. Die Dopachrom-Tautomerase (TRP-2) kann auf einer alternativen Stoffwechselroute Dopachrom zur Dihydroxyindol-2-carboxylsäure (DHICA) umwandeln, welche von TRP-1 zur Indol-5,6-chinon-carboxylsäure oxidiert wird. Indol-5,6-chinon und Indol-5,6-chinon-carboxylsäure polymerisieren anschließend spontan zu den hochmolekularen, braun bis schwarz gefärbten Eumelaninen.

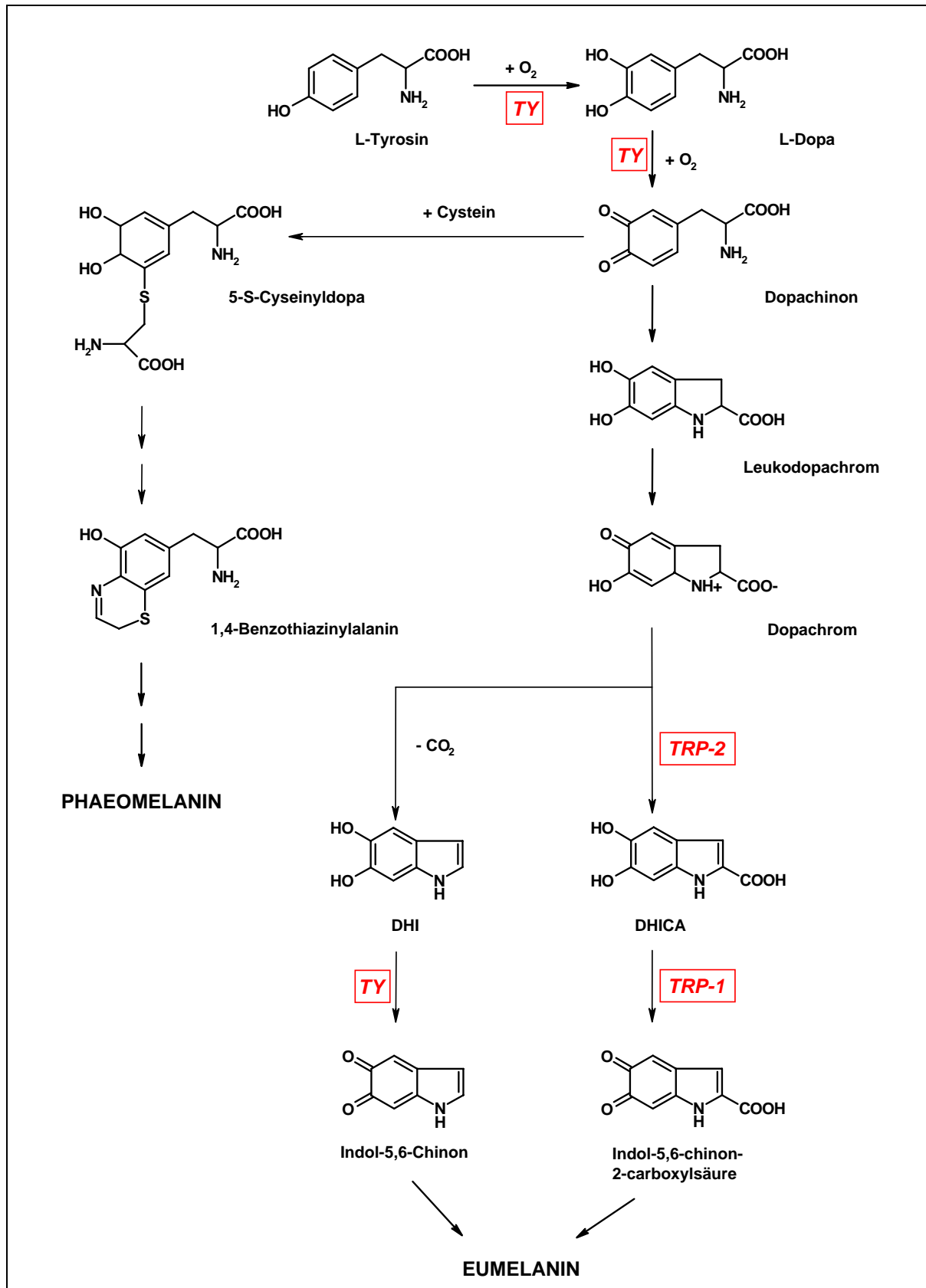


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Melaninbiosynthese (nach [50], [71] und [72], verändert). *DHI*: 5,6-Dihydroxyindol; *DHICA*: 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure; *Dopa*: 3,4-Dihydroxyphenylalanin; *Dopachinon*: 4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon; *Dopachrom*: 2-Carboxy-2,3-Dihydroxyindolen-5,6-Chinon; *Leukodopachrom*: 2,3-Dihydro-5,6-Dihydroxyindolen-2-Carboxylat; *TRP-1*: tyrosinase-related protein 1, DHICA-Oxidase; *TRP-2*: tyrosinase-related protein 2, Dopachrom-Tautomerase; *TY*: Tyrosinase. Erläuterungen im Text.

Bei Invertebraten, wie zum Beispiel Insekten ist neben der Tyrosinase auch eine Dopachrom-Isomerase an der Melaninbildung beteiligt, die die Bildung von DHI aus Dopachrom über ein Chinonmethid-Intermediat katalysiert [83, 84]. Zudem dienen bei Arthropoden bevorzugt Dopamin und dessen N-Acetyl-Derivate als Ausgangssubstanzen für die Melanogenese, so dass bei dieser Tiergruppe mindestens zwei weitere Enzyme für die Melaninbildung erforderlich sind: eine Dopa-Decarboxylase zur Bildung von Dopamin aus Dopa, sowie eine N-Acetyltransferase zur Derivatisierung des Dopamins. Die Oxidation des Dopamins führt wie im Falle von Dopa zu DHI, welches zu Melanin polymerisiert, DHICA wird jedoch im Rahmen der Melanogenese, zumindest bei Insekten nicht gebildet [11, 85].

Abhängig von den Ausgangsverbindungen der Melanogenese unterscheiden einige Autoren die Eumelanine von den ebenfalls meist schwarzen Allomelaninen. Während erstere sich nur von Tyrosin bzw. Dopa ableiten, werden letztere aus verschiedenen phenolischen Monomeren, wie beispielsweise Catechol gebildet [9].

Die nicht-enzymatische Addition von Cystein oder Glutathion an Dopachinon führt zur Bildung von 5-Cysteinyl-dopa, das durch die Tyrosinase zu Cysteinyl-dopachinon oxidiert wird. Cysteinyl-dopachinon wird nach Zyklisierung zu 1,4-Benzothiazinylalanin umgesetzt, welches nach weiteren Umformungsschritten zu den gelb bis rot-braunen Phaeomelaninen polymerisiert [86, 87]. Aufgrund der hohen Reaktivität der freien Sulfhydrylgruppen von Cystein und Glutathion findet die Bildung von Phaeomelanin in Anwesenheit dieser Verbindungen bevorzugt statt [88].

Eine Mischung der braun-schwarzen Eumelanine und der gelben und rötlich-braunen Phaeomelanine wird oftmals für die Diversität in der Pigmentierung von Haut und Haaren verantwortlich gemacht [50, 89], andere Autoren erklären die verschiedenen Abstufungen der Färbung als Folge der unterschiedlichen strukturellen Integrität nur eines Melanintyps [90].

1.5 Bakterielle Tyrosinasen

Funktionelle und strukturelle Untersuchungen an Enzymen erfordern stets beträchtliche Mengen des gereinigten Proteins. Von daher werden zu diesem Zweck häufig bakterielle Systeme verwendet, da die geringe Generationszeit und die verhältnismäßig einfache Handhabung große Ausbeuten ermöglichen. Im Falle der Tyrosinase aus Bakterien der Gattung *Streptomyces*, einem gram-positiven Bodenbakterium,

das der Gruppe der Actinomyceten zugeordnet wird, wird das Protein zudem häufig als Exoenzym in das Kulturmedium abgegeben. Durch Anwendung molekularbiologischer Techniken zur rekombinanten Überexpression kann die Tyrosinase aus einigen *Streptomyces*-Spezies sehr leicht in großen Mengen angereichert und anschließend gereinigt werden [37, 91].

Bislang wurden Tyrosinasen aus etwa 30 verschiedenen Bakterien-Spezies beschrieben, und die meisten davon biochemisch und molekularbiologisch soweit charakterisiert, dass neben physiologischen Parametern auch Sequenzdaten vorliegen [92].

Innerhalb der Gattung *Streptomyces* sind die Primärstrukturen der Tyrosinasen von 10 Spezies vollständig erfasst (siehe Anhang). Als Mikroflora natürlicher Bodenflächen erfüllen diese Bakterien wichtige ökologische Funktionen. Insbesondere im Abbau komplexer Biopolymere wie Lignin und bei der Bildung von Huminstoffen spielen sie offenbar eine wesentliche Rolle [93]. Etwa 40% aller untersuchten *Streptomyces* Spezies bilden auf tyrosinhaltigem Agar-Medium ein braun-schwarzes Exopigment: Melanin [93, 94]. Dieses wird durch eine in der Regel monomere, bisweilen extrazellulär vorliegende Tyrosinase aus verschiedenen mono- und diphenolischen Verbindungen gebildet. Über die Beteiligung weiterer Enzyme an nachfolgenden Reaktionsschritten der Polymerisation, wie beispielsweise der Isomerasen bei der Melanin-Synthese in eukaryontischen Organismen, ist hingegen nichts bekannt. Daher wird das gebildete Pigment in der Literatur meist als Melanin-ähnliches Pigment bezeichnet. Die Beteiligung einer Tyrosinase an der Melaninbildung von *Streptomyces* wurde in einer Studie mit 40 Melanin-positiven Spezies und zahlreichen Melanin-negativen Mutanten nachgewiesen [95].

Die ersten bakteriellen Tyrosinasen wurden aus Zellextrakten von *Streptomyces nigrifaciens* [96] und *Streptomyces glaucescens* [97] isoliert und charakterisiert. Bernan *et al.* [98] untersuchten die intra- und extrazelluläre Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*, wobei zur homologen Überexpression der intrazellulären Form ein Multi-copy-Plasmid mit dem *mel*-Gen aus *S. antibioticus* verwendet wurde. Die molekularen Massen und N-terminalen Aminosäuresequenzen der intra- und extrazellulären Formen waren identisch.

Die gereinigten Enzyme der erwähnten *Streptomyces* Spezies hatten in monomerer Form Molekulargewichte zwischen 29 und 30 kDa, später isolierte Tyrosinasen ande-

rer Spezies wiesen ganz ähnliche Werte auf [92]. Über die konservierten Bereiche der Kupfer-Bindungsstellen hinaus besitzen die Primärstrukturen der Tyrosinasen jedoch eine zum Teil beträchtliche Variabilität. So zeigen die Enzyme aus *S. antibioticus* und *S. castaneoglobisporus* eine Sequenzidentität von 82 %, die Sequenzen der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *S. glaucescens* gar eine Identität von 86 %. Die Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *S. coelicolor* besitzen hingegen nur eine Sequenzidentität von 48 %. Dies deutet darauf hin, dass in einigen Fällen nicht nur die kupferbindenden Regionen dieser Enzyme stark konserviert sind, sondern die Struktur des gesamten Proteins innerhalb einer Gruppe der Gattung *Streptomyces* weitestgehend erhalten wird. Die Isolation der extrazellulären Tyrosinase von *Streptomyces michiganensis* deutet aber auf das Vorhandensein von mindestens zwei Isoformen innerhalb dieser Spezies hin [99]. Für posttranslationale Modifikationen bakterieller Tyrosinasen, beispielsweise proteolytische Prozessierung oder Glykosylierungen wie bei Säugetier-Tyrosinasen, gibt es allerdings keine Hinweise.

Molekularbiologische Untersuchungen mit Melanin-negativen Mutanten zeigten, dass das chromosomal lokalisierte *mel*-Operon der Streptomyceten polycistronisch organisiert ist. Neben dem Strukturgen für die Tyrosinase (*melC2*) wird mindestens ein weiteres, stromaufwärts lokalisiertes Gen (*melC1*) für die Ausprägung des Melaninphänotyps benötigt [91, 98, 100]. Das *melC1* Gen codiert ein kleines chaperonartiges Hilfsprotein (Transaktivatorprotein), das für die Bindung von Kupfer-Ionen und deren Einbau in die Apotyrosinase verantwortlich ist [101, 102]. Die Proteine MelC1 und MelC2 bilden einen stabilen binären Komplex der nach chromatographischer Auftrennung intra- und extrazellulär nachgewiesen werden konnte. Die in Abb. 1.2 dargestellte Kristallstruktur der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* zeigt ebenfalls einen solchen Komplex aus der Tyrosinase (MelC2) und dem Hilfsprotein ORF378 (MelC1).

Obwohl *Streptomyces*-Tyrosinasen intra- und extrazellulär auftreten, enthalten die Primärsequenzen keine Signalpeptide. In den meisten Prokaryonten werden Proteine hauptsächlich über den universellen Sekretionsweg (GSP) durch die Cytoplasmamembran transportiert [103, 104]. Hierbei bindet das auszuschleusende Protein mit einer N-terminalen Signal-Sequenz an ein Signal-Erkennungs-Partikel (SecB oder SRP), wodurch es an den Sekretions-Apparat (SecYEG), einem Poren-Protein-Komplex geleitet wird. Durch die hierbei hervor gerufene Entfaltung der Peptidkette, ist beim Transport von Metallo-Proteinen ein Verlust des Cofaktors unumgänglich.

Eine alternative Route erlaubt den Transport gefalteter Proteine auch mit gebundenem Cofaktor über den *twin-arginine translocation* (Tat)-Weg [105, 106], der bei Streptomyceten allgemein eine wichtige Rolle bei der Protein-Sekretion einnimmt [107, 108]. Die MelC1 Proteine der Streptomyceten entsprechen in der Regel diesem Profil und werden über diesen Weg ausgeschleust [109, 110].

Die Melanin-Synthese in *Streptomyces* und anderen Mikroorganismen kann aber nicht nur durch Tyrosinasen erfolgen, sondern auch durch alternative Stoffwechselwege und Enzyme. Die Beteiligung einer Laccase an der Bildung Melanin-ähnlicher Pigmente in dem gram-negativen Bakterium *Sinorhizobium meliloti* [111] wurde ebenso beschrieben, wie die Isolation einer multipotenten Phenoloxidase mit Tyrosinase- und Laccase-Aktivität aus dem marinen Bakterium *Marinomonas mediterranea* [112].

1.6 Biologische Funktion und biotechnologische Anwendung von Tyrosinasen

Wie eingangs bereits erwähnt handelt es sich bei den Tyrosinasen um nahezu ubiquitär verbreitete Enzyme, deren physiologische Funktion in einigen Organismen allerdings noch nicht vollständig verstanden ist.

Bei Bakterien und Pilzen dient die Pigmentierung von Zellen und Sporen vermutlich in erster Linie als UV-Schutz [113, 114]. Zudem bindet Melanin zytotoxische Schwermetall-Ionen und übernimmt eine protektive Rolle gegenüber Hitze, freie Radikale, enzymatische Hydrolyse und Phagozytose [115, 116]. Des Weiteren scheint die Melanogenese bei einigen Bakterien und Pilzen an der mikrobiellen Pathogenese beteiligt zu sein, da sie häufig mit der Ausbildung von Virulenz assoziiert ist [117, 118]. Bei Pilzen ist die Tyrosinase auch an der Differenzierung reproduktiver Organe, sowie der Sporulation beteiligt und sorgt bei Verletzungen des Gewebes für einen schnellen Wundverschluss durch Melanin [72, 119].

In Pflanzen hat die Tyrosinase vermutlich überwiegend eine Schutzfunktion, indem sie im Zuge der Bräunungsreaktion in verletztem Gewebe durch die Bildung einer impermeablen Melaninschicht eine mechanische Barriere gegen Pathogene erzeugt [120]. Eine direkte Toxizität der generierten Chinone gegenüber den Pathogenen wird hierbei aber auch in Betracht gezogen [121]. Die Hinweise auf eine Beteiligung von Tyrosinasen an Mechanismen der Krankheitsresistenz in Pflanzen sind vielfältig,

jedoch nicht systematisch zu belegen [122]. So konnte eine Induktion der Tyrosinase nach Verwundung des Gewebes in einigen Pflanzen nachgewiesen werden, in manchen jedoch nicht [3]. Damit bleibt die genaue Funktion der Tyrosinase in Pflanzen bis heute unklar.

Auch bei vielen Invertebraten ist, neben der Pigmentierung, die Bildung einer Melaninschicht zum Wundverschluss bei Verletzungen eine wesentliche Funktion der Tyrosinase [123, 124]. Zudem können eindringende Pathogene durch Encystierung in einer Melaninhülle unschädlich gemacht werden, wobei die Bildung der cytotoxischen Chinone zusätzlich zu einer aktiven Abtötung der Keime führt [11]. Somit stellt die Tyrosinase bei Invertebraten einen Bestandteil der primären Immunantwort dar und wird häufig erst durch eine Kaskade von Serinproteasen aus inaktiven Proenzymen generiert, wobei unter anderem bakterielle Zellwandkomponenten effektive Aktivoren dieses Systems sind [125, 126]. Eine weitere wichtige Funktion der Tyrosinasen innerhalb der genannten Tiergruppe besteht in der Aushärtung neu gebildeter Exoskelettelemente. Diese Sklerotisierung beruht auf der Chinongerbung kutikulärer Proteine, die nach der oxidativen Quervernetzung eine stabile Matrix für Chitinfibrillen liefern [11, 127, 128].

Bei Säugetieren und damit auch beim Menschen ist die Aktivität der Tyrosinase in erster Linie für die Pigmentierung von Haut, Haaren und Augen verantwortlich und sorgt damit für Tarnung, Thermoregulation und den Schutz vor UV-Strahlung.

Eine der bekanntesten Pigmentstörungen, der Albinismus, ist auf unterschiedliche Gendefekte zurückzuführen, die alle in einem fehlerhaften Transport der Tyrosinase in spezifische Zellorganellen, die Melanosomen, resultieren [129, 130]. Andere Fehlpigmentierungen wie Melasma, Altersflecken und Sommersprossen werden hingegen durch eine abnorme Melaninsynthese hervorgerufen [72, 131].

Tyrosinasen haben innerhalb der letzten Jahre in der Lebensmittelindustrie, der kosmetischen Industrie, der Umwelttechnik, sowie der klinischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewonnen [72, 119]. Durch die gezielte Hemmung der Tyrosinase-Aktivität, beispielsweise durch Sulfit oder 4-hexyl-Resorcinol, wird die Haltbarkeit landwirtschaftlicher Erzeugnisse erhöht, zudem finden Tyrosinase-Inhibitoren, wie Kojisäure oder Aloesin Anwendung als Hautaufheller [72]. Die Fähigkeit zum enzymatischen Quervernetzen von Proteinen, wie Casein, α -Lactalbumin und β -

Lactoglobulin macht Tyrosinasen als effektive Alternativen zu Transglutaminasen zunehmend auch für die Lebensmittelproduktion interessant [132-134]. Immobilisierte Tyrosinasen dienen in der Sensortechnik zur Detektion phenolischer Verunreinigungen in Böden und Gewässern [135] und können zur Entgiftung belasteter Abwässer eingesetzt werden [136]. Außerdem werden diese Enzyme zur Synthese biochemischer Verbindungen, wie L-Dopa, welches zur Behandlung der Parkinson-Krankheit dient, verwendet [137]. Auch bei der Behandlung von Hautkrebs gewinnt die Tyrosinase mehr und mehr an Bedeutung. Als potentieller Angriffspunkt für die Immuntherapie von Melanomen wurde die Tyrosinase bereits in Betracht gezogen [138] und monoklonale anti-tyrosinase Antikörper aus Mäusen konnten als wirkungsvolle immunohistochemische Marker für melanogene und amelanogene Melanome eingesetzt werden [139, 140]. Bei Vitiligo, einer Autoimmunkrankheit, bei der die Melanocyten abgebaut werden, konnte die Tyrosinase als ein verantwortliches Autoantigen identifiziert werden. Zur Diagnose dieser Erkrankung dient der Nachweis von anti-Tyrosinase Antikörpern im Serum der betroffenen Patienten [141].

1.7 Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen

Der biotechnologischen Anwendbarkeit von Tyrosinasen zum enzymatischen Quervernetzen von Proteinen, sowie der Beteiligung von Tyrosinasen bei der Gerbung von Proteinen im Rahmen der Sklerotisierung des Exoskeletts bei Invertebraten, liegen die gleichen molekularen Mechanismen zugrunde.

Der einleitende Schritt dieser Reaktion ist die Oxidation phenolischer Verbindungen zu *o*-Dichinonen, die vermutlich durch eine Michael-Addition spontan Konjugate mit Amino-, Sulfhydryl- und Pyrrolidin-Seitenketten von Proteinen bilden [133]. Nach der Addition des Chinons an das erste Proteinmolekül wird die resultierende diphenolische Struktur reoxidiert und kann mit einem zweiten Proteinmolekül wechselwirken, wodurch die beiden Proteinmoleküle kovalent miteinander verknüpft werden (Abb. 1.5, oben). Prinzipiell stellen Tyrosin-Seitenketten der Proteinmoleküle ebenso phenolische Substrate für Tyrosinasen dar und ermöglichen eine direkte Protein-Protein-Quervernetzung (Abb. 1.5, unten). Dies setzt jedoch voraus, dass die Proteine Tyrosin in der Primärstruktur enthalten und diese Tyrosin-Seitenketten an der Proteinoberfläche lokalisiert und frei zugänglich sind [142, 143]. Mittels der Tyrosinase aus verschiedenen Pilzen konnten *in vitro* bereits einige Proteine, wie Lysozym [142],

Casein [132] und Ribonuklease [144] quervernetzt werden, wobei hierfür zum Teil die Zugabe von niedermolekularen, phenolischen Verbindungen, wie Chlorogensäure oder Kaffeesäure erforderlich war.

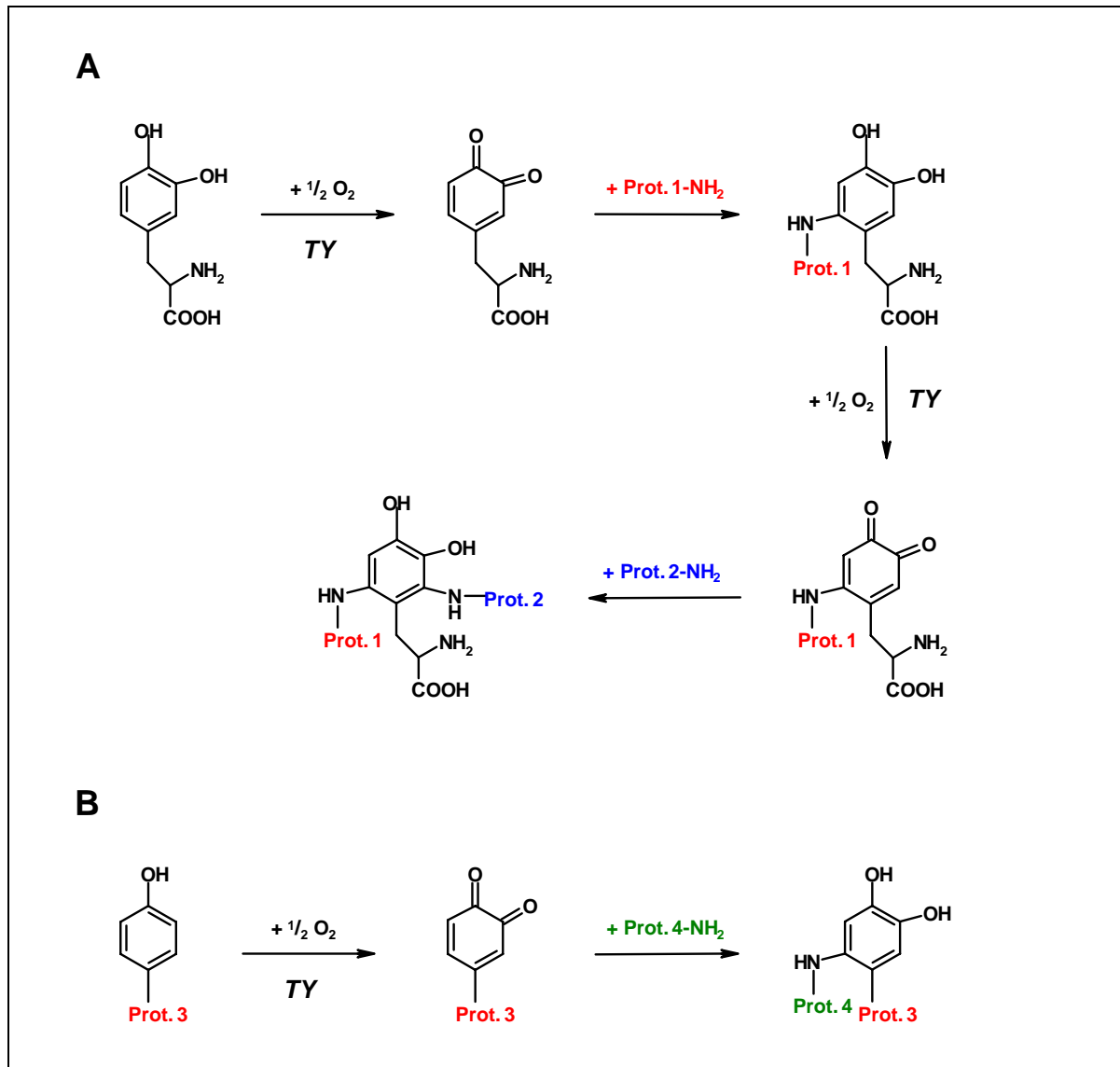


Abb. 1.5: Prinzip des enzymatischen Quervernetzens von Proteinen durch Tyrosinasen (TY), verändert nach [142, 143]. **A:** Durch o-Dichinone vermittelte Verknüpfung zweier Proteine (Prot.1 und Prot.2). Die Positionen der Proteine 1 und 2 sind austauschbar. **B:** Direkte Verknüpfung zweier Proteine (Prot.3 und Prot.4) über eine Tyrosin-Seitenkette eines der beiden Proteine.

Die bei der Lebensmittelproduktion bereits industriell eingesetzten Transglutaminasen finden Anwendung bei der Protein-Quervernetzung in Wurstwaren und „restrukturiertem“ Fleisch (Formfleisch), sowie in Fisch- und Milchprodukten. Durch die enzymatische Verknüpfung von Glutamin- und Lysin-Seitenketten wird hierbei ein dreidimensionales Proteingeflecht erzeugt, welches für Viskosität oder Festigkeit in diesen Produkten sorgt [145, 146]. Da Transglutaminasen aber durch die limitierte An-

zahl an Bindungsstellen oder durch eine sterische Behinderung einige Proteine nicht vernetzen können, muss insbesondere bei Molke-Proteinen für eine Quervernetzung bislang auf reduzierende und denaturierende Agentien, wie Dithiothreitol zurückgegriffen werden [147, 148].

Die verschiedenen Reaktionsmechanismen und unterschiedlichen Angriffspunkte der Tyrosinase beim Quervernetzen von Proteinen eröffnen einen potentiellen Nutzen dieser Enzyme für die Lebensmitteltechnologie, als möglicher Ersatz für die bisher verwendeten Transglutaminasen [132-134].

Bei einigen Polychaeten, Korallen und Muscheln erzeugen Tyrosinasen adhäsive Substanzen durch die kovalente Verknüpfung von Dopa-haltigen Strukturproteinen des so genannten Byssus-Organs [149]. Untersuchungen an Modellpeptiden dieser Chinoproteine ergaben, dass diese offensichtlich durch die radikalische Kopplung zweier Dopa-Reste zu Di-Dopa miteinander verbunden werden [150, 151]. Somit ergibt sich für Tyrosinasen allgemein mindestens eine weitere Möglichkeit, Proteinmoleküle kovalent zu vernetzen (Abb.1.6).

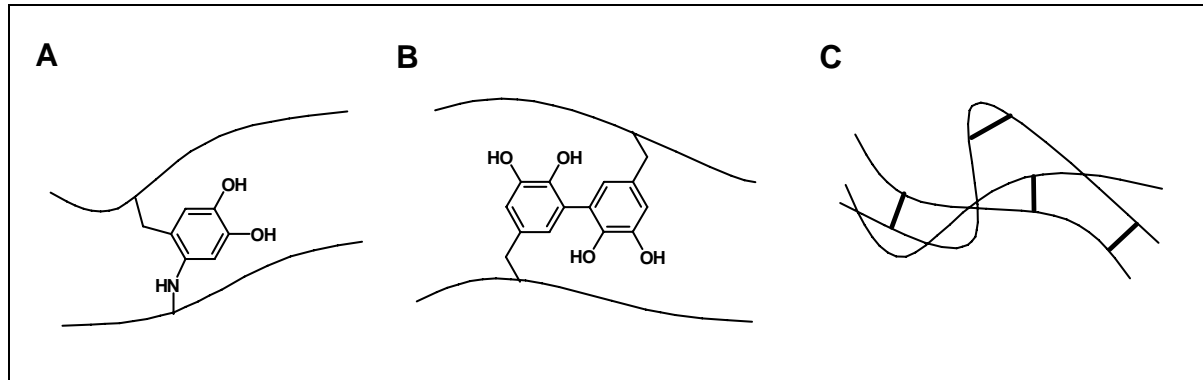


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der direkten Quervernetzungsprodukte der Tyrosinase, verändert nach [143]. **A:** Michael-Addukt (nukleophile Addition) einer Tyrosin-Seitenkette mit einer freien Aminogruppe. **B:** Phenol-Kopplung zweier Tyrosin-Seitenketten. Die gewundenen, schwarzen Linien symbolisieren die Peptidketten. **C:** Darstellung dreier enzymatisch vernetzter Peptidketten. Die schwarzen Balken symbolisieren die kovalenten Verknüpfungen aus **A** und **B**.

Zudem wird im Fall der Byssus-Proteine aus der Miesmuschel *Mytilus edulis* das entstehende Di-Dopa weiter zum Di-Dopachinon oxidiert, welches über eine Schiff-Basen Reaktion an benachbarte Lysine binden kann, wodurch die Verbindung zwischen den beiden Peptidketten verstärkt wird [150-152].

Hämocyanin aus Arthropoden, wie aus Mollusken kann zum Teil durch verschiedene physiologische und nicht-physiologische Faktoren zu einer Phenoloxidase konvertiert

werden [21, 22, 24, 153], obwohl in der Hämolymphe der meisten Arthropoden (mit Ausnahme der Cheliceraten) zusätzlich eine reine Phenoloxidase nachweisbar ist [126]. *In vitro* wird im Allgemeinen die Phenoloxidase-Aktivität des Hämocyanins durch die Zugabe von SDS induziert [25]. Hierbei wird als Ursache eine Konformationsänderung des inaktiven Proenzym, also in diesem Fall des O₂-Transportproteins angenommen [154, 155]. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung, sowie der dadurch ermöglichten Katalyse von Mono- und Diphenolen wird immer noch diskutiert [26, 43, 44, 156, 157].

Eine Beteiligung von aktiviertem Hämocyanin an der Quervernetzung von Proteinen im Rahmen der Wundheilung beim Pfeilschwanzkrebs *Tachypleus tridentatus* wurde bereits 2001 von Nagai, Osaki und Kawabata [153] postuliert, wenngleich die Aktivierung des Hämocyanins zur Phenoloxidase in diesem Fall durch eine stöchiometrische Komplexbildung mit einem Gerinnungsenzym ohne proteolytische Spaltung erfolgt [158].

1.8 Ziele der Arbeit

Trotz jahrzehntelanger Forschung und der daraus gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur und den Reaktionsmechanismus der Tyrosinase, ist es bis heute nicht gelungen, den komplizierten Mechanismus der *o*-Hydroxylierung von Monophenolen am aktiven Zentrum des Enzyms eindeutig aufzuklären. Diese Reaktion, welche die Tyrosinasen von den Catecholoxidasen abgrenzt, wird vermutlich in erster Linie durch die weniger stark eingeschränkte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums der Tyrosinase gegenüber dem der Catecholoxidase ermöglicht. Die Frage, ob hierbei die Substratbindung an das Cu_A-Atom oder an das Cu_B-Atom erfolgt, konnte jedoch bislang nicht beantwortet werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, diesen Sachverhalt anhand struktureller Vergleiche von Tyrosinasen und Catecholoxidasen aufzuklären. Hierzu sollte ein System etabliert werden, das es ermöglichte, die Tyrosinase aus einem beliebigen Organismus in großen Mengen und mit hoher Reinheit für Röntgenkristallographische Studien zu isolieren. Die im Laufe dieses Vorhabens von Matoba *et al.* [36] veröffentlichte Kristallstruktur der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus*

brachte jedoch wider Erwarten keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob das Substrat zur Hydroxylierung an Cu_A oder an Cu_B bindet.

Da offensichtlich erst die Analyse von Intermediaten der Reaktion endgültige Klarheit in diesem Punkt erbringt, wurde das Ziel, große Mengen an reiner Tyrosinase zu gewinnen, sowohl auf nativem, als auch auf rekombinantem Weg, dennoch verfolgt. Dadurch sollten weiterführende Studien unter Anwendung spektroskopischer Methoden, wie Elektronenspinresonanz-Spektroskopie oder RAMAN-Spektroskopie, sowie molekularbiologische Techniken, wie beispielsweise ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht werden. Die geschilderten Vorzüge und der umfassende Kenntnisstand bezüglich der Tyrosinasen aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* führten zur Auswahl der Spezies *S. antibioticus* als Quelle für das Enzym.

2. Material und Methode

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Analytische IEF

2117 Multiphor II, LKB, Bromma, Schweden

Autoklav

Laborautoklav LaM-3-20-ECZ-J, Adolf Wolf, Bad Überkingen-Hausen

Binokular

SZ-CTV, Olympus Deutschland, Hamburg

Blot-Apparaturen

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, München

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, München

Blockthermostat

TCR 100, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Brutschrank

B6120, Heraeus Instruments, Hanau

Digitalkamera

Digital Ixus v³, Canon, Tokyo, Japan

Durchlaufzentrifuge

Sepatech Contifuge 17RS, Heraeus Instruments, Hanau

Eismaschine

ZBE 30-10, Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen

Fermenter

Pilotfermenter, Bioengineering AG, Wald, Schweiz

Fluoreszenzphotometer

F-4500, Hitachi, Tokyo, Japan

FPLC

BioLogic HR Workstation, Bio-Rad, München

Auto-Injection Valve AV 7-3, Bio-Rad, München

Fraction Collector Model 2128, Bio-Rad, München

Software: BioLogic HR v2.1

FPLC-Säulen

HighPrep Sephacryl S-100 HR, Pharmacia Biotech, Erlangen

HighPrep Sephacryl S-300 HR, Pharmacia Biotech, Erlangen

Gasbrenner

Labogaz 206, Camping Gaz, Hattersheim

Gefriertrocknung

Lyovac GT2, Leybold-Heraeus, Köln

Geldokumentation

Scanner: GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, München

Software: Quantity One v4.5.2

Geltrocknungsanlage

Vakuum-Geltrockner, Von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen

Kaltlichtquelle

Highlight 3100, Olympus Deutschland, Hamburg

Kreisschüttler

OS10 basic, IKA Labortechnik, Staufen

Magnetrührer

RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen

Mikroskop

Axiostar Plus, Carl Zeiss AG, Göttingen

Mischer

Vortex Genie, Scientific Industries Manufacturer GmbH, Mühlheim / Ruhr

Photometer

U-3000, Hitachi, Tokyo, Japan

Cary 300, Varian, Darmstadt

Cary 1E, Varian, Darmstadt

pH-Meter

766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Minigel-Kammer, von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen

Präparative IEF

Rotofor, BioRad, München

Reinstwasseranlage

Milli-Q Plus PF, Millipore, Eschborn

Sauerstoff-Elektrode (Clark-Elektrode)

Hansatech Oxygraph DW1, Saur Laborbedarf, Reutlingen

Software: Oxyg32 v2.26

Schlauchpumpe

TVS, Meredos GmbH, Bovenden

Spannungsquellen

Power Pac-3000, BioRad, München

Modell 200/2.0, BioRad, München

Tischkryostat

Julabo 10, Labotech, Wiesbaden

Ultraschallbad

Transsonic 460/H, Elma - Hans Schmidtbauer GmbH, Singen

Ultraschallsonde

Sonifier 250, Branson Ultraschall GmbH, Kempten

Vakuumpumpen

Power Supply Model 3000xi, Biorad, München

MZ2C Membran-Pumpe, BrandTech Scientific, Essex, Connecticut, USA

Laboport Membran-Pumpe, KNF Neuberger, Freiburg

Vakuumentrifuge (SpeedVac)

Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg

Waagen

A200S, Sartorius GmbH, Göttingen

L200S, Sartorius GmbH, Göttingen

MJ 3000, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan

Wasserbad

Haake Phoenix C25P, Thermo Electron, Karlsruhe

Zentrifugen

Cryofuge 5000, Heraeus-Christ, Hanau

Universal 16R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Universal 32R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Z233 MK-2, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p. a. Qualität bezogen. Die Herstellung von wässrigen Lösungen erfolgte mit entionisiertem Reinstwasser.

Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 : 1) (Roth, Karlsruhe)
Agar-Agar (Roth, Karlsruhe)
Ammoniummolybdat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ammoniumsulfat (Roth, Karlsruhe)
APS (Merck, Darmstadt)
L-Arginin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Aspartat (Fluka, Neu-Ulm)
BCIP (Roth, Karlsruhe)
Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe)
BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Casaminosäuren (Roth, Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad, München)
Coomassie R 250 (Serva, Heidelberg)
L-Cystein (Merck, Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
DMF (Sigma-Aldrich, Steinheim)
DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Dopa (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dopamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
EDTA (Roth, Karlsruhe)
Eisenchlorid (Roth, Karlsruhe)
Eisensulfat (Roth, Karlsruhe)
Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
Ethanol (Roth, Karlsruhe)
Formaldehyd (Roth, Karlsruhe)
D(+)-Glucose (Roth, Karlsruhe)
Glycerin (Roth, Karlsruhe)
Glycin (Roth, Karlsruhe)

Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)
DL-Homocystein (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Isobutanol (Roth, Karlsruhe)
L-Isoleucin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaffeensäure (Serva, Heidelberg)
Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
Kaliumsulfat (Roth, Karlsruhe)
Kalziumcarbonat (Roth, Karlsruhe)
Kalziumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Kupferchlorid (Roth, Karlsruhe)
Kupfersulfat (Roth, Karlsruhe)
Magermilchpulver (Saliter, Obergrünzburg)
Magnesiumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Malzextrakt (Roth, Karlsruhe)
Manganchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
Mangansulfat (Fluka, Neu-Ulm)
MBTH (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)
Methanol (Roth, Karlsruhe)
L-Methionin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Mimosin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
Natriumborat (Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat (Roth, Karlsruhe)
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Natriumdithionit (Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe)
Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
Natriumglutamat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
NBT (Roth, Karlsruhe)

PEG 1000 (Merck, Darmstadt)
Phosphorsäure (Roth, Karlsruhe)
PIPES (Roth, Karlsruhe)
PMSF (Merck, Darmstadt)
Ponceau S (Roth, Karlsruhe)
L-Prolin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
D(+)-Saccharose (Roth, Karlsruhe)
Salzsäure (Roth, Karlsruhe)
Silbernitrat (Roth, Karlsruhe)
Sulfosalicylsäure (Merck, Darmstadt)
TEMED (Roth, Karlsruhe)
TES (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Thiostrepton (Calbiochem, Bad Soden)
Trichloressigsäure (Serva, Heidelberg)
Tris (Roth, Karlsruhe)
Tris-Maleat (Roth, Karlsruhe)
Tryptic Soy Broth (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tween 20 (Roth, Karlsruhe)
Tyramin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Tyrosin (Merck, Darmstadt)
L-Tyrosin-Methylester (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Uricase aus *Sus scrofa* (Worthington, Lakewood, New Jersey, USA)
Zinkchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
Zinksulfat (Roth, Karlsruhe)
Zitronensäure (Roth, Karlsruhe)

2.3 Mikrobiologische Arbeiten

2.3.1 Bakterien-Stämme

Streptomyces antibioticus (DSM 40234) und *Streptomyces lividans* (DSM 40979) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig bezogen. Die Stammhaltung der Kulturen erfolgte auf dem empfohlenen Medium (DSM-Medium 65). Zur Produktion der extrazellulären Tyrosinase wurden verschiedene synthetische Medien eingesetzt [159-161]. Alle Kulturmedien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.3.2 Medien

GYM *Streptomyces* Medium (DSM-Medium 65)

Glucose	4,0 g/l
Hefeextrakt	4,0 g/l
Malzextrakt	10,0 g/l

Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt. Für die Herstellung von Schrägagarröhrchen wurden 1,2 % (w/v) Agar-Agar und 0,2 % (w/v) CaCO₃ zugegeben.

Chemical Defined Medium (Katz & Betancourt 1988)

Na-Glutamat	8,0 g/l
L-Aspartat	2,0 g/l
L-Prolin	2,0 g/l
KCl	0,5 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l

Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt.

Zur Induktion der Tyrosinase-Expression wurden dem Medium Glucose (Endkonzentration: 10 mM), L-Methionin (Endkonzentration: 0,1 mM) und Kupfersulfat (Endkonzentration: 4 μ M) zugesetzt.

AGMIT-Medium (Suter 1978)

Glycerin	15,0 g/l
L-Arginin	5,0 g/l
Na-Glutamat	5,0 g/l
L-Methionin	0,3 g/l
L-Isoleucin	0,3 g/l
L-Tyrosin	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
CaCl ₂	0,01 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l
CuSO ₄	0,01 g/l
ZnSO ₄	0,01 g/l
MnSO ₄	0,04 g/l

AGMI-Medium (Claus 1983)

Glycerin	15,0 g/l
L-Arginin	5,0 g/l
Na-Glutamat	5,0 g/l
L-Methionin	0,3 g/l
L-Isoleucin	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
CaCl ₂	0,01 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l
CuSO ₄	0,01 g/l
ZnSO ₄	0,01 g/l
MnSO ₄	0,04 g/l

GM-Medium (Claus 1983)

Glycerin	15,0 g/l
Na-Glutamat	5,0 g/l
L-Methionin	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
CaCl ₂	0,01 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l
CuSO ₄	0,05 g/l
ZnSO ₄	0,01 g/l
MnSO ₄	0,04 g/l

Der pH-Wert wurde in allen drei Medien mittels 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

2.3.3 Kultivierung von *Streptomyces spec.*

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Sämtliche Medien und Glasgeräte wurden autoklaviert, Gefäße grundsätzlich nur kurz geöffnet und vor dem Wiederverschließen über einem Gasbrenner abgeflammt. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach den Arbeiten mit 70 % Ethanol desinfiziert.

2.3.3.1 Anlegen von Dauerkulturen

500 mg gefriergetrocknetes DSMZ-Kulturmaterial wurden in 1 ml Medium aufgewollt und homogenisiert. Mit je 50 - 100 µl dieser Zellsuspension wurden Schrägagarröhrchen mit GYM-Medium beimpft und mindestens 7 Tage bei 28 °C bis zur Ausbildung von Luftmycel und Sporen inkubiert. Die Kulturen konnten dann bei Raumtemperatur mehrere Wochen aufbewahrt werden.

2.3.3.2 Herstellung von Sporensuspensionen

Die bewachsenen Schrägagarröhrchen wurden mit je 1 ml sterilem Wasser abgespült. Die Suspension diente als Inokulum für die Hauptkulturen. 500 µl dieser Sporensuspension, vermischt mit 600 µl Glycerin konnten nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

2.3.3.3 Kultivierung von *S. antibioticus* im Labor-Maßstab und Aufarbeitung der Kulturüberstände

150 - 500 ml Medium in Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden mit 1 ml Sporensuspension beimpft und 3 - 7 Tage bei 22 - 25 °C und 150 Upm inkubiert. Zur Ermittlung von Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt in der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen.

Das Mycel aus den Kulturen wurde anschließend 15 min bei 5000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Kulturüberstand über einen Papierfilter (MN 615¹/₄, Machery-Nagel, Düren) filtriert und nach Zugabe von 1 % (v/v) Glycerin 1 - 2 Tage gefriergetrocknet. Hierzu wurde die Probe in einem 1 l - Rundkolben bei -80 °C für mehrere Stunden eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur einem Vakuum ausgesetzt.

Das glycerinhaltige Lyophilisat wurde mit 10 ml PIPES-Puffer aus den Rundkolben gespült und gegen 5 l Wasser, dem 50 µl einer 10 mM Kupfersulfat-Lösung (0,1 µM Endkonzentration) zugegeben wurden dialysiert, um Salze und einen Teil der braunschwarzen Pigmente zu entfernen.

Das Dialysat wurde ein weiteres Mal gefriergetrocknet und in Puffer resuspendiert. Alternativ wurden die Proben mittels Vakuum-Zentrifugation innerhalb von 1 - 3 h auf etwa die Hälfte eingengt.

2.3.3.4 Kultivierung von *S. antibioticus* im halb-technischen Maßstab und Aufarbeitung der Kulturüberstände

4 x 500 ml GYM-Medium wurden mit je 1 ml Sporensuspension von einer 8 Wochen alten Schrägagarkultur angeimpft und 3 Tage bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Anschließend wurden 50 l steriles GM-Medium im Fermenter (Abb. 2.1) mit den 2 l Vorkultur angeimpft und 3 Tage inkubiert.



Abb. 2.1: Pilotfermenter mit Rühraufsatz und Steuereinheit. Durch das Sichtfenster (vergrößerte Darstellung rechts) konnte der Zustand der Kultur überwacht werden.

Die Fermentationstemperatur betrug 30 °C, die Drehzahl des Rührwerks betrug 300 Upm. Nach 48 h wurden diese Werte auf 20 °C und 150 Upm reduziert. Die Be-gasung des Ansatzes erfolgte mit 100 % Luft. Auf eine Einstellung des pH-Werts wurde verzichtet. Zur Ermittlung von Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt in der Kultur wurden nach 0 h, 22 h, 30 h, 48 h und 69 h Proben entnommen. Am Ende der Fermentation wurden die Zellen mittels einer Durchlaufzentrifuge und einer Schlauchpumpe mit 6000 g und 300 ml/min abgetrennt.

Nach dem Abtrennen der Zellen wurde der Kulturüberstand auf 10 l - Kunststoffeimer verteilt und zu den jeweils etwa 8 l Kulturüberstand sukzessive je 3 kg Ammonium-sulfat unter Rühren zugegeben. Die dadurch eingeleitete Protein-Fällung erfolgte für 24 - 72 h unter ständigem Rühren bei 7 °C.

Das Ammoniumsulfat-Präzipitat wurde in der Durchlaufzentrifuge mit 19000 g bei 13 °C abgetrennt. Hierzu wurde das Volumen aus einem Eimer zunächst mit einer Flussrate von 150 ml/min durch die Zentrifuge geleitet, anschließend erneut mit 100 ml/min. Das resultierende Pellet (insgesamt ca. 600 ml) wurde dann 20 min mit 20000 g bei 4 °C abzentrifugiert, dekantiert und 24 - 72 h gegen Leitungswasser dia-lysiert. Das Dialysat (ca. 150 ml) konnte bei -20 °C mehrere Monate ohne Verlust an Tyrosinase-Aktivität gelagert werden.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1 Bakterienstamm

Als Wirtsorganismus für die heterologe Überexpression der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* diente *Streptomyces* sp. (R66; DSM 40979). Dieser Wildtyp-Stamm wurde 1965 von Krasilnikov [162] als *Actinomyces lividans* und 1970 von Pridham [163] als *Streptomyces lividans* beschrieben. Bereits 1983 wurde er von Katz *et al.* [91] zur Expression des Tyrosinase-Gens aus *Streptomyces antibioticus* eingesetzt.

2.4.2 Plasmid

Der Vektor pIJ702 (ATCC-39155) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) über LGC Promochem, Wesel bezogen.

Das Plasmid beinhaltet das Tyrosinase-Gen (*mel*) aus *Streptomyces antibioticus*, sowie das Thiostrepton-Resistenz-Gen (*tsr*) aus *Streptomyces azureus* [164]. Der Ursprungsvektor pIJ350, ein Derivat des high-copy-Plasmids pIJ102, liegt in 40 - 300 Kopien pro Genom vor und hat ein sehr breites Wirtsspektrum über die Spezies *Streptomyces* hinaus [165].

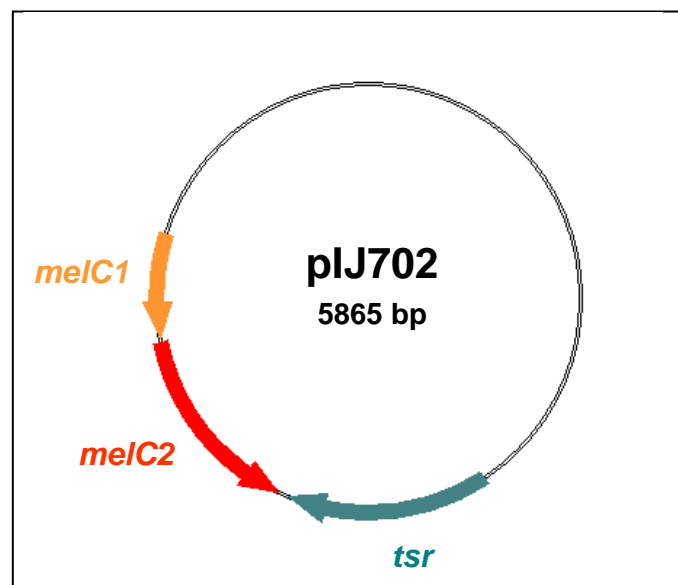


Abb. 2.2: Plasmid-Vektor pIJ702 mit dem *mel*-Gen aus *Streptomyces antibioticus*. Dieses beinhaltet neben den Struktur-Genen für die Apotyrosinase (*melC2*) und das assoziierte Hilfsprotein (*melC1*) ein Thiostrepton-Resistenz-Gen (*tsr*).

2.4.3 Medien

CRM-Medium

Saccharose	100,3 g/l
Tryptic Soy Broth	20,0 g/l
MgCl ₂	10,0 g/l
Hefeextrakt	7,5 g/l
Glycin	7,5 g/l

Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurden pro Liter Medium 10 ml einer 1 M CaCl₂-Lösung (Endkonzentration: 10 mM) steril zugegeben.

R2YE-Medium

Saccharose	100,3 g/l
K ₂ SO ₄	0,25 g/l
MgCl ₂	10,0 g/l
Glucose	10,0 g/l
Casaminosäuren	0,1 g/l
Spurenelementlösung	0,2 % (v/v)
Hefeextrakt	5 g/l
TES	5,73 g/l
Agar-Agar	25 g/l

Nach dem Autoklavieren wurden pro Liter Medium folgende Komponenten steril zugegeben:

K ₂ HPO ₄ [0,5 % (w/v)]	10,0 ml
CaCl ₂ (5 M)	4,0 ml
L-Prolin [20 % (w/v)]	15,0 ml
NaOH (1 N)	7,0 ml

HA-Medium

Glucose	4,0 g/l
Hefeextrakt	4,0 g/l
Malzextrakt	10,0 g/l

Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH auf 7,3 eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1,2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Nach dem Autoklavieren wurden pro Liter Medium folgende Komponenten steril zugegeben:

CaCl ₂ (1 M)	1,0 ml
Thiostrepton (50 mg/ml)	1,0 ml

Thiostrepton wurden in DMSO gelöst. Die Lösung ist autosteril und muss nicht filtriert werden.

2.4.4 Puffer und Lösungen**Spurenelementlösung**

ZnCl ₂	40 mg/l
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200 mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	10 mg/l
Na ₂ B ₄ O ₆ · 10 H ₂ O	10 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	10 mg/l

TES-Puffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
Saccharose	10 % (w/v)

Protoplastierungspuffer (P-Puffer)

Saccharoselösung [12 % (w/v)]	85,5 ml
Spurenelementlösung	0,2 ml
TES (0,25 M; pH 7,2)	10,0 ml
MgCl ₂ · 6 H ₂ O (1 M)	1,0 ml
K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,0 ml
KH ₂ PO ₄ (40 mM)	1,0 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (250 mM)	1,0 ml

Transformationspuffer (T-Puffer)

Saccharoselösung [12 % (w/v)]	1,0 ml
Spurenelementlösung	0,03 ml
PEG 1000 [50 % (w/v)]	5,0 ml
K ₂ SO ₄ (140 mM)	0,1 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (5 M)	1,0 ml
Tris-Maleat (0,5 M; pH 8,0)	1,0 ml
KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,1 ml
MgCl ₂ · 6 H ₂ O (1 M)	0,1 ml
Aqua deion.	2,0 ml

Sämtliche Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde auf Sterilität geachtet.

2.4.5 Protoplastierung

100 ml einer 36 - 48 h alten, in CRM-Medium gewachsenen Kultur wurde 10 min bei 2100 g und 4 °C zentrifugiert, zweimal mit je 20 ml TES-Puffer gewaschen und anschließend in 10 ml P-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym resuspendiert.

Der Protoplastierungsansatz wurde 60 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert (mikroskopische Überprüfung in 15-minütigen Abständen). Nach ausreichender Protoplastierung wurde der Ansatz auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 5 ml eiskalten P-Puffer gestoppt.

Zur Abtrennung von Mycel-Resten wurde der Ansatz durch sterile Miracloth-Membranen (Calbiochem, Bad Soden) filtriert, die Filtrationseinheit nochmals mit 2 ml P-Puffer durchspült und das Filtrat 10 min bei 700 g und 4 °C zentrifugiert. Die Protoplasten wurden vorsichtig in 0,5 - 3,0 ml P-Puffer resuspendiert und zu 100 µl-Aliquoten bei -70 °C eingefroren. Zur Verwendung wurden die Protoplasten schnell unter lauwarmem Wasser aufgetaut.

Zur Überprüfung des Anteils nicht-protoplastierter Zellen wurden 20 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl sterilem H₂O gemischt und der Ansatz auf eine R2YE-Platte ausplattiert. Eine R2YE-Platte, die mit 20 µl Protoplastensuspension in 200 µl P-Puffer beimpft wurde, diente als Vergleich, da in diesem Ansatz auch protoplastierte Zellen wachsen können.

2.4.6 Transformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *Streptomyces*-Protoplasten wurde durch die PEG-vermittelte Transformation nach Hopwood *et al.* [166] realisiert. Alle Schritte erfolgten, sofern möglich auf Eis. 100 µl Protoplastensuspension (etwa 10⁹ regenerationsfähige Zellen) wurden mit 100 µl P-Puffer verdünnt. Nach Zugabe von 5 - 10 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 10 µl wurde der Ansatz unmittelbar mit 500 µl T-Puffer versetzt und vorsichtig durchmischt. Der Transformationsansatz wurde nach 30 min Inkubation auf 3 - 4 R2YE-Platten ausplattiert und zur Regeneration 14 h bei 28 °C inkubiert. Zur Selektion wurden die Platten mit je 200 µl Thiostrepton-Lösung (5 mg/ml) überschichtet und 3 - 5 Tage inkubiert. Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und zur weiteren Selektion auf HA-Platten mit 50 µg/ml Thiostrepton ausgestrichen.

2.4.7 Kultivierung des Produktionsstamms

Selektionierte Transformanten wurden in 500 ml AGMIT-Medium kultiviert, dem neben 50 µg/ml Thiostrepton 10 mM Glucose zugesetzt wurde. Nach 48 - 72 h Inkubation bei 30 °C und 150 Upm wurden die Zellen 15 min bei 5000 g und 4 °C abzentrifugiert, in 10 ml 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 resuspendiert und mittels Ultraschall-Sonde aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend 15 min bei 20000 g zentrifugiert, der Überstand wurde für die weitere Aufarbeitung bei -32 °C gelagert.

2.5 Proteinbiochemische Arbeiten

2.5.1 Puffer und Lösungen

Puffer für die Enzym-Aufreinigung und biochemische Charakterisierung

100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0)

50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,2)

25 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5)

25 mM PIPES-Puffer (pH 7,0)

<i>Eurypelma</i> -Puffer (pH 7,8):	100 mM	Tris
	5 mM	CaCl ₂
	5 mM	MgCl ₂

Ringer-Lösung (pH 7,8):	0,9 % (w/v)	NaCl
	0,02 % (w/v)	KCl
	10 mM	CaCl ₂
	10 mM	MgCl ₂
	0,01 % (w/v)	NaHCO ₃

Für die FPLC wurden die Puffer durch 0,2 µm Filter (Supor-200 Membran, Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) sterilfiltriert und mittels Unterdruck entgast.

Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH 8,8)

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris (pH 6,8)

Denaturierungspuffer:	25 % (v/v) Sammelgelpuffer 20 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 5 % (v/v) H ₂ O 4 % (w/v) SDS + Spatelspitze Bromphenolblau
Probenpuffer (native PAGE):	50 % (v/v) Glycerin + Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE):	0,2 M Tris 0,15 M Glycin 0,08 % (w/v) SDS
Laufpuffer (native PAGE):	0,1 M Tris 0,75 M Glycin

Lösungen für die Coomassie-Färbung

Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,5 % (w/v) Coomassie R 250
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

Lösungen für die Silber-Färbung

50 % Methanol-Lösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
5 % Methanol-Lösung:	5 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure

Enhancer-Lösung:	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,075 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	6 % (w/v) Natriumcarbonat 0,004 % (w/v) Natriumthiosulfat 0,05 % (v/v) Formaldehyd
Stopp-Lösung:	2 M Zitronensäure

Puffer und Lösungen für Western Blots

Tris-Glycin-Puffer (pH 8,3):	192 mM Glycin 25 mM Tris 10% (v/v) Methanol
Transferpuffer:	39 mM Glycin 48 mM Tris 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung:	3 % (w/v) Trichloressigsäure 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure 0,2 % (w/v) Ponceau S
TBS (pH 7,4):	100 mM Tris 1,4 M NaCl
TBST:	10 % (v/v) TBS 0,3 % (v/v) Tween 20
Blocklösung:	10 % (w/v) Magermilchpulver in TBST

Entwicklungspuffer (pH 9,5):	100 mM Tris 1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
BCIP-Lösung:	50 mg/ml BCIP in DMF
NBT-Lösung:	50 mg/ml NBT in 70 % (v/v) DMF
Entwicklungslösung:	1 ml Entwicklungspuffer 9 ml H ₂ O 33 µl BCIP-Lösung 66 µl NBT-Lösung

2.5.2 Aufreinigung der extrazellulären Tyrosinase aus dem Kulturüberstand

2.5.2.1 Kationen-Austausch-Säulen

Vor der Aufreinigung mit Kationen-Austausch-Säulen (Vivapur Maxi S (H); VS-IX20SH08, Vivascience, Hannover) wurde die Probe mit Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt, bei 12000 g abzentrifugiert und durch einen 0,2 µm Membranfilter (Acrodisc Syringe Filter, Pall Gelmann Laboratory, Dreieich) sterilfiltriert.

Um das Austauscher-Material zu equilibrieren wurden 5 ml 25 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,5 auf die Säule gegeben und 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 2 x 10 ml Probe beladen und 2 x 5 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Säule wurde dann 3 x mit 10 ml 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0 für 5 min bei 500 g und 4 °C gewaschen und die Probe mit 5 ml 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0 mit 1M NaCl für 5 min bei 500 g und 4 °C eluiert. Das Eluat wurde mittels Vakuum-Zentrifugation für 2 - 3 h bei 45 °C um den Faktor 4 - 5 eingengt.

Zur Beurteilung der Beladungskapazität der Säulen wurden Durchfluß und Waschwasser aufbewahrt und Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt gemessen.

2.5.2.2 Kationen-Austausch (batch-Verfahren)

10 g Austauscher-Material (Servacell P23 oder CM32, Serva, Heidelberg) wurden in 500 ml 25 mM Na-Acetatpuffer pH 5,5 suspendiert und über Nacht bei 4 °C equilibriert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit 50 ml Probe durchmischt. Der pH-Wert der Probe wurde zuvor mit Essigsäure auf 7,0 eingestellt. Nach 1 h bei 4 °C wurde das Sediment 10 min bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert und bis zur völligen Entfärbung 4- bis 5mal mit Aqua deion. gewaschen. Die Probe wurde anschließend 1 - 3 h bei 4 °C mit 5 bis 10 ml 25 mM PIPES-Puffer mit 1 M NaCl bei pH 7,0 eluiert. Das Sediment wurde dann 15 min bei 1000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mittels Vakuum-Zentrifugation konzentriert.

2.5.2.3 Anionen-Austausch (batch-Verfahren)

10 g Austauscher-Material (Servacell DEAE52, Serva, Heidelberg) wurden in 500 ml 25 mM Na-Acetatpuffer pH 5,5 suspendiert und über Nacht bei 4 °C equilibriert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit 10 ml Probe durchmischt. Der pH-Wert der Probe wurde zuvor mit Essigsäure auf 7,0 eingestellt. Das Sediment wurde sofort für 15 min bei 2500 g und 4 °C abzentrifugiert und verworfen, der nun farblose Überstand wurde für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

2.5.2.4 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die Aufreinigung der Tyrosinase erfolgte mittels Größenausschluss-Chromatographie an einer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur. Die von den Säulen eluierenden Proteine wurden in einem Durchflussphotometer mit einer optischen Weglänge von 5 mm bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

Für diesen Reinigungsschritt wurde eine Sephacryl S-100 Säule 16/60 verwendet, die sich für die Trennung von Proteinen in der Größenordnung von 1 - 100 kDa eignet. 2 - 4 ml Probe wurden in 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0 mit 150 mM NaCl bei einer Flussrate von 0,4 ml/min aufgetrennt. Die Fraktionen wurden zu je 1,5 ml in einem Sammler aufgefangen, Fraktionen mit Tyrosinase wurden vereinigt und nach Zugabe von 2 % (w/v) Glycerin mittels Gefriertrocknung zunächst lyophilisiert, in 1 - 2 ml Wasser resuspendiert und dialysiert.

2.5.3 Isolation von Hämocyanin aus der Hämolymphe von *Eurypelma californicum*

Vogelspinnen der Spezies *Eurypelma californicum* wurden von der Firma „North Carolina Biological Supply“ (Charlotte, North Carolina, USA) bezogen und im Institut gehalten. Die Tiere lebten einzeln bei 23 - 25 °C und 50 - 55 % Luftfeuchtigkeit. Der Wechsel von Licht und Dunkel erfolgte in einem 12 Stunden Rhythmus.

Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde das dorsal gelegene Perikard mit einer Kanüle punktiert. Die austretende Hämolymphe wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und sofort im Verhältnis 1:2 mit eiskaltem *Eurypelma*-Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Hämolymphe für 20 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung verwendet.

Die Reinigung des 24-meren Hämocyanins wurde durch Größenausschluss-Chromatographie mit einer Sephacryl S-300 16/60 HR Säule durchgeführt. Pro Lauf wurden 20 - 50 mg Protein aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 0,6 ml/min mit *Eurypelma*-Puffer. Die Reinheit der hämocyaninhaltigen Fraktionen wurde absorptionsspektroskopisch überprüft.

2.5.4 Extraktion von Proteinen aus der Kutikula von *Eurypelma californicum*

2 Exuvien (3 - 4 Tage alt) ohne Beine wurden zerteilt, in 1,5 l Ringerlösung mit 10 mM CaCl₂ und 10 mM MgCl₂ gewaschen, über einem Faltenfilter abgespült und mit Papiertüchern getrocknet. Anschließend wurden die Fragmente mit flüssigem Stickstoff fein zermörsert und in ein 15 ml - Falcon überführt. 1 ml des Exuvien-Pulvers wurde mit 1,5 ml Ringerlösung mit 0,2 mM PMSF versetzt und für 2 - 24 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Feststoffe wurden anschließend abzentrifugiert. Ein zweiter Ansatz wurde parallel mit 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,2 durchgeführt. Die Extrakte wurden mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

2.5.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Standard-Protokollen nach Bradford (Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250) und Lowry (modifizierte

Biuret-Reaktion) durchgeführt. In beiden Testsystemen wird die Absorption eines Farbstoffkomplexes nach Ablauf einer bestimmten Inkubationszeit ermittelt.

2.5.5.1 Bradford-Test

Beim Bradford-Test [167, 168] erfolgt die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Die anionische Form des Farbstoffs bildet stabile Komplexe mit kationischen und hydrophoben Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschiebt [169]. Die Absorption bei 595 nm ist laut Hersteller beim Standard-Test im Bereich von 0,2 - 0,9 mg/ml proportional zur Proteinkonzentration und dient als Messgröße. Beim leicht modifizierten Micro-Test liegt der Proportionalitätsbereich bei 1,2 - 25,0 µg/ml Protein. Die Variabilität der Färbung zwischen verschiedenen Proteinen ist relativ gering, allerdings läuft die Reaktion in saurem Milieu ab, in dem viele Proteine ausfallen. Einige Detergenzien, wie SDS oder Triton X-100 stören den Test, Reduktions- und Denaturierungsmittel beeinflussen das Ergebnis hingegen auch in hohen Konzentrationen nicht.

Ablauf der Proteinbestimmung nach Bradford:

- Je 100 µl Standard und Probe in Reagenzgläsern vorlegen
- 5 ml verdünntes Reagenz (Coomassie Brilliant Blue G-250) zugeben
- mischen und mindestens 10 min inkubieren
- Absorption bei 595 nm bestimmen

Als Referenz diente Rinderserum-Albumin in definierten Konzentrationen, zur Ermittlung des Blindwertes wurde Reinstwasser verwendet. Anhand der hiermit erstellten Kallibriergeraden können die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben ermittelt werden.

2.5.5.2 Lowry-Test

Beim Lowry-Test [170] bilden Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung Komplexe (Biuret-Reaktion), wobei die Cu^{2+} -Ionen vermutlich zu Cu^+ -Ionen reduziert werden.

Diese bilden mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen instabilen blauen Komplex, dessen Absorption bei 750 nm gemessen wird [171]. Der Bereich der Proportionalität zwischen Absorptionssignal und Proteinkonzentration liegt hier laut Herstellerangabe zwischen 2 und 2000 µg/ml. Die Intensität der Färbung verschiedener Proteine gleicher Konzentration variiert allerdings in diesem Testsystem deutlich stärker als beispielsweise beim Bradford-Test. Auch ist dieser Test deutlich anfälliger gegenüber störenden Substanzen, wie Detergenzien und verschiedene Pufferbestandteile.

Ablauf der Proteinbestimmung nach Lowry:

- Je 200 µl Standard und Probe in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorlegen
- 1 ml Lowry-Reagenz (Pierce, Rockford, Illinois, USA) zugeben
- mischen und exakt 10 min inkubieren
- 100 µl verdünntes FC-Reagenz (Pierce, Rockford, Illinois, USA) zugeben
- mischen und 30 min im Dunkeln inkubieren
- Absorption bei 750 nm bestimmen

Für Proteinstandards wurde Rinderserum-Albumin verwendet, für den Blindwert wurde Wasser eingesetzt.

2.5.5.3 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in Proben mit der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* kann nach vollständiger Reinigung des Enzyms die Messung der Absorption bei 280 nm herangezogen werden. Der von Jackman, Hajnal und Lerch [172] ermittelte molare Extinktionskoeffizient von $82,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die Tyrosinase aus *Streptomyces glaucescens* dient hierbei zur Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

2.5.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes lassen sich Proteine in Polyacrylamid-Gelen gemäß ihrer Nettoladung und ihres Molekulargewichts auftrennen. Die Zugabe des anionischen Detergenz SDS führt zur Bildung negativ geladener SDS-Protein-

Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine zudem und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich somit nur in ihrer Größe und werden in der porösen Gelmatrix durch den Molekularsiebeffekt gemäß ihres Stokes-Radius und damit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Bei der Elektrophorese nativer Proteine bestimmt in erster Linie die Nettoladung die Laufweite und vor allem die Laufrichtung im elektrischen Feld.

2.5.6.1 SDS-PAGE

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach See und Jackowski [173], einer modifizierten Form des diskontinuierlichen Puffersystems von Laemmli [174]. Die Größe der Gele betrug etwa 10 x 12 x 0,4 cm. Vor der Elektrophorese wurden die Proben 10 - 15 min bei 95 °C in SDS-haltigem Denaturierungspuffer inkubiert. Für eine vollständige Denaturierung der Proteine enthielt der Puffer 10 % β -Mercaptoethanol zur reduktiven Spaltung von Disulfid-Brücken. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer Spannung von 80 V (Sammelgel) bzw. 110 V (Trenngel) in einer Minigel-Kammer durchgeführt.

Als Molekulargewichtsmarker dienten High Molecular Weight Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit 6 Standard-Proteinen zwischen 30 und 200 kDa, Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, München) mit synthetischen Proteinen von 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa oder Rotimark (Roth, Karlsruhe) mit synthetischen Proteinen von 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 und 150 kDa.

Trenngel-Zusammensetzung für jeweils 4 Minigele:

	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
Acrylamid / Bisacrylamid	4,66 ml	7,0 ml	9,34 ml	11,7 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	7,0 ml	7,0 ml	7,0 ml	7,0 ml
H ₂ O	15,4 ml	13,0 ml	10,7 ml	8,36 ml
10 % (w/v) SDS	560 μ l	560 μ l	560 μ l	560 μ l
TEMED	28 μ l	28 μ l	28 μ l	28 μ l
2 % (w/v) APS	420 μ l	420 μ l	420 μ l	420 μ l

Sammelgel-Zusammensetzung für jeweils 4 Minigele (3 %):

Acrylamid / Bisacrylamid	2,0 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	5,0 ml
H ₂ O	12,3 ml
10 % (w/v) SDS	400 µl
TEMED	40 µl
2 % (w/v) APS	300 µl

2.5.6.2 Native PAGE

Bei der nativen PAGE wird auf eine Hitze-Denaturierung der Proteine, sowie auf reduzierende Agenzien und SDS verzichtet. Vielmehr erfolgt eine Auftrennung der nativen Proteine und Protein-Komplexe gemäß ihrer Nettoladung und ihrer Größe. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und einer Spannung von 80 V (Sammelgel) bzw. 110 V (Trenngel) durchgeführt.

Trenngel-Zusammensetzung für jeweils 4 Minigele:

	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %
Acrylamid / Bisacrylamid	4,66 ml	7,0 ml	9,34 ml	11,7 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	7,0 ml	7,0 ml	7,0 ml	7,0 ml
H ₂ O	15,9 ml	13,6 ml	11,2 ml	8,92 ml
TEMED	28 µl	28 µl	28 µl	28 µl
2 % (w/v) APS	420 µl	420 µl	420 µl	420 µl

Sammelgel-Zusammensetzung für jeweils 4 Minigele (3 %):

Acrylamid / Bisacrylamid	2,0 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	5,0 ml
H ₂ O	12,4 ml
TEMED	40 µl
2 % (w/v) APS	300 µl

2.5.6.3 Coomassie-Färbung

Die Färbung der Gele erfolgt direkt im Anschluss an die Elektrophorese nach der Methode von See und Jabowski [173] mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten von Proteinen, die Nachweisgrenze liegt bei 200 - 400 ng Protein pro Bande.

2.5.6.4 Silberfärbung

Zur Visualisierung von Banden in Gelen von Proben mit geringer Proteinkonzentration wurde eine Silberfärbung nach Blum, Beier und Gross [175] durchgeführt. Dabei bilden Ag^+ -Ionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten. Reduktion führt zur Bildung von elementarem Silber, das sich an die Proteine anlagert. Da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden, eignet sich diese Methode nicht zur Quantifizierung der Proteinbanden, zumal sich die unspezifische Wechselwirkung von Silber nicht auf Proteine beschränkt, sondern auch Nucleinsäuren und Kohlenhydrate angefärbt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng Protein pro Bande. Die Färbung erfolgte nach dem unten stehenden Schema.

mindestens 1 h	50 % Methanol-Lösung
20 min	5 % Methanol-Lösung
20 min	H_2O
1 min	Enhancer-Lösung
3 x 20 s	H_2O
20 min	Färbelösung
3 x 20 s	H_2O
bis Banden sichtbar werden	Entwicklerlösung
dann	Stopp-Lösung

2.5.7 Western Blot

Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Membranen erfolgte unter Verwendung zweier unterschiedlicher Protokolle. Für die spätere N-terminale Sequenzierung wurden Tyrosinasen mittels Tank-Blot auf PVDF-Membranen (Immobi-

Ion-P, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) transferiert [176], der immunologische Nachweis von Hämocyaninen erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (Protean BA830, 0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) mittels „Semi-Dry“-Blotten nach der Methode von Khyse-Anderson [177].

2.5.7.1 Elektrotransfer auf PVDF-Membranen

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 5 min in Tris-Glycin Puffer inkubiert, die PVDF-Membran wurde einige Sekunden lang mit 100 % Methanol befeuchtet und in Tris-Glycin Puffer eingelegt. Zwischen zwei puffergetränkte Schwämme wurden daraufhin Filterpapier, Gel, Membran und wieder Filterpapier luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Das Sandwich wurde dann in der mit 1 l Tris-Glycin-Puffer befüllten Blot-Apparatur fixiert und der Transfer durch Anlegen einer Spannung von 40 V (300 mA) für 2,5 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Membran wurde mit entionisiertem Wasser gewaschen, einige Sekunden mit 100 % Methanol gesättigt und mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt. Nach Inkubation in Entfärbelösung wurde die Membran erneut gewaschen und Proteinbanden für die Sequenzierung mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.5.7.2 N-terminale Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden durch das Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK), Köln durchgeführt. Die Proben wurden hierbei für 10 bzw. 20 Zyklen einem Edman-Abbau unterzogen und die abgespaltenen Aminosäurederivate mittels HPLC identifiziert.

2.5.7.3 Elektrotransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden sowohl das SDS-Gel, als auch die Nitrocellulose-Membran für 30 min in Transferpuffer inkubiert. In der Blot-Apparatur wurden daraufhin folgende Komponenten luftblasenfrei übereinander gelagert: 10 Lagen Filterpapier (Blotting Papers BG002, Schleicher und Schuell, Dassel), Nitrocellulose-Membran, Gel, 10 Lagen Filterpapier.

Membran und Filterpapier waren auf die Größe des Gels zugeschnitten, das Filterpapier war mit Transferpuffer getränkt. Nach dem Anlegen einer konstanten Spannung von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ wurden die Proteine 2 h transferiert. Zum Nachweis der transferierten Proteine auf der Membran, wurde diese 1 min in Ponceau S-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen in TBST-Lösung wieder entfärbt.

2.5.7.4 Immunochemische Detektion

Nach Absättigen von Proteinbindungsstellen durch Inkubation in Blocklösung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 - 2 h, wurde die Nitrocellulosemembran mindestens 2 h mit Primär-Antikörper (Kaninchen-Serum, Charles River Laboratories, Sulzbach) inkubiert. Der polyklonale Primär-Antikörper war gegen das zu färbende Protein gerichtet und wurde zur Inkubation im Verhältnis 1:1000 in Blocklösung gegeben. Nach viermal 10 min Waschen in TBST-Lösung wurde die Membran 2 h mit Sekundär-Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Sigma-Aldrich, Steinheim) inkubiert. Dieser zweite Antikörper wurde für die Inkubation im Verhältnis 1:10000 in Blocklösung gegeben und war gegen den Primär-Antikörper gerichtet. Zusätzlich war der Sekundär-Antikörper mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, die die Farbreaktion des Substrats BCIP mit NBT ermöglichte. Das Zielprotein konnte auf diese Weise indirekt über die Bindung des spezifischen Primär-Antikörpers und des Sekundär-Antikörpers an den Primär-Antikörper nachgewiesen werden. Nach erneutem viermaligem Waschen in TBST-Lösung wurde die Membran in Entwicklungslösung inkubiert, bis die angefärbten Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.5.8 Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinproben mittels Massenspektrometrie erfolgte am Institut für Immunologie der Universität Mainz. Das hierfür verwendete Massenspektrometer Q-ToF Premier mit μPLC der Firma Waters (Milford, Massachusetts, USA) besaß eine Online-Koppelung von HPLC und ESI-MSMS und war mit einer Kapillar-HPLC und einer NanoLock-Spray Quelle ausgestattet. Die Proteine wurden vor der Analyse mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Trypsin-Verdau fragmentiert.

2.5.9 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Technik zur Fraktionierung amphoterer Moleküle, wie z. B. Proteine und Peptide, auf der Basis ihrer Nettoladung [178, 179]. Die IEF lässt sich als Elektrophorese in einem pH-Gradienten beschreiben, in dem zwitterionische Makromoleküle nur bis zu einem bestimmten pH-Wert, ihrem isoelektrischen Punkt wandern. Am isoelektrischen Punkt (pI) liegt das native Protein mit gleicher Anzahl positiver und negativer Ladungen vor. Die Nettoladung beträgt Null und in einem elektrischen Feld ist folglich keine Wanderung möglich. Entfernt sich das Protein infolge Diffusion von seinem pI, erhält es unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wieder eine Ladung und kehrt zum pI zurück, es fokussiert. Mit der IEF können Proteine aufgetrennt werden, die sich in ihren isoelektrischen Punkten um weniger als 0,02 pH-Einheiten unterscheiden [180].

Der pH-Gradient wird mittels kommerziell erhältlichen synthetischen Trägerampholyten mit eng aufeinander folgenden isoelektrischen Punkten hergestellt. Bei den Ampholyten handelt es sich um kleine (300 - 600 Da), geladene, amphotere Moleküle mit hoher Leitfähigkeit und hoher Pufferkapazität.

2.5.9.1 Analytische IEF

Die analytische IEF zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte von Tyrosinasen wurde mit gebrauchsfertigen Polyacrylamid-Gelen (Servalyt PreNets, Serva, Heidelberg) von 0,3 mm Dicke in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Das Gel wurde auf die mittels Tischkryostat auf 5 °C vorgekühlte Platte der Kammer luftblasenfrei aufgelegt und die beiden gleichmäßig mit Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit befeuchteten Elektrodendochte (Serva, Heidelberg) quer zur Längsachse auf das Gel gelegt. Der Applikatorstreifen wurde parallel zu den Elektrodendochten in der Mitte des Gels platziert. Die Proben wurden anschließend in die Taschen des Applikatorstreifens pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 °C für 3000 Voltstunden mit einer Anfangsspannung von 200 V und einem Spannungs-Limit von 2000 V.

Anodenpuffer: Anodenlösung 3 (Serva, Heidelberg)

Kathodenpuffer: Kathodenlösung 10 (Serva, Heidelberg)

Zusammensetzung des IEF-Markers (Serva Liquid Mix 3-10, Serva, Heidelberg):

Marker-Protein	Isoelektrischer Punkt (pI)
Cytochrom C	10,7
Ribonuclease A	9,5
Lectin	8,3 / 8,0 / 7,8
Myoglobin	7,4 / 6,9
Carboanhydrase	6,0
β -Lactoglobulin	5,3 / 5,2
Trypsin-Inhibitor	4,5
Glucoseoxidase	4,2
Amyloglucosidase	3,5

2.5.9.2 Präparative IEF

Da der in den Proben mittels analytischer IEF ermittelte isoelektrische Punkt der *Streptomyces antibioticus*-Tyrosinase um pH 9,5 liegt und die im Medium enthaltenen Pigmente eher zur Anode tendieren und bei pH 3 - 5 fokussierten, wurde die präparative IEF mittels Rotofor nach Twitty und Bier [181] als Reinigungsmethode zur Isolation der Tyrosinase-Fraktion aus dem Kulturüberstand getestet.

Im Unterschied zu anderen IEF-Techniken erfolgt die IEF in der Rotofor in freier Lösung. Die Fokussierungskammer besteht aus einem horizontal angeordneten Zylinder mit 35 - 60 ml Fassungsvermögen. Dieser rotiert einmal in der Minute um seine Achse, einem Keramikfühler. Durch 19, in einem Abstand von 0,5 cm parallel angeordnete Polyestermembranen wird im Inneren der Kammer die Konvektion minimiert und der pH-Gradient somit stabilisiert.

Der elektrische Kontakt zwischen Fokussierungskammer und Stromversorgung erfolgt über zwei Elektrodenkammern, die sich jeweils links und rechts der Fokussierungszelle befinden und außer der Elektrolytlösung je eine Ionenaustauschermembran enthalten. Die Ionenaustauschermembranen verhindern das Eindringen der Probe in die Elektrolytlösung.

Die Proteine wandern unter dem Einfluss des elektrischen Feldes in dem von Ampholyten gebildeten pH-Gradienten bis zu ihren isoelektrischen Punkten, konzentrieren sich dort als parallele Ringe und werden über ein Schlauchsystem mit einer Vakuumpumpe innerhalb weniger Sekunden in 20 Glasröhrchen gesaugt.

Die IEF wurde bei 5 °C und einer konstanten Leistung von 15 W durchgeführt. Hierbei wurden am Ende der IEF 2000 V und 90 mA erreicht. Die Dauer der IEF betrug ohne Vorfokussierung 4 - 6 h.

Anodenpuffer: 30 ml 100 mM H₃PO₄

Kathodenpuffer: 30 ml 100 mM NaOH

Trennkammer: 50 ml Probe

3 ml Ampholyte (Bio-Lyte pH 3 - 10, 40 %)

Nach dem Ernten wurde in jeder Fraktion deren pH-Wert sowie die Proteinkonzentration und Tyrosinase-Aktivität bestimmt.

2.5.10 Spektroskopie

2.5.10.1 Absorptions-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden an Zweistrahl-Absorptionsspektralphotometern aufgenommen. Für die Messungen wurden Quarz-Küvetten mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet. Stark absorbierende Proben wurden gegebenenfalls verdünnt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.5.10.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz-Spektren wurden an einem Fluoreszenz-Spektralphotometer aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde im rechten Winkel zum einfallenden Anregungslicht gemessen. Die Messungen erfolgten in Quarz-Küvetten, die über einen thermostatisierten Küvettenhalter konstant auf 25 °C temperiert wurden. Der Innere-Filter-Effekt wurde berücksichtigt.

2.5.11 Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität

Die Messungen der Tyrosinase-Aktivität erfolgten sowohl photometrisch als auch polarographisch mit Hilfe einer Clark-Elektrode.

In beiden Fällen wurde eine 15 mM Substrat-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 zur Ermittlung von Monophenolase- und Diphenolase-Aktivität verwendet. Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Zur Aktivierung der Monophenolase-Reaktion war in der Regel die Zugabe einer katalytischen Menge Diphenol notwendig.

2.5.11.1 Dopachrom-Assay

Bei dieser auf Mason [74] zurückgehenden Methode wird die Bildung des rötlichen Dopachrom aus Tyrosin und L-Dopa spektroskopisch bei 475 nm (molarer Absorptionskoeffizient $\epsilon_{475} = 3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen. Die Reaktion verläuft nur innerhalb der ersten 2 - 3 min linear, da das Dopachrom autoreaktiv über diverse Zwischenschritte zu Melanin polymerisiert und somit zur Absorption nicht mehr im gleichen Umfang beiträgt.

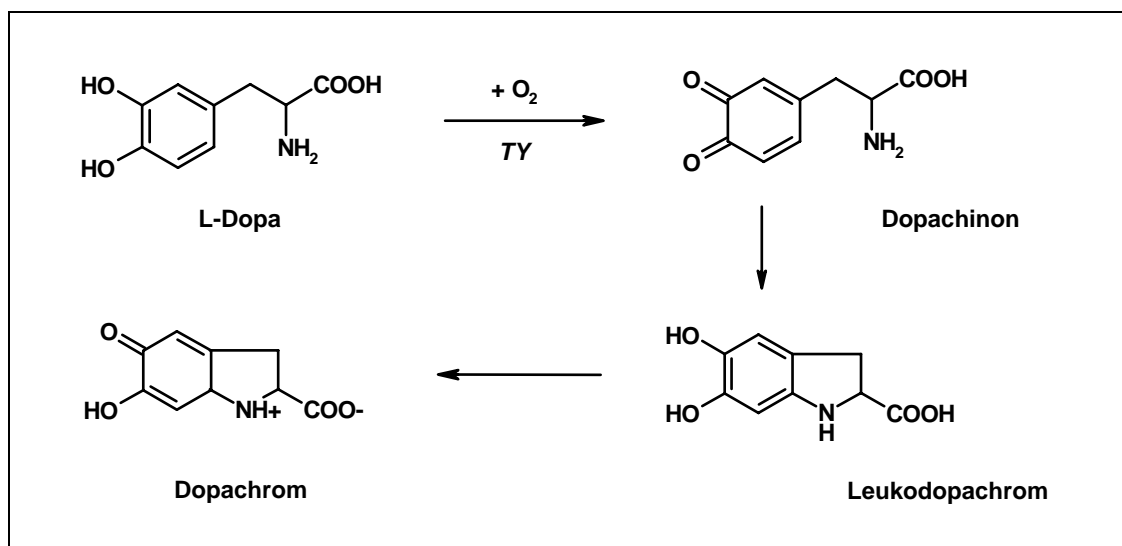


Abb. 2.3: Reaktionsschema des Dopachrom-Assays: L-Dopa wird durch die Tyrosinase (TY) zu Dopachinon oxidiert, welches spontan zu Leukodopachrom zyklisiert und anschließend nicht-enzymatisch zum rot-braun gefärbten Dopachrom oxidiert wird.

Die meisten mono- und diphenolische Substrate, die ebenfalls diesem Reaktionsschema folgen, sowie die Zwischenstufen Dopachinon und Leukodopachrom bzw. deren Derivate absorbieren im gesamten visuellen Spektrum kein Licht, weshalb die

Bildung des Dopachroms anhand der Absorptionzunahme bei 475 nm eindeutig verfolgt werden kann. Die autoreaktiven Folgereaktionen verlaufen gerade in der Anfangsphase der Reaktion sehr langsam, weshalb auch von diesen Reaktionsprodukten während der Messung keine störenden Einflüsse ausgehen. Außerdem wird auf die Zugabe weiterer Agenzien, die die Enzymaktivität beeinflussen könnten, verzichtet.

Da bei diesem Test aber die Oxidation von L-Dopa nicht direkt gemessen wird, muß die Voraussetzung erfüllt sein, dass Dopachinon vollständig in Dopachrom umgewandelt wird. Dies ist allerdings nicht ganz korrekt, da sowohl Dopachinon, als auch Leukodopachrom direkt in entstehende Melanin-Polymere eingebaut werden können [182]. Zudem ist die Sensitivität des Tests aufgrund des relativ niedrigen Absorptionskoeffizienten verhältnismäßig gering. Die Ermittlung des Substratumsatzes pro Zeiteinheit ist mit dem bekannten Absorptionskoeffizienten nur für Tyrosin oder Dopa zulässig, da selbst strukturell sehr ähnliche Verbindungen, wie die decarboxylierten Derivate Tyramin und Dopamin oder Tyrosin-Methylester veränderte Dopachrome generieren, die zumindest geringfügig unterschiedliche Absorptionseigenschaften besitzen. Ein direkter Vergleich der Enzymaktivitäten beim Umsatz verschiedener Substrate ist somit nur eingeschränkt möglich.

2.5.11.2 MBTH-Assay

Zum Nachweis von Tyrosinase in Proben mit geringer Enzymkonzentration wurde eine Farbstoffreaktion mit MBTH durchgeführt. Dieser von Pifferi und Baldassari [182] entwickelte und von Winder und Harris [183], Rodriguez-Lopez *et al.* [184] sowie Jaenicke [185] modifizierte Test beruht auf der Wechselwirkung zwischen Besthorns Hydrazon (MBTH) und *o*-Chinonen, die während der Tyrosinase-Reaktion aus L-Dopa oder anderen *o*-Diphenolen gebildet werden. Diese reagieren mit dem Reagenz stöchiometrisch unter Bildung eines stabilen, rötlichen Farbstoffkomplexes, dessen Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm liegt. Beim Umsatz von Tyrosin bzw. Dopa beträgt der molare Absorptionskoeffizient für das Dopachinon-MBTH-Addukt $29000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 505 nm, der Test ist somit etwa 8-mal sensitiver als das Dopachrom-Assay. Da das gebildete MBTH-Addukt nicht weiter reagiert ist das Messsignal deutlich länger konstant, als beim Dopachrom-Assay.

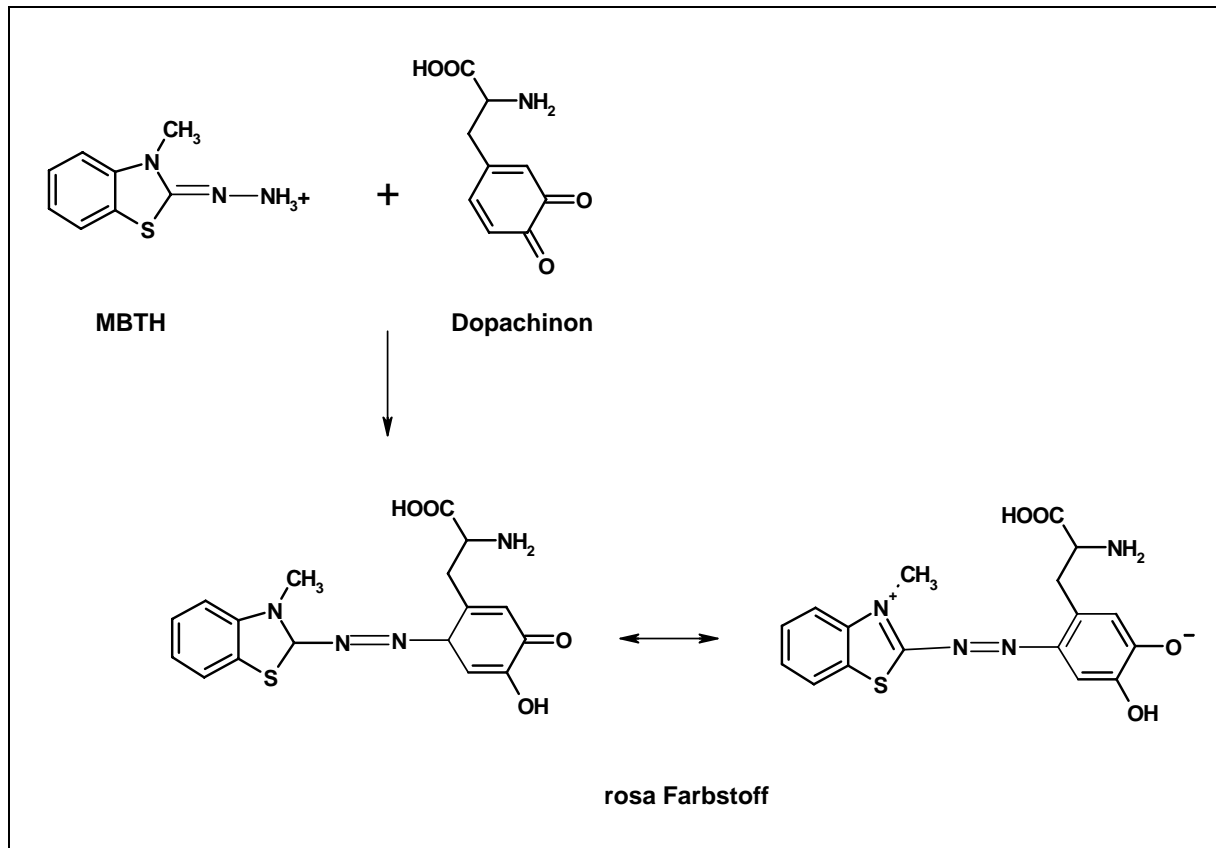


Abb. 2.4: Reaktionsschema des MBTH-Assays: Dopachinon reagiert mit Besthorns Hydrazon zu einem rosa Farbstoff.

2.5.11.3 O₂-Verbrauchsmessung

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs während der Tyrosinase-Reaktion stellt eine Möglichkeit dar, den Substratumsatz direkt zu messen [186, 187]. Sowohl bei der Monophenolase-, als auch bei der Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase wird molekularer Sauerstoff reduziert, wobei die Stöchiometrie unabhängig vom eingesetzten Substrat ist. Somit eignet sich diese Methode hervorragend zum Vergleich der Umsatzgeschwindigkeit unterschiedlicher Substrate durch die Tyrosinase. Problematisch gestaltet sich jedoch die quantitative Ermittlung von Umsatzgeschwindigkeiten, da nachfolgende Reaktionsschritte, die weitgehend autokatalytisch ablaufen, zum Teil ebenfalls molekularen Sauerstoff verbrauchen. Zudem ist die Methode deutlich weniger sensitiv, als photometrische Tests.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs während der Tyrosinase-Reaktion erfolgte mit Hilfe einer Clark-Elektrode, die am Boden eines gasdichten Reaktionsgefäßes montiert wurde. Das Volumen des Reaktionsgefäßes war variabel und konnte durch einen beweglichen Kolben auf Werte zwischen 500 µl und 3 ml eingestellt werden.

Durch einen Wassermantel konnte das System konstant temperiert werden. Der Aufbau der Apparatur ist in Abb. 2.5a schematisch dargestellt. Abb. 2.5b zeigt die Messzelle mit der Clark-Elektrode im Detail.

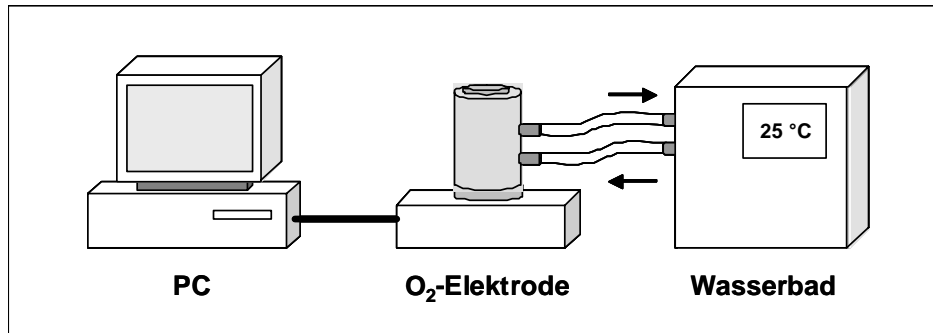


Abb. 2.5a: Schematische Darstellung der Messapparatur. Die O₂-Elektrode ist auf einer Kontrolleinheit mit integriertem Magnetrührer platziert. Über der Elektrode befindet sich das Wassermantel-Reaktionsgefäß. Die Wasserzirkulation wurde durch ein Wasserbad mit Pumpensystem gewährleistet. Die Kontrolleinheit konnte direkt über einen PC angesteuert werden.

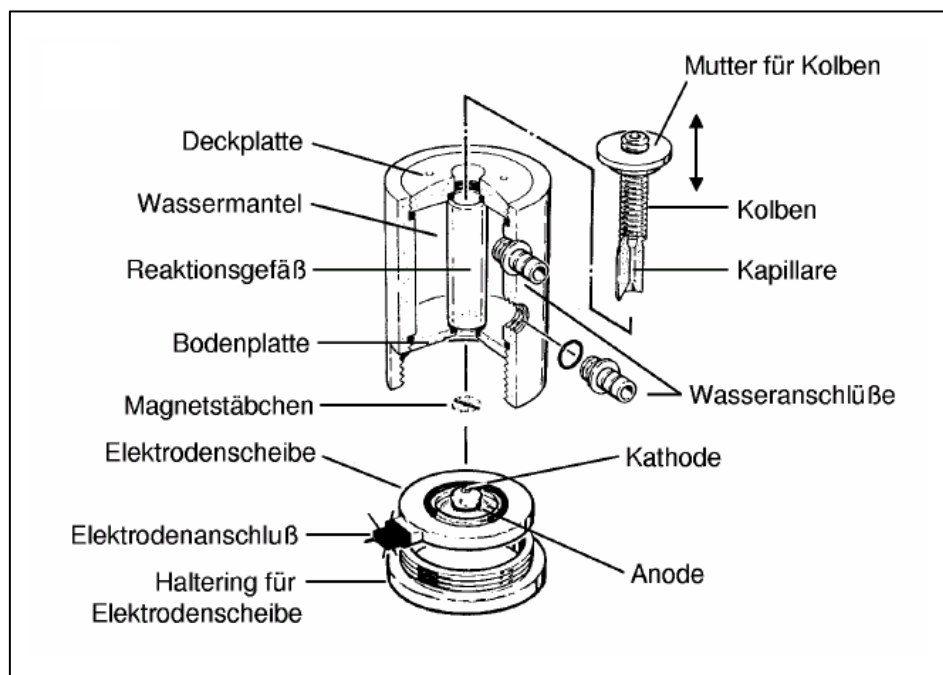


Abb. 2.5b: Aufbau der Messzelle mit Clark-Elektrode und Reaktionsgefäß. Die Abbildung ist der Produktbeschreibung des Herstellers entnommen.

Die Sauerstoffelektrode war mit einer 12 µm dicken PTFE-Membran (Saur Laborbedarf, Reutlingen) bespannt, eine 0,1 M KCl-Lösung diente als Elektrolyt. Die Elektrode wurde vor jeder Messung kalibriert. Als Referenz diente zum einen Luftgesättigtes Wasser, und zum anderen Wasser, dem durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdititionit der Sauerstoff vollständig entzogen worden war. Die dabei gemessenen Stromstärken wurden durch die mitgelieferte Software nach Eingabe von Tempera-

tur- und Luftdruckwerten in O₂-Konzentrationen umgerechnet. Für die Messungen von Tyrosinase-Aktivität wurde das Reaktionsgefäß mit Puffer und Substratlösung befüllt und 2 min inkubiert, um eine gleichmäßige und konstante Temperierung zu gewährleisten. Anschließend wurde das Enzym zugegeben, das Reaktionsgefäß verschlossen und die Abnahme der Stromstärke gemessen. Diese wurde in die entsprechende Abnahme der O₂-Konzentration umgerechnet und graphisch gegen die Zeit dargestellt.

2.5.12 Enzymkinetiken

Dopachrom-Assay und MBTH-Assay erfolgten in Halbmikro-Einwegküvetten (Plastibrand 1,5 ml PMAA Küvetten, Roth, Karlsruhe) in einem Photometer, die Sauerstoff-Verbrauchsmessungen erfolgten mittels Clark-Elektrode. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Messungen bei 25 °C in einem Reaktionsvolumen von 1,0 ml durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze wird bei der Beschreibung der entsprechenden Versuche dargestellt.

2.6 Homologie-Modelling

Für die Generierung eines 3D-Modells der *Streptomyces antibioticus* Tyrosinase wurde das Programm *Modeller6v2* eingesetzt. Das Programm verwendet experimentell ermittelte Strukturdaten von Proteinen, um die Struktur von anderen Proteinen mit ähnlicher Aminosäuren-Sequenz vorherzusagen [188]. Da geringfügige Änderungen in der Sequenz in der Regel nur eine geringe Änderung der Struktur hervorrufen [189], können mit dieser Methode Modelle mit einem effektiven Gesamtfehler von unter 2 Å für das Peptid-Rückgrad erzeugt werden [190]. Die Genauigkeit der Vorhersage hängt dabei aber sehr stark von der Ähnlichkeit der zu vergleichenden Moleküle ab.

Das Alignment der bekannten Proteinstruktur mit der zu modellierenden Sequenz wurde mit den Programmen *ClustalX* und *Genedoc* erstellt. Die räumlichen Randbedingungen, die zum Modellieren verwendet wurden, basierten auf einer statistischen Analyse der Beziehung verschiedener struktureller Merkmale von bekannten Proteinstrukturen nach Sali und Blundell [190].

Als zu modellierende Sequenz wurde die der *Streptomyces antibioticus*-Tyrosinase (NCBI-Zugangsnummer P07524, früher B23971) eingesetzt. Als Template diente die Kristallstruktur der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas* (NCBI-Zugangsnummer 1BT1).

3 Ergebnisse

Für das intensive Studium der Funktion und Struktur von Enzymen sind meist große Mengen des zu untersuchenden Proteinmoleküls in hoch reiner Form unerlässlich. Zu diesem Zweck kann das Protein einerseits durch die Aufarbeitung entsprechend großer Mengen biologischen Materials in nativer Form gewonnen werden, andererseits kann es mit Hilfe geeigneter Expressionssysteme rekombinant hergestellt werden. Für die *Streptomyces antibioticus*-Tyrosinase existieren effiziente Systeme, sowohl zur homologen Überexpression [191], als auch zur heterologen Überexpression in *Streptomyces lividans* [91], einer verwandten Spezies innerhalb der gleichen Bakteriengruppe. Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit bestand, *Streptomyces* in einem großen Volumen zu kultivieren, wurde in erster Linie die Gewinnung des nativen Enzyms ohne die Anwendung molekularbiologischer Techniken angestrebt. Dies wurde insbesondere dadurch erleichtert, dass die Tyrosinase von *S. antibioticus* als Exoenzym vorliegt und nach Induktion mit L-Methionin in großem Umfang in das Kulturmedium abgegeben wird. Die Transformation von *S. lividans* mit dem Tyrosinase-Gen aus *S. antibioticus* wurde zwar auch durchgeführt, für die Gewinnung der Tyrosinase und deren anschließende Charakterisierung wurde jedoch auf die Präparation des nativen Enzyms zurückgegriffen.

Neben der Anreicherung, Aufreinigung und physiko-chemischen Charakterisierung der Tyrosinase aus *S. antibioticus* (3.1 und 3.2), sowie der rechnergestützten Homologie-Modellierung ihrer dreidimensionalen Struktur (3.3), erfolgte eine umfangreiche kinetische Charakterisierung des Enzyms (3.4). Des Weiteren wurde die Fähigkeit zum enzymatischen Quervernetzen von Proteinen durch die Tyrosinase untersucht, wobei dieser Aspekt auch das Hämocyanin und dessen Aktivierbarkeit zur Phenoloxidase beinhaltet (3.5).

3.1 Reinigung der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*

Zur Gewinnung möglichst großer Mengen an Tyrosinase wurde *S. antibioticus* in einem synthetischen Flüssig-Medium kultiviert. Für die Festlegung eines geeigneten Mediums, das eine möglichst hohe Ausbeute an aktiver Tyrosinase ermöglichte und in dem zugleich die Bildung störender Pigmente möglichst gering gehalten werden konnte, wurden verschiedene Rezepturen im kleineren Maßstab getestet.

Die Kultivierung von *S. antibioticus* zur Produktion der Tyrosinase erfolgte dann im halb-technischen Maßstab. Das Ziel dieser umfangreichen Untersuchungen bestand darin, ein verlässliches und leicht reproduzierbares Protokoll zur Isolierung des Proteins in nativer Form zu etablieren.

3.1.1 Kultivierung von *S. antibioticus* im Labor-Maßstab

Die Bildung von Melanin durch *S. antibioticus* zeigte sich bei Wachstum auf Tyrosin-haltigem Agar nach 2 bis 4 Tagen (Abb. 3.1). Das Pigment bildete einen abgegrenzten schwarzen Hof um die Kolonien, der nach weiteren 3 bis 5 Tagen Inkubation die gesamte Platte bedeckte. Die für die Pigmentierung verantwortliche Tyrosinase wird hierbei als Exoenzym aus den Zellen ausgeschleust. Agar-Medien, denen keine Tyrosinase-Substrate zugesetzt wurden, wiesen auch nach mehr als 7 Tagen Inkubation keine Melaninbildung auf.

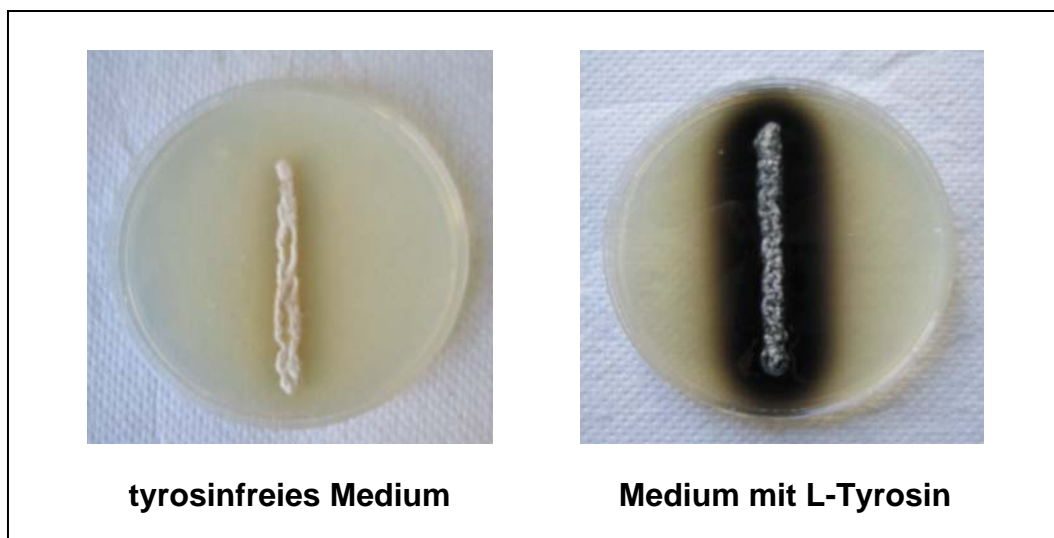


Abb. 3.1: Nachweis der Melanin-Biosynthese bei *S. antibioticus* durch Wachstum auf tyrosinhaltigem Medium. Die Ausbildung eines Pigmenthofes um den Impfstrich ist nach viertägiger Inkubation deutlich zu sehen (rechts). Auf dem Medium ohne Tyrosin (links) ist nach der gleichen Inkubationszeit keinerlei Braun- oder Schwarzfärbung erkennbar.

3.1.1.1 Einfluss des Kulturmediums auf die Expression der Tyrosinase

Für die Isolation und Reinigung der Tyrosinase aus *S. antibioticus* wurden verschiedene synthetische Flüssig-Medien getestet (siehe Kapitel 2.3.2). Neben dem von Katz & Betancourt [159] verwendeten CDM mit Glutamat, Aspartat und Prolin wurde hierzu ein Glutamat-Medium mit Arginin, Isoleucin und Tyrosin in unterschiedlichen

Modifikationen eingesetzt [160, 161]. Sämtliche Medien enthielten L-Methionin zur Induktion der Tyrosinase-Expression, CDM wurde zu diesem Zweck mit 4 μM Kupfersulfat und 10 mM Glucose komplettiert. Die Präparation der Tyrosinase erfolgte nach Abtrennen der Zellen aus dem Kulturüberstand mittels Ionen-Austausch.

Da die Ausbeuten bzgl. Enzym-Aktivität und Proteinmenge bei der Kultivierung in CDM auch in Gegenwart der erforderlichen Expressionsinduktoren sehr niedrig ausfielen, wurde auf den Einsatz dieses Mediums bereits nach wenigen Kultivierungsansätzen verzichtet. Die Bestimmung der Diphenolase-Aktivität im Kulturüberstand erfolgte polarographisch und ergab Aktivitäten von etwa 0,01 U/ml mit 15 mM L-Dopa als Substrat in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bei 25 °C. Eine nennenswerte Pigmentsynthese konnte nicht beobachtet werden. Die Abschätzung des Proteingehalts erfolgte durch SDS-PAGE, wobei auf eine sensitive Silberfärbung zurückgegriffen werden musste (Abb. 3.3).

In den Kulturansätzen mit AGMIT-Medium konnte schon nach 3 Tagen eine sehr ausgeprägte Pigmentbildung festgestellt werden (Abb. 3.2). Da die Melaninbildung auch bei erniedrigter Inkubationstemperatur (zunächst 30 °C, später 25 °C) sehr schnell voranschritt, konnte bereits nach 48 - 72 h nur noch eine geringe Tyrosinase-Aktivität festgestellt werden. Diese Inaktivierung war vermutlich zum Teil auf den „Selbstmord“-Mechanismus der Tyrosinase während der Oxidation der zunehmend gebildeten *o*-Diphenole zurück zu führen [192], bei dem durch die vermehrte Bindung dieser Substrate an das Enzym ein irreversibler, inaktivierender Nebenweg der Reaktion eröffnet wird, wodurch das inaktive Enzym akkumuliert. Zum anderen kam es vermutlich auch bereits zu einer Einlagerung der Proteine aus dem Medium in das polymerisierende Melanin (Chinongerbung), die durch die Fähigkeit der Tyrosinase zur Quervernetzung von Proteinen sogar noch beschleunigt worden sein könnte.

Die im Kulturüberstand des AGMIT-Mediums mittels O_2 -Verbrauchsmessungen bestimmte Diphenolase-Aktivität fiel mit ca. 0,01 U/ml ähnlich gering aus, wie die Aktivität in den Kulturansätzen mit CDM. Lediglich der mittels SDS-PAGE abgeschätzte Proteingehalt war gegenüber den CDM-Kulturen deutlich größer (Abb. 3.3). Im Bereich unterhalb von ca. 45 kDa tritt hier zudem eine Bande zum Vorschein, die als ein Indiz auf das Vorhandensein einer monomeren Tyrosinase gewertet werden kann.

Eine quantitative Abschätzung der Proteinmenge war anhand der Resultate der SDS-PAGE allerdings nicht möglich. Photometrische Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration kamen an dieser Stelle nicht zum Einsatz.

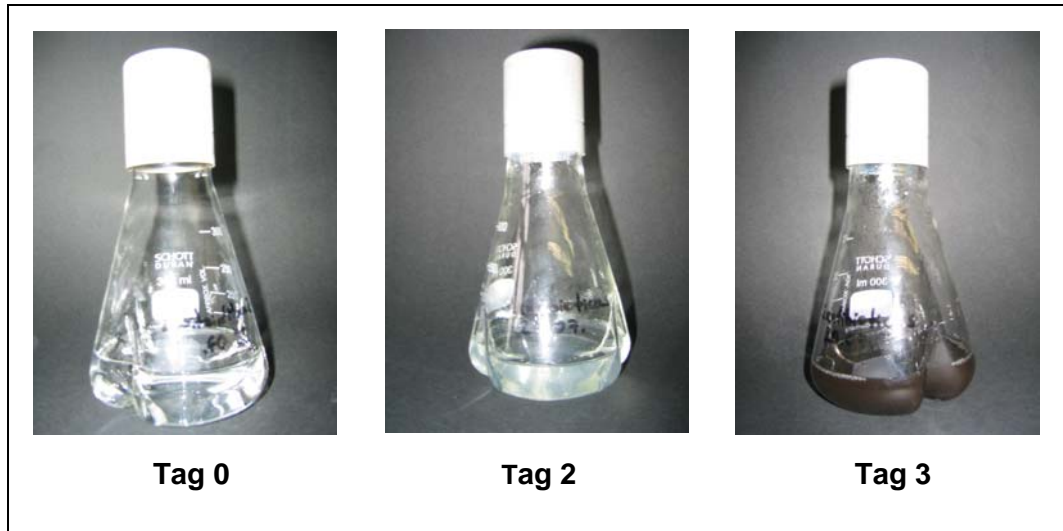


Abb. 3.2: Wachstum von *S. antibioticus* in AGMIT-Medium bei 30 °C und 180 Upm. Nach zwei Tagen Inkubation tritt eine Trübung des Mediums auf, die auf das vermehrte Zellwachstum zurück zu führen ist. Bereits 24 Stunden später ist das Medium durch fortschreitende Melaninsynthese tief schwarz gefärbt.

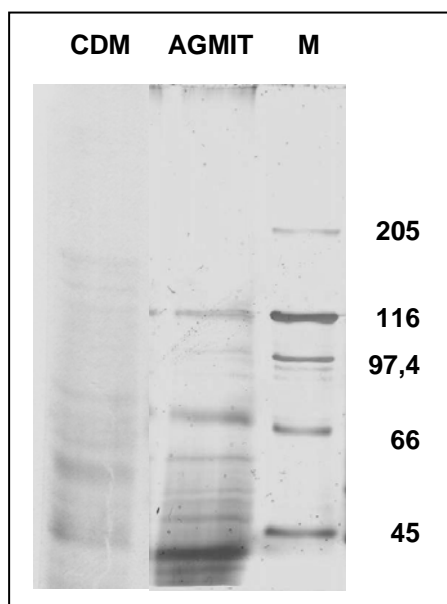


Abb. 3.3: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Kulturüberstände von *S. antibioticus* nach 3 Tagen Wachstum in CDM bzw. AGMIT-Medium.

Die Auftragung der Proben erfolgte unverdünnt mit einem Volumen von 30 μ l. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Silber gefärbt.

Marker (**M**): High Molecular Weight Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

Die Verwendung des tyrosinhaltigen AGMIT-Mediums ist aufgrund der starken Pigmentbildung zwar zum indirekten Nachweis einer Tyrosinase-Aktivität sehr gut geeignet, jedoch war die Isolierung des Enzyms aus dem Kulturüberstand nur unzureichend bis gar nicht möglich. Aus diesem Grund wurde bei den im Folgenden ver-

wendeten Medien zunächst nur auf die Zugabe von Tyrosin verzichtet (AGMI-Medium); später wurden dem Basismedium auch Arginin und Isoleucin nicht mehr zugesetzt (GM-Medium). Um eine ausreichende Verfügbarkeit an Cofaktor für die Synthese funktioneller Tyrosinase zu gewährleisten, wurde die Konzentration von Kupfersulfat im GM-Medium gegenüber der Konzentration in AGMI- und AGMI-Medium verfünffacht.

Durch Verzicht auf das potentielle Substrat Tyrosin im Kulturansatz verlief die Pigmentbildung deutlich langsamer, so dass ein günstiger Zeitpunkt der Aufarbeitung in Bezug auf Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt gewählt werden konnte. Im Kulturüberstand einer in AGMI-Medium gewachsenen *S. antibioticus*-Kultur konnte eine Diphenolase-Aktivität von 0,10 U/ml detektiert werden; im Kulturüberstand der ersten in GM-Medium gewachsenen Kultur wurden 0,23 U/ml gemessen.

Offensichtlich war von den getesteten Medien das GM-Medium für die Anreicherung und Isolierung des Tyrosinase-Proteins am besten geeignet und wurde daher im Folgenden für die Kultivierung von *S. antibioticus* zur Tyrosinase-Produktion verwendet. Das Kulturvolumen lag bei 2000 ml, die zu je 500 ml auf vier Erlenmeyerkolben verteilt wurden.

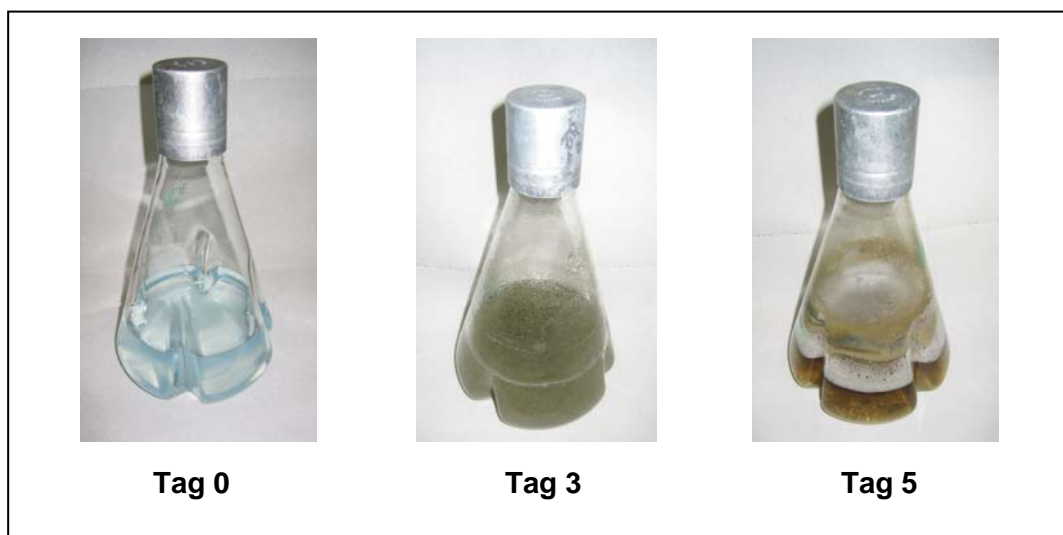


Abb. 3.4: Wachstum von *S. antibioticus* in GM-Medium bei 30°C und 180 Upm. 3 Tage nach Inokulation schlägt die Farbe des Mediums von blau zu grün um. Gleichzeitig führt das vermehrte Zellwachstum zu einer starken Trübung, die durch die Bildung eines Zellkranzes an der Gefäßwand im Laufe der Kultivierung wieder zurückgeht. Nach 5 Tagen nimmt das Medium eine braune Färbung an und ist fast völlig klar.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, änderte sich die Färbung des Mediums im Laufe der Kultivierung. Seine ursprünglich hellblaue Farbe, die auf die hohe Konzentration an Kupfersulfat zurück zu führen war, wechselte nach etwa zwei Tagen zu dunkelgrün, wobei der Farbumschlag stets mit einer sehr starken Zunahme der Zellmasse und somit einer Trübung der Kultur einherging. Die höchste Diphenolase-Aktivität konnte nach vier bis fünf Tagen festgestellt werden, ab dem sechsten Tag nahm die Aktivität wieder deutlich ab. Auch hier sind vermutlich die „Selbstmord“-Inaktivierung der Tyrosinase und die Wechselwirkung mit den verstärkt gebildeten Pigmenten ursächlich für den Aktivitätsverlust.

3.1.1.2 Anreicherung der Tyrosinase aus dem Kulturmedium

Die Aufarbeitung des Kulturüberstandes erfolgte am fünften Tag nach Abzentrifugieren der Zellmasse und Filtration des Mediums mittels Gefriertrocknung und Dialyse (siehe Kapitel 2.3.3.3). Auf diese Weise konnte die extrazelluläre Tyrosinase in aktiver Form angereichert werden.

Die Bestimmung der Diphenolase-Aktivität erfolgte quantitativ durch einen Dopachrom-Assay mit 15 mM L-Dopa als Substrat in einem 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0 bei 25 °C. Der Nachweis der Monophenolase-Aktivität erfolgte rein qualitativ mit Hilfe eines Tropfentests, in dem 10 µl Probe mit 10 µl einer 15 mM Tyramin-Lösung auf Parafilm 30 - 60 min inkubiert wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde durch einen Lowry-Test ermittelt. In Tab. 3.1 sind die Proteinausbeuten und Enzymaktivitäten einer exemplarischen Präparation wiedergegeben, Abb. 3.5 zeigt die Proteine innerhalb der gewonnenen Proben anhand einer denaturierenden SDS-PAGE.

Die ermittelte Diphenolase-Aktivität fiel bereits im Kulturüberstand mit 0,35 U/ml vergleichsweise hoch aus. Durch Einengen des Kulturfiltrats um den Faktor 40 konnte die Tyrosinase-Aktivität um den Faktor 33 gesteigert werden. Die Gesamt-Aktivität blieb bei der zweifachen Gefriertrocknung somit zu etwa 82 % erhalten. Von dem ursprünglich detektierten Protein konnten am Ende der Einengung noch etwa 25 % nachgewiesen werden.

Die spezifische Aktivität der Tyrosinase lag im Kulturüberstand bei 3,5 U/mg Protein, nach dem Aufkonzentrieren erhöhte sich der Wert um mehr als das Dreifache auf ca. 11,5 U/mg.

	Kulturfiltrat	1. Gefriertrocknung	2. Gefriertrocknung
Volumen [ml]	2000	100 (1/20)	50 (1/40)
Monophenolase-Aktivität	vorhanden	vorhanden	vorhanden
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	0,35	7,71 (x 22)	11,52 (x 33)
Diphenolase-Aktivität [U]	700	771 (110 %)	576 (82,3 %)
Proteingehalt [µg/ml]	99,5	581,7 (x 6)	~ 1000 (x 10)
Proteingehalt [mg]	199,0	58,2 (29 %)	~ 50 (25 %)
Spezifische Aktivität [U/mg]	3,5	13,2	~ 11,5

Tab. 3.1: Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt während der Aufarbeitung des Überstands einer in GM-Medium gewachsenen *S. antibioticus*-Kultur.

Die Proteinkonzentration konnte in der Probe nach der zweiten Gefriertrocknung nur nach 1000-facher Verdünnung und Extrapolation der Eichgeraden ermittelt werden und ist somit sehr ungenau. Generell wurden bei Mehrfachbestimmungen der Proteinkonzentration stark abweichende Werte gemessen, was eine genaue Abschätzung des Proteingehalts auch im Kulturfiltrat erschwert. Dies war vermutlich auf die in den Proben enthaltenen Pigmente zurückzuführen, die bei photometrischen Proteinbestimmungsmethoden die spezifische Absorption beeinträchtigen.

Die Resultate der SDS-PAGE (Abb. 3.5) zeigten zudem, dass neben der etwa 30 kDa schweren Tyrosinase offensichtlich nur sehr wenige weitere Proteine in der Probe enthalten waren, die nur in vergleichsweise geringen Mengen vorlagen. Daher

stellte die Abtrennung der Pigmente bei der weiteren Aufreinigung der Tyrosinase aus dem eingeeengten Kulturfiltrat die Hauptaufgabe dar.

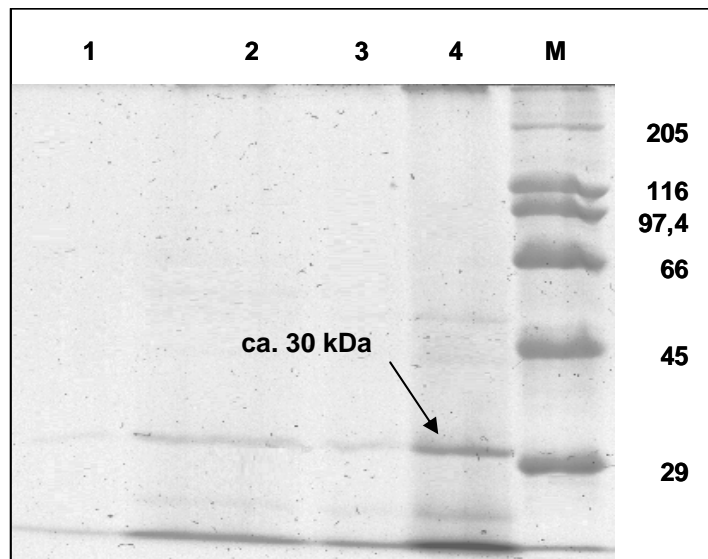


Abb. 3.5: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Proben des Überstands einer in GM-Medium gewachsenen *S. antibioticus*-Kultur. Aufgetragen wurden jeweils etwa 20 µl Probe, die anschließende Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue.

KF: unverdünntes Kulturfiltrat nach fünftägiger Kultivierung. **Gft1:** 1:10 verdünnte Probe des Kulturfiltrats nach der 1. Gefriertrocknung. **D:** Dialysat des eingeeengten Kulturfiltrats nach der 1. Gefriertrocknung (unverdünnt). **Gft2:** 1:20 verdünnte Probe des Kulturfiltrats nach der 2. Gefriertrocknung. **M** (Marker): High Molecular Weight Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

Die hohen Ausbeuten an Tyrosinase-Aktivität haben gezeigt, dass die mit GM-Medium gewählten Kulturbedingungen geeignet sind, das Tyrosinase-Protein aufzukonzentrieren, um es dann in weiteren Schritten zu isolieren und zu reinigen.

Die Anreicherung der Tyrosinase aus *S. antibioticus*-Kulturen der beschriebenen Größenordnung wurde mehrfach wiederholt, wobei die Ausbeute an aktivem Enzym sehr schwankte. Die meisten der durchgeführten Präparationen ergaben aber zum Teil sehr hohe Werte hinsichtlich der Enzym-Aktivität. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die erzielten Ausbeuten.

Die erheblichen Schwankungen in der Gesamtaktivität waren auf variierende Wachstumsverläufe während der Kultivierung zurückzuführen, die vermutlich durch die unterschiedliche Keimfähigkeit des Impfmateri als, abhängig vom Alter der verwendeten Dauerkulturen zu erklären war. Die Kulturansätze mit Gesamt-Aktivitäten unterhalb von 200 U (# 2 und # 5) waren für eine weitere Aufarbeitung jedoch ungeeignet.

Präparation	Diphenolase-Aktivität [U/ml]	Probenvolumen [ml]	Gesamtaktivität [U]
# 1	11,52	50	576
# 2	3,76	50	188
# 3	11,53	50	577
# 4	16,82	50	841
# 5	0,78	150	117
# 6	23,60	35	826

Tab. 3.2: Tyrosinase-Aktivität in den aufkonzentrierten Überständen von sechs verschiedenen *S. antibioticus*-Kulturansätzen. Die Ermittlung der Diphenolase-Aktivität erfolgte mittels Dopachrom-Assay mit 15 mM L-Dopa in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25°C.

3.1.1.3 Analytische isoelektrische Fokussierung des Kulturmediums

Von dem Kulturfiltrat einer *S. antibioticus*-Kultur in GM-Medium wurden nach vier bis sieben Tagen Kultivierungsdauer in Abständen von 24 h Proben entnommen, diese mittels Vakuum-Zentrifugation konzentriert und eine analytische IEF im Bereich von pH 3 - 10 durchgeführt (Abb. 3.6). Die Proben wurden mehrfach auf das Gel aufgetragen. Nach der Fokussierung wurde das Gel mit einem Skalpell in drei Teile zerschnitten und diese Teile unterschiedlichen Färbungen unterzogen. Ein Teil wurde mit Kristallviolett inkubiert, um die Proteinbanden anzufärben, die beiden übrigen Teile wurden zum Nachweis von Mono- und Diphenolase-Aktivität in 5 mM Tyramin- bzw. L-Dopa-Lösung inkubiert. Auf diese Weise konnte im Bereich von pH 9,5 eine Proteinbande gefunden werden, die eindeutig mit Aktivitätsbanden korrelierte (Abb. 3.6). Alle übrigen Proteine und Pigmente im Kulturfiltrat von *S. antibioticus* fokussierten deutlich unterhalb von pH 6,0.

Der experimentell ermittelte, alkalische isoelektrische Punkt für die *S. antibioticus* Tyrosinase weicht erheblich von dem mittels Protparam tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) kalkulierten theoretischen Wert von 7,21 ab. Jedoch wurde ein ähnlich alkalischer pI für eine Streptomyces-Tyrosinase beispielsweise auch bei *S. michiganensis* experimentell gefunden [99].

Für den pI der Tyrosinase aus *S. glaucescens* wiederum wurde durch IEF der Wert 6,95 ermittelt [97]. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Tyrosinasen verschiedener *Streptomyces* Spezies signifikant in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden können [95].

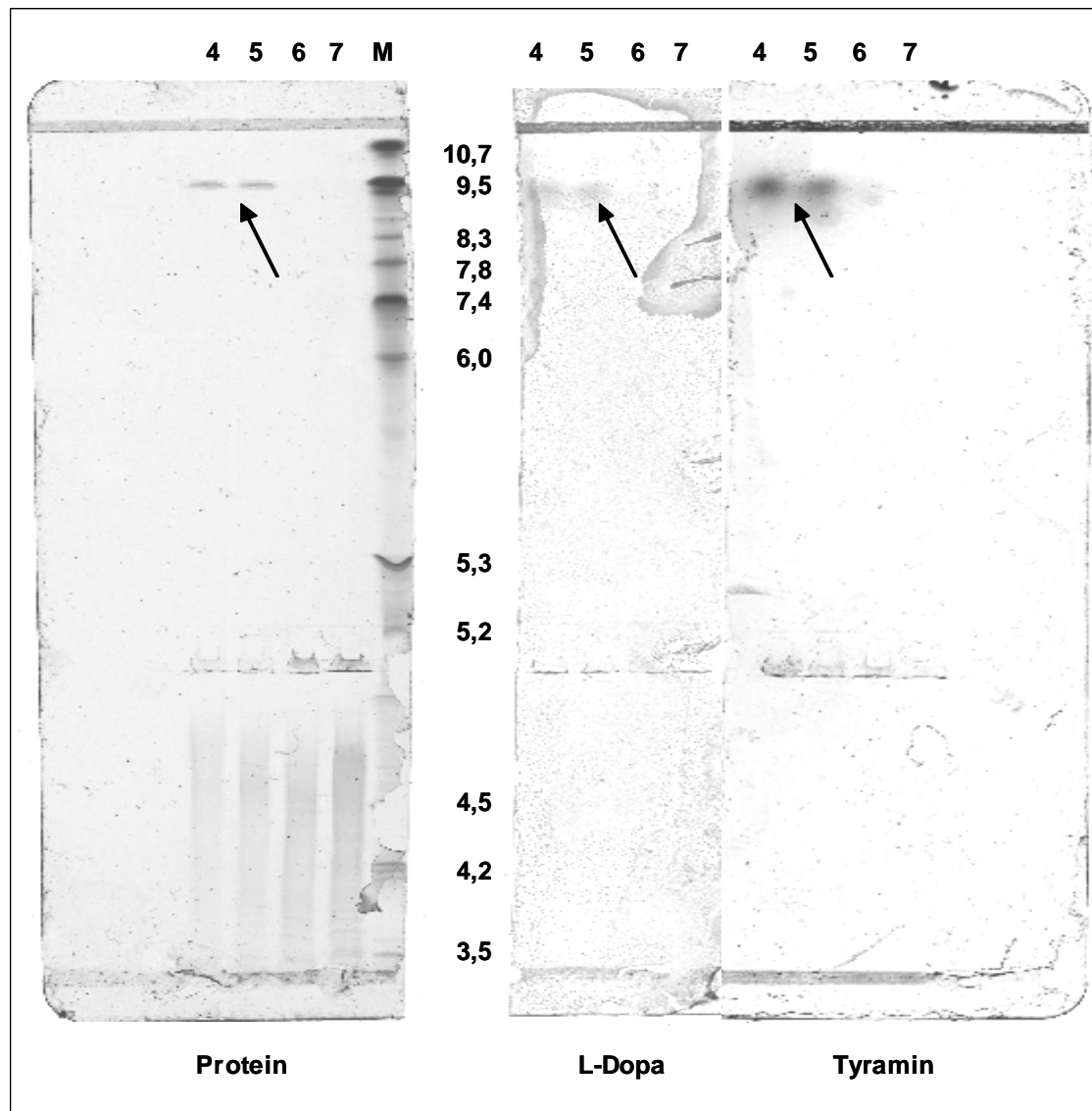


Abb. 3.6: Analytische IEF des aufkonzentrierten Kulturfiltrats nach 4, 5, 6 und 7 Tagen Kultivierung von *S. antibioticus* in jeweils 500 ml GM-Medium. Die Laufparameter wurden mit 5 mA Stromstärke bei einem Spannungs-Limit von 2000 V festgelegt. Die Auftragung der Proben erfolgte nach Erreichen einer Spannung von 1200 V, das Probenvolumen betrug 6 μ l, die Temperatur während der Fokussierung wurde konstant bei 5 °C gehalten. **4, 5, 6, 7:** konzentrierter Kulturüberstand nach vier, fünf, sechs und sieben Tagen Kultivierung. **M** (IEF-Marker): Serva Liquid Mix 3 - 10, Serva (Heidelberg). Die isoelektrischen Punkte der Markerproteine sind in pH-Einheiten angegeben. Die Pfeile markieren die Tyrosinase.

3.1.1.4 Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturmedium

Mit dem Ergebnis der analytischen IEF wurde zum einen das Vorhandensein einer Tyrosinase mit Mono- und Diphenolase-Aktivität eindeutig bestätigt, zum anderen wurde mit dem basischen Charakter des Zielenzym eine Grundlage für weitere Reinigungsschritte aufgezeigt.

Die präparative IEF sollte für die Abtrennung der Pigmente und Fremdproteine von der Tyrosinase aufgrund der oben geschilderten Resultate eine ideale Methode darstellen. In einem pH-Gradienten von 3 - 10 konnten die Pigmente in der Tat sehr gut vom Kulturfiltrat abgetrennt werden. Sie fokussierten fast ausschließlich in den ersten fünf sauren von insgesamt 20 Fraktionen. In den ersten sieben alkalischen Fraktionen konnte zwar in einem Tropfentest eine Diphenolase-Aktivität mit 15 mM L-Dopa nachgewiesen werden, jedoch fiel die Nachweisreaktion viel schwächer aus, als erwartet. Auch nach Vereinigen und Konzentrieren der Proben konnten nur sehr geringe Enzym-Aktivitäten nachgewiesen werden, im SDS-Gel konnten auch nach Silberfärbung keine Proteinbanden detektiert werden. Die Verluste traten vermutlich durch Adsorption an den Polyestermembranen im Kammerinnern auf, die den pH-Gradienten stabilisieren und die Fraktionen voneinander trennen. Gestützt wurde diese Annahme durch die Tatsache, dass Phenoloxidasen im Allgemeinen als „sticky enzymes“ bekannt sind [11], was auf ihre starken adhäsiven Eigenschaften zurückzuführen ist. Im Rahmen der Aufreinigung einer rekombinant überexprimierten Tyrosinase aus *S. antibioticus* durch Bernan *et al.* [98] wurde aufgrund dieses Umstandes bereits die Annahme formuliert, dass die Tyrosinase über exponierte, hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche verfügt.

Der Ansatz, die Tyrosinase mittels der präparativen IEF aufzureinigen, wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

Die Isolation der Tyrosinase aus dem Kulturfiltrat von *S. antibioticus* mittels Kationen-Austausch stellt eine Methode dar, die sich ebenso wie die präparative IEF die positive Nettoladung des Enzyms bei physiologischem pH-Wert zunutze machen sollte. Die Methode wurde sowohl mit kommerziell erhältlichen Kationen-Austauschersäulen (Vivapure Maxi S, Vivapure, Hannover), als auch mit Kationen-Austauschermaterial (Servacell P23, Serva, Heidelberg) im *batch*-Verfahren durchgeführt.

Die Tabellen 3.3 und 3.4 geben exemplarisch Auskunft über die hierbei erzielten Aktivitäts- und Proteinausbeuten.

	Ausgangsp robe	Säulen-Eluat
Volumen [ml]	50	10 (1/5)
Monophenolase-Aktivität	vorhanden	vorhanden
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	11,52	7,80 (68 %)
Diphenolase-Aktivität [U]	576	78 (14 %)
Proteingehalt [µg/ml]	~ 1000	126,8 (13 %)
Proteingehalt [mg]	~ 50	1,27 (3 %)
Spezifische Aktivität [U/mg]	~ 11,5	61

Tab. 3.3: Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt nach Kationen-Austausch mittels Vivapur Maxi S Säule (Vivascience, Hannover). Die Aufarbeitung erfolgte aus dem konzentrierten Kulturfiltrat der Präparation # 1 (Tab 3.1 und Tab 3.2). Die Ermittlung der Diphenolase-Aktivität erfolgte mittels Dopachrom-Assay mit 15 mM L-Dopa in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25°C, die Ermittlung der Monophenolase-Aktivität erfolgte rein qualitativ mittels Tropfentest. Der Proteingehalt der Proben wurde durch einen Lowry-Test bestimmt.

Bei der Durchführung des Kationen-Austauschs mittels Säulen konnten 8 - 14 % der Tyrosinase-Aktivität und etwa 2 - 3 % des ursprünglich enthaltenen Proteins gewonnen werden. Der Säulendurchfluss wies nach Applikation der Probe noch eine Aktivität von 7,9 U/ml und einen Proteingehalt von über 1000 µg/ml auf. Somit schien ein Nachteil der Methode offenbar in der geringen Bindungskapazität des Tauschermaterials zu liegen. Wie aus Abbildung 3.7 ersichtlich, wurde aus dem Kulturfiltrat jedoch auch nur eine einzelne Proteinbande isoliert, die mit 20 - 30 kDa etwa in der Größenordnung der monomeren Tyrosinase lag.

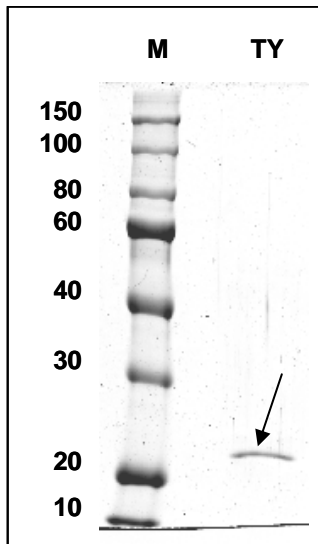


Abb. 3.7: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Tyrosinase (TY) aus *S. antibioticus* nach Kationen-Austausch mittels Vivapur Maxi S Austauscher-Säule (Vivascience, Hannover).

Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl in 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0. Die Probe wurde anschließend dialysiert und mittels Vakuum-Zentrifugation konzentriert.

Die Auftragung der Probe erfolgte unverdünnt mit einem Volumen von 10 μ l. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Marker (M): Rotimark (Roth, Karlsruhe). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert die Tyrosinase.

Ein Absorptionsspektrum der Probe ergab neben einer Absorption bei 280 nm keine weiteren signifikanten Signale (Abb. 3.8). Im Bereich zwischen 450 und 320 nm nahm die Absorption stetig zu, was vermutlich auf Streuung zurück zu führen war, die von in der Probe enthaltenen Pigmenten hervorgerufen worden sein könnte. Der an anderer Stelle bereits erwähnte adhäsive Charakter der Tyrosinase könnte für diese Kontaminationen verantwortlich gewesen sein.

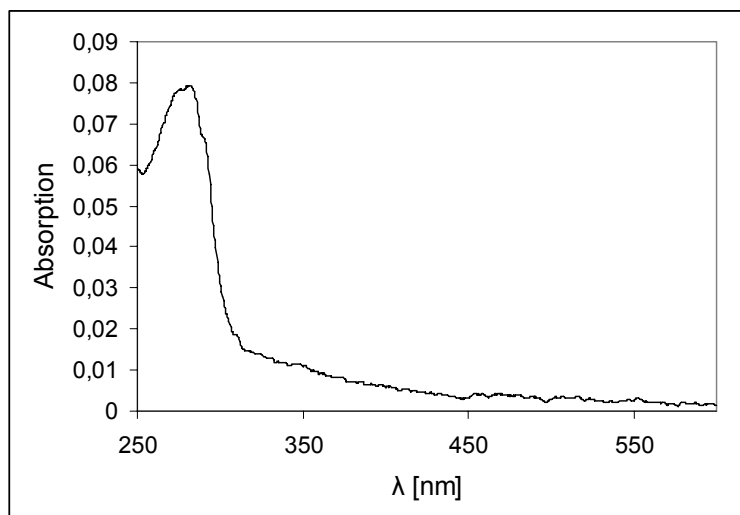


Abb. 3.8: Absorptionsspektrum des Eluats nach Kationen-Austausch mittels einer Austauscher-Säule.

Neben dem Absorptions-Maximum bei 280 nm ist eine schwache Absorptionzunahme zwischen 450 und 320 nm erkennbar, die vermutlich auf Streuung zurück zu führen ist.

Der Befund der Absorptions-Spektroskopie legt die Vermutung nahe, dass die Tyrosinase überwiegend in der *met*-Form vorlag. Auf das Vorhandensein eines oxygenierten Kupfer-Zentrums kann aufgrund der schwachen und zudem kontinuierlich ansteigenden Absorption im Bereich um 340 nm nicht geschlossen werden. Dies deckt sich mit bisherigen Beobachtungen [64, 191], bei denen die gereinigte Tyrosinase aus *Streptomyces* in einem Gemisch von etwa 90 % *met*- und 10 % *oxy*-Form

vorlag. Die Durchführung des Kationen-Austauschs im *batch*-Verfahren mit Servacell P23, einer Carboxymethyl-Cellulose, lieferte keine deutlich veränderten Ausbeuten gegenüber der Variante mit den Trennsäulen. Bezüglich der Proteinausbeute konnte aufgrund der Datenlage keine endgültige Aussage getroffen werden, jedoch zeigt ein Vergleich der Werte aus Tabelle 3.3 mit denen aus Tabelle 3.4, dass beide Verfahrensweisen durchaus ähnliche Resultate erbrachten.

	Ausgangsprobe	Eluat
Volumen [ml]	50	10 (1/5)
Monophenolase-Aktivität	vorhanden	vorhanden
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	16,82	9,70 (57,7 %)
Diphenolase-Aktivität [U]	841	97 (11,5 %)
Proteingehalt [µg/ml]	n. b.	186,0
Proteingehalt [mg]	n. b.	1,86
Spezifische Aktivität [U/mg]	n. b.	52

Tab. 3.4: Proteingehalt und Tyrosinase-Aktivität nach Kationen-Austausch mit Servacell P23 (Serva, Heidelberg) im *batch* Verfahren. Die Aufarbeitung erfolgte aus dem aufkonzentrierten Kulturfiltrat der Präparation # 4 (Tab 3.2). Die Ermittlung der Diphenolase-Aktivität erfolgte mittels Dopachrom-Assay mit 15 mM L-Dopa in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25°C, die Ermittlung der Monophenolase-Aktivität erfolgte rein qualitativ mittels Tropfentest. Der Proteingehalt der Proben wurde durch einen Lowry-Test bestimmt.

Eine denaturierende SDS-PAGE offenbarte auch in diesen Präparationen stets eine einzelne Proteinbande mit ca. 20-30 kDa Molekulargewicht (Abb. 3.9).

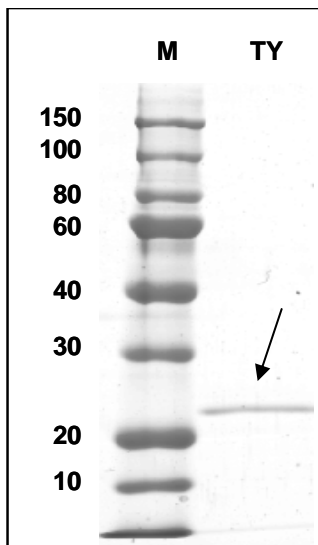


Abb. 3.9: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Tyrosinase (TY) aus *S. antibioticus* nach Kationen-Austausch mit Servacell P23 (Serva, Heidelberg) im *batch*-Verfahren. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl in 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0. Die Probe wurde anschließend dialysiert und mittels Vakuum-Zentrifugation konzentriert.

Die Auftragung der Probe erfolgte unverdünnt mit einem Volumen von 10 μ l. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Marker (M): Rotimark (Roth, Karlsruhe). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert die Tyrosinase.

Ein Absorptionsspektrum der aufgereinigten Tyrosinase ergab auch hier lediglich bei 280 nm ein deutliches Signal (Abb. 3.10). Im Bereich um 340 nm konnte ein ähnlich unklares Signal detektiert werden, wie in den Reinigungsansätzen mit den Kationen-Austauscher Säulen. Zwar war erst unterhalb von 380 nm eine Absorptionsänderung wahrnehmbar, die auf Streuung schließen ließe, jedoch zeigte sich bei 340 nm kein diskretes Absorptionsmaximum und somit kein Hinweis auf ein Vorliegen der Tyrosinase in der *oxy*-Form.

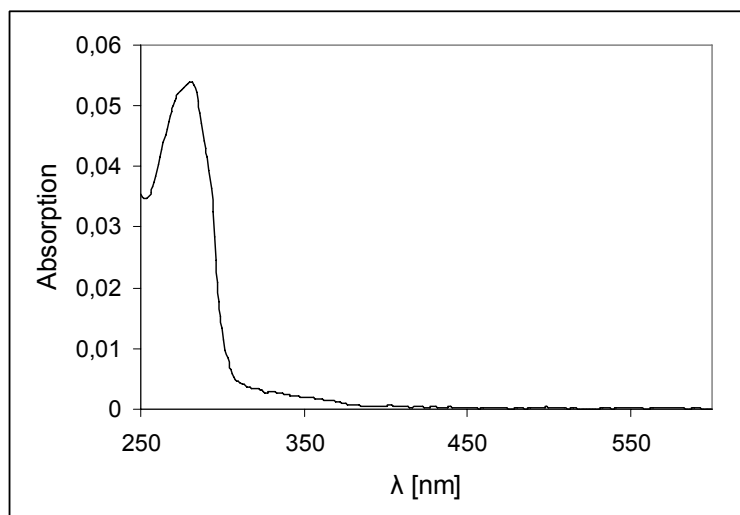


Abb. 3.10: Absorptionsspektrum des Eluats nach Kationen-Austausch im *batch*-Verfahren. Neben dem Absorptions-Maximum bei 280 nm ist ein schwaches Absorptionssignal zwischen 400 und 320 nm erkennbar.

Trotz der geringen Ausbeuten schien der Kationen-Austausch sehr gut dazu geeignet zu sein, die Tyrosinase von den übrigen Proteinen, sowie einem Großteil der Pigmente zu trennen.

3.1.2 Kultivierung von *S. antibioticus* im halb-technischen Maßstab

Für die Gewinnung ausreichender Mengen an nativer Tyrosinase wurde nun im Folgenden die Aufarbeitung größerer Probenmengen angestrebt.

Für diesen Zweck stand ein Fermenter mit 70 l Fassungsvermögen zur Verfügung, der mit 50 l sterilem GM-Medium befüllt wurde. Das Medium wurde mit einer Vorkultur angeimpft und drei Tage bei 20 - 30 °C und 150 - 180 Upm inkubiert. Während der Fermentation wurden in unregelmäßigen Abständen Proben entnommen, um Proteingehalt und Tyrosinase-Aktivität zu bestimmen (siehe Tab. 3.5).

3.1.2.1 Kultivierungsverlauf

Die Bestimmung der Diphenolase-Aktivität erfolgte photometrisch mit Hilfe des Dopachrom-Assays. Die Ermittlung der Monophenolase-Aktivität erfolgte rein qualitativ mit Tyrosin-Methylester als Substrat. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde mit einem Lowry-Assay durchgeführt. Nach 48 h konnte die höchste Tyrosinase-Aktivität gemessen werden, die zum Zeitpunkt der Ernte (nach 69 h) bereits wieder leicht abfiel. Der Proteingehalt im Kulturfiltrat stieg jedoch über den gesamten Zeitraum kontinuierlich an. Der pH-Wert des Mediums änderte sich während der Kultivierung durch den Zellstoffwechsel nur geringfügig und lag am Ende etwa 0,3 Einheiten über dem Ausgangswert. Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen aus dem Kulturansatz abgetrennt und zur Isolierung der Proteine aus dem Überstand eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Das Volumen des erhaltenen Präzipitats lag nach Dialyse bei etwa 250 ml. Eine Gefriertrocknung des Kulturfiltrats konnte aufgrund des großen Volumens nicht durchgeführt werden.

Die Diphenolase-Aktivität im Kulturfiltrat zum Zeitpunkt der Ernte betrug etwa 2,1 U/ml und konnte durch die Fällung auf das 10-fache gesteigert werden. Gleichzeitig wurde das Volumen um den Faktor 200 von 50 l auf 250 ml reduziert. Somit konnten lediglich etwa 5 % der ursprünglichen Gesamt-Aktivität gewonnen werden. Mit 0,53 mg Gesamt-Protein konnten etwa 2,5 % der am Ende der Kultivierung im Filtrat enthaltenen 22 mg Protein im Präzipitat nachgewiesen werden.

Die spezifische Aktivität stieg vermutlich aufgrund der verstärkten Tyrosinase-Synthese während der Kultivierung auf maximal 8,9 U/mg an, nahm zum Erntezeitpunkt jedoch wieder um fast die Hälfte ab. In wie weit hier ein Zusammenhang mit

der deutlichen pH-Wert-Erhöhung von 7,2 auf 7,8 bestand, kann jedoch nur spekuliert werden. Nach der Fällung wurde für die spezifische Aktivität ein Wert von 9,6 U/mg erreicht.

Inkubationszeit [h]	pH-Wert	Diphenolase- Aktivität [U/ml]	Protein [mg/l]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamt- Aktivität [U]
0	7,48	0,02	0,09	0,2	1000
22	7,29	0,04	0,10	0,4	2000
30	7,35	0,41	0,12	3,4	20500
48	7,22	2,20	0,25	8,9	110000
69	7,80	2,08	0,44	4,7	104000
Fällungs- präzipitat	7,00	19,99	2,09	9,6	4998

Tab. 3.5: Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt während der Kultivierung von *S. antibioticus* im Fermenter und im dialysierten Präzipitat der Ammoniumsulfat-Fällung. Das Volumen der Flüssigkultur lag bei 50 l, das Volumen des Ammoniumsulfat-Präzipitats lag bei 0,25 l.

Verglichen mit der Gefriertrocknung der Kulturfiltrate im Labormaßstab (siehe Kapitel 3.1.1.2), bei der 82 % der Tyrosinase-Aktivität und 25 % des Gesamt-Proteins erhalten blieben, lieferte die Ammoniumsulfat-Fällung mit 5 % der ursprünglichen Tyrosinase-Aktivität und 2,5 % des Gesamt-Proteins nur verhältnismäßig geringe Ausbeuten.

Zur genaueren Betrachtung der Proteinsynthese während der Kultivierung wurden die Proben einer SDS-PAGE unterzogen (Abb. 3.11). Hierbei zeigte sich, dass erst nach 48 h Kultivierung ein 30 kDa schweres Protein in nachweisbaren Mengen vorlag, bei dem es sich vermutlich um die Tyrosinase handelte. Nach 69 h waren auch weitere, schwache Proteinbanden erkennbar. Im Ammoniumsulfat-Präzipitat konnten einige diskrete Proteinbanden detektiert werden, jedoch verursachten die in der Probe enthaltenen Pigmente ein sehr starkes Hintergrundsignal in der Laufspur.

Die Tyrosinase bildete die anteilmäßig größte Proteinfraktion innerhalb der Probe. Bei den übrigen Proteinbanden handelte es sich vermutlich um weitere Exoenzyme, die jedoch nicht näher identifiziert wurden.

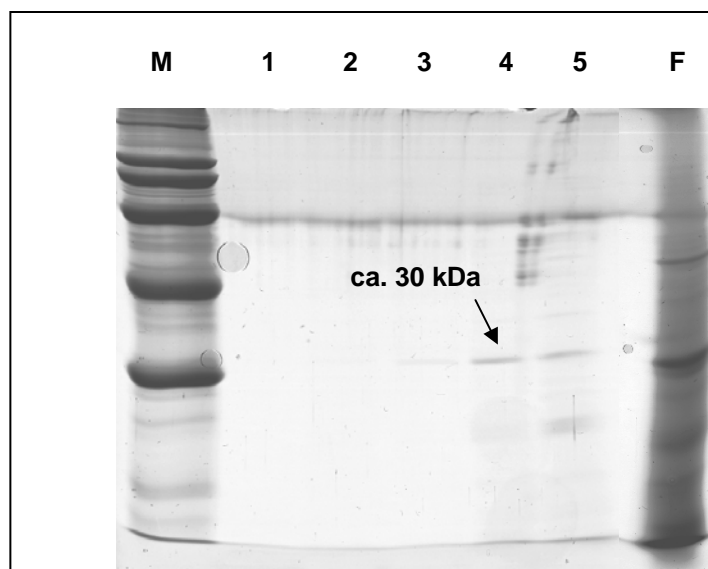


Abb. 3.11: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Proben des Kulturfiltrats zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung und nach Ammoniumsulfat-Fällung. Aufgetragen wurden jeweils etwa 20 µl Probe, die anschließende Färbung des Gels erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue.

1 - 5: Kulturfiltrat nach 0, 22, 30, 48 und 69 Stunden. **F:** Kulturfiltrat nach Ammoniumsulfat-Fällung. **M** (Marker): High Molecular Weight Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

3.1.2.2 Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand mittels Kationenaustausch

Wie bereits bei der Aufarbeitung der Kultivierungsansätze im Labormaßstab, wurde für die Isolation der Tyrosinase aus dem Fermenteransatz zunächst ein Kationenaustausch durchgeführt. Dies erfolgte sowohl im *batch*-Verfahren, als auch mittels Trennsäulen.

Für den Kationenaustausch im *batch*-Verfahren wurde das dialysierte Ammoniumsulfat-Präzipitat mit dem Austauscher-Material (Servacell P23) für 1 - 3 h inkubiert und die Tyrosinase in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Bedingungen eluiert. In den Eluaten konnten noch 4 - 10 % des ursprünglichen Proteins nachgewiesen werden. Die in den Eluaten gemessene Diphenolase-Aktivität fiel mit 0,6 - 1,3 % der Aktivität in der Ausgangsprobe allerdings äußerst gering aus.

Zudem wiesen die Absorptionsspektren dieser Proben einen nicht unerheblichen Streuungsanteil auf. Zur besseren Darstellung wurde dieser Streuungsanteil rechnerisch korrigiert. Hierfür wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass die streuenden Partikel wesentlich kleiner sind, als die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, in diesem Fall 240 - 600 nm. Somit wäre die Streuung proportional zu $1 / \lambda^4$ und kann durch die Ermittlung eines Proportionalitätsfaktors von der Absorption abgezogen werden. Der benötigte Proportionalitätsfaktor wurde anhand der Steigung im langwelligeren Bereich oberhalb von 400 nm ermittelt. In Abbildung 3.12 sind das Spektrum eines Eluats, sowie dessen korrigierter Verlauf exemplarisch dargestellt. Die bei 310 - 360 nm zu erkennende Absorption ist vermutlich auf Verunreinigungen der Probe mit Pigmenten zurückzuführen, auch wenn im korrigierten Spektrum der Eindruck vermittelt wird, dass das Enzym zumindest teilweise in der oxy-Form vorlag.

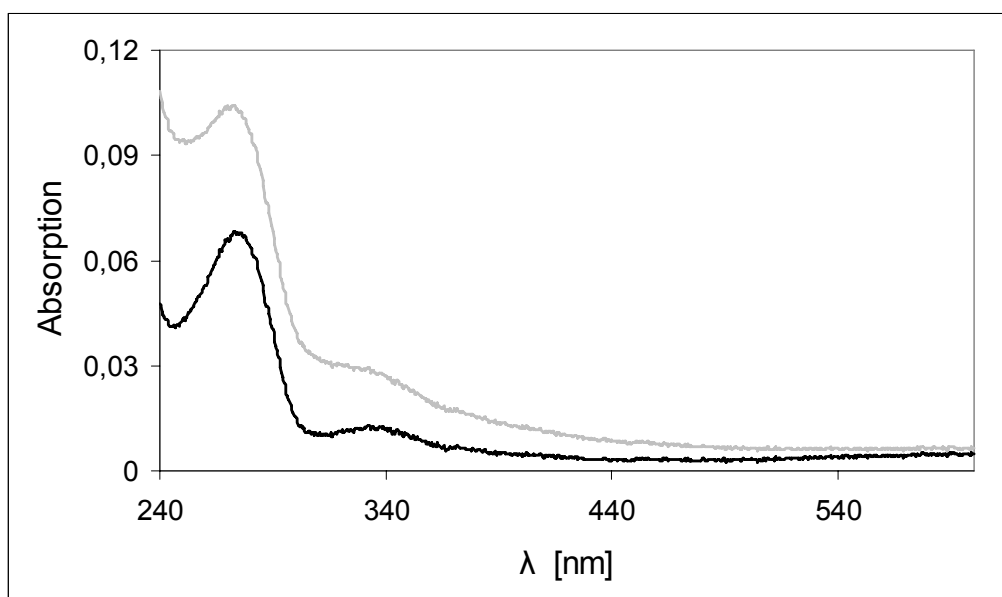


Abb. 3.12: Absorptionsspektrum des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Kationenaustausch mit Servacell P23 (Serva, Heidelberg). Die Elution der Probe erfolgte mit 1 M NaCl in 25 mM PIPES, pH 7,0 für 3 h. Dargestellt sind sowohl das gemessene Spektrum (grau), als auch der um den Streuungsanteil korrigierte Verlauf (schwarz). Neben einem Absorptionsmaximum bei 280 nm ist ein weiteres Signal bei 310 - 360 nm zu erkennen, das wegen der geringen Enzymaktivität der Probe auf chinonhaltige Pigmente zurückgeführt wurde.

Da das Austauscher-Material aus den vorangegangenen Ansätzen auch nach der Elution bei Inkubation in einer Substratlösung noch sehr starke Farbreaktionen hervorrief, war anzunehmen, dass das Enzym, vermutlich aufgrund seiner bereits erwähnten adhäsiven Eigenschaften, sehr starke, unspezifische Wechselwirkungen mit dem Material einging. Daher wurde in einem weiteren Ansatz die Elutionszeit von

einigen Stunden auf 10 - 20 min verkürzt. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl in 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0. Auf diese Weise konnte eine Probe eluiert werden, die mit 8,61 U/ml noch etwa 43 % der Aktivität in der Ausgangsprobe aufwies. Anhand der Absorption bei 280 nm und des molaren Extinktionskoeffizienten der *S. glaucescens* Tyrosinase wurde der Proteingehalt näherungsweise ermittelt. Dieser lag bei etwa 46 µg/ml und betrug somit 2 % des im Ammoniumsulfat-Präzipitat bestimmten Wertes. Die daraus resultierende spezifische Aktivität lag bei 187 U/mg.

Das Absorptionsspektrum der Probe wies, wie in den vorangegangenen Ansätzen einen deutlichen Streuungsanteil auf. Eine Absorption im Bereich von 310 - 360 nm konnte jedoch nicht festgestellt werden, womit die Probe offensichtlich weniger Pigment-Verunreinigungen enthielt.

In weiteren Versuchs-Ansätzen wurde mit Servacell CM32 (ebenso wie P23 eine Carboxymethyl-Cellulose) ein alternatives Austauscher-Material verwendet. Die Elutionen erfolgten sowohl mit 1 M NaCl, als auch mit KCl in Konzentrationen von 0,5 und 1 M. Sowohl die Inkubationszeit, als auch die Dauer der Elution wurden mehrfach verändert. Alle Variationen ergaben aber vergleichbare Resultate, die bezüglich der Protein- und Aktivitätsausbeuten keine Verbesserungen gegenüber der Verwendung von Servacell P23 brachten.

Zur Einschätzung der Reinheit der eluierten Proben wurden diese einer SDS-PAGE unterzogen. Hierbei konnte in allen Proben lediglich eine Proteinbande mit etwa 30 kDa Molekulargewicht gefunden werden. In Abb. 3.13 A ist exemplarisch das Ergebnis einer Elektrophorese wiedergegeben.

Zur Isolierung der Tyrosinase aus dem Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturüberstandes wurde auch ein Kationen-Austausch mittels Vivapure Maxi S Säulen durchgeführt. Die Elution mit 1 M NaCl in 25 mM PIPES-Puffer, pH 7,0 wurde zweimal hintereinander durchgeführt. Zwar konnten mit 20 - 40 % der eingesetzten Enzymaktivität sehr befriedigende Resultate erbracht werden, jedoch konnte bei der Überprüfung mittels SDS-PAGE neben der Tyrosinase noch mindestens eine weitere Proteinbande detektiert werden, die auch im aufgetragenen Filtrat die zweitstärkste Proteinfraktion darstellte (Abb. 3.13 B). Die Abschätzung des Proteingehalts anhand der Absorption bei 280 nm erbrachte zudem Werte, aus denen sich eine spezifische Aktivität von lediglich 15 - 24 U/mg ergaben.

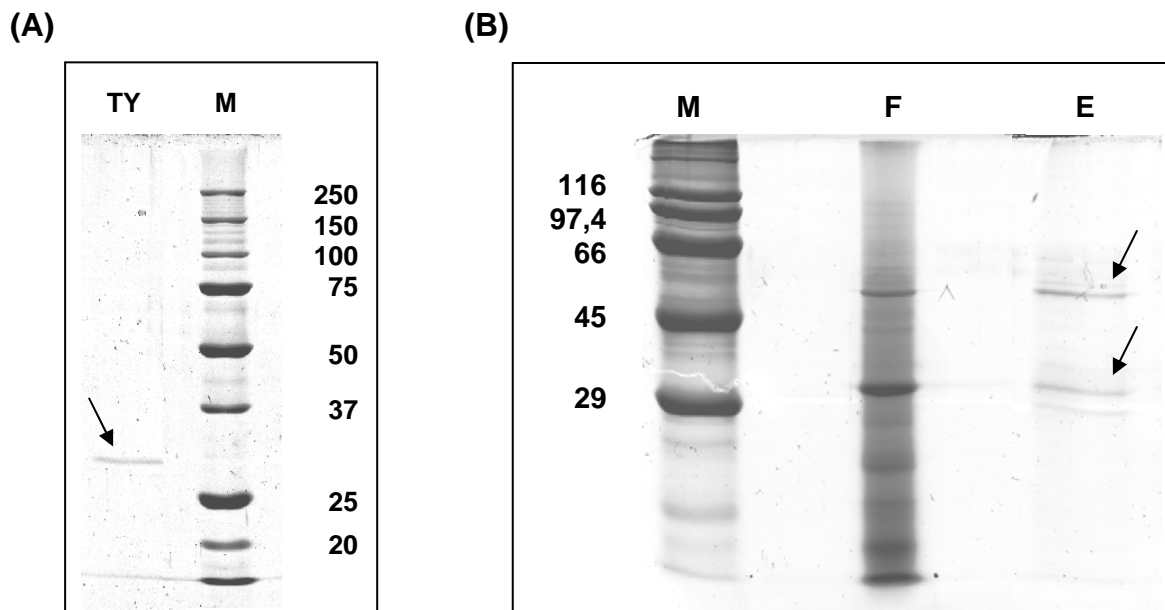


Abb. 3.13: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) von Proben nach Kationen-Austausch im *batch*-Verfahren (A) und mittels Austauscher-Säule (B). Aufgetragen wurden jeweils etwa 20 µl Probe, die Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue.

- (A): **TY:** Tyrosinase nach Elution mit 0,5 M NaCl in 25 mM PIPES, pH 7,0.
M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert die Tyrosinase.
- (B): **F:** Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturfiltrats.
E: Tyrosinase nach Elution mit 0,5 M NaCl in 25 mM PIPES, pH 7,0.
M (Marker): High Molecular Weight Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren zum einen die Tyrosinase (unten), zum anderen ein nicht näher charakterisiertes Fremdenzym (oben) mit einem Molekulargewicht von ca. 50 - 60 kDa.

Die Ausbeuten der beiden Kationen-Austausch-Verfahren (*batch* und Trennsäulen) lagen deutlich unter den Erwartungen. Auch eine Variation von pH-Wert (5,5 - 8,5), Salzkonzentration (0,2 - 2,0 M NaCl) und Elutionszeit (5 min bis 48 h) erbrachte keine nennenswerten Änderungen in der Ausbeute. Der Einsatz von kommerziell erhältlichen Trennsäulen erhöht zwar die Ausbeute an Protein im Eluat, jedoch zeigten sich im SDS-Gel zusätzliche Banden. Das Absorptionsspektrum dieser Fraktionen unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem der *batch*-Eluate.

Für eine effiziente Reinigung der Tyrosinase schien ein Kationen-Austausch nicht die geeignete Methode zu sein. Im Folgenden wurde daher eine andere Vorgehensweise angewendet, die den während der präparativen IEF gemachten Beobachtungen ebenfalls Rechnung trug. Mittels Anionen-Austausch wurde nun versucht, die Pigmente, sowie den überwiegenden Teil der Fremdproteine von der Tyrosinase zu trennen, um diese dann mittels weiterer Präparationsschritte zu reinigen.

3.1.2.3 Isolierung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand mittels Anionen-Austausch

Die Durchführung des Anionen-Austausches erfolgte im *batch*-Verfahren, indem das dialysierte Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturfiltrats mit dem Austauscher-Material (Servacell DEAE52) für wenige Minuten inkubiert wurde. Nach dem Abzentrifugieren des Tauschermaterials war das Kulturfiltrat wasserklar und wies im Durchschnitt noch etwa ein Drittel der ursprünglichen Diphenolase-Aktivität auf. Ein Überblick über die Resultate einiger Präparationen ist in Tabelle 3.6 exemplarisch wiedergegeben. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf eine oder mehrere Stunden führte zu einer deutlich geringeren Aktivitätsausbeute, was vermutlich auf unspezifische Wechselwirkung der Tyrosinase mit dem Tauschermaterial zurückzuführen war.

Präparation	Ausgangsprobe [U/ml]	nach Anionen-Austausch [U/ml]	Ausbeute [%]
# 1	22,8	8,0	35,2
# 2	21,9	3,9	17,7
# 3	20,2	4,4	21,6
# 4	18,0	7,3	40,7
# 5	25,6	8,4	32,8
# 6	14,5	6,5	44,6
# 7	14,0	4,7	33,8

Tab. 3.6: Tyrosinase-Aktivität im Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturfiltrates vor und nach Anionen-Austausch mit Servacell DEAE52 (Serva, Heidelberg). Die Ermittlung der Diphenolase-Aktivität erfolgte mittels Dopachrom-Assay mit 15 mM L-Dopa in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25°C.

Die unlöslichen Bestandteile des Ammoniumsulfat-Präzipitats wurden in etwa dem gleichen Volumen Puffer aufgenommen und filtriert und anschließend wie oben beschrieben mit DEAE52 behandelt. Die im Filtrat gemessene Diphenolase-Aktivität lag mit 52,2 U/ml deutlich über der Aktivität der bisher eingesetzten Proben. Nach dem Anionen-Austausch konnten mit 28,2 U/ml noch etwa 54 % der Aktivität nachgewiesen werden.

Wie schon bei der Durchführung des Kationen-Austauschs konnte auch nach Anionen-Austausch lediglich eine einzelne Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa im SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

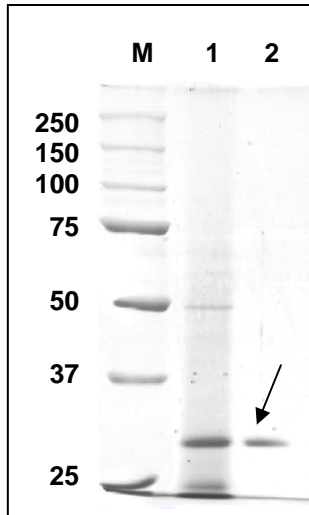


Abb. 3.14: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) des Ammoniumsulfat-Präzipitats vor (1) und nach (2) Anionen-Austausch mit Servacell DEAE52 (Serva, Heidelberg) im *batch*-Verfahren. Die Probe entstammte der Präparation # 1 (Tab. 3.6).

Die Auftragung der Probe erfolgte unverdünnt mit einem Volumen von 30 μ l. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Bio-rad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert die Tyrosinase.

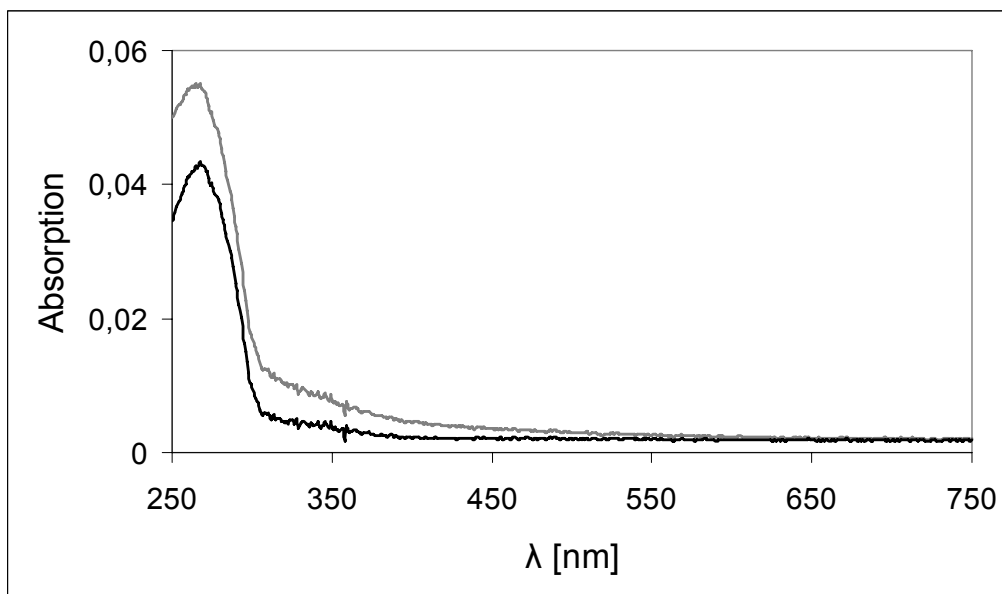


Abb. 3.15: Absorptionsspektrum des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen-Austausch mit Servacell DEAE52 (Serva, Heidelberg) der Präparation # 1 (Tab. 3.6). Dargestellt sind sowohl das gemessene Spektrum (grau), als auch der um den Streuungsanteil korrigierte Verlauf (schwarz).

Bei der Betrachtung der Absorptionsspektren der Proben zeigte sich stets ein sehr ähnliches Bild. Neben einem Absorptionsmaximum, das anders als bei den Proben nach Kationen-Austausch bei 260 - 265 nm lag und somit leicht in den kurzwelligen Bereich verschoben war, zeigte sich zwischen 300 und 450 nm eine kontinuierliche Absorptionzunahme (Abb. 3.15). Sowohl die Lage des Absorptionsmaximums, als

auch die Zunahme der Absorption unterhalb von 450 nm, deuteten auf das Vorhandensein von Pigmentverunreinigungen in der Probe hin. Ein ausgeprägtes Absorptionssignal zwischen 300 und 360 nm konnte nicht festgestellt werden.

Für die weitere Aufreinigung des Enzyms konnte mittels Anionen-Austausch unter geringem Aufwand sehr viel Probenmaterial aufgearbeitet werden, wobei die erzielten Ausbeuten an Enzymaktivität sehr zufrieden stellend ausfielen. Zudem konnte in diesem einen Schritt bereits sämtliches Fremdprotein aus den Proben entfernt werden.

3.1.2.4 Reinigung der Tyrosinase mittels Größenausschluss-Chromatographie

Die Reinigung der Tyrosinase wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) durchgeführt. Die Proben wurden direkt nach dem Anionen-Austausch auf die Chromatographiesäule appliziert. In Abb. 3.16 ist das Elutionsprofil eines typischen Chromatographie-Laufs dargestellt. Wegen der einfacheren Handhabung wurde zur Lokalisierung der Tyrosinase im Folgenden nur noch diphenolisches Substrat eingesetzt.

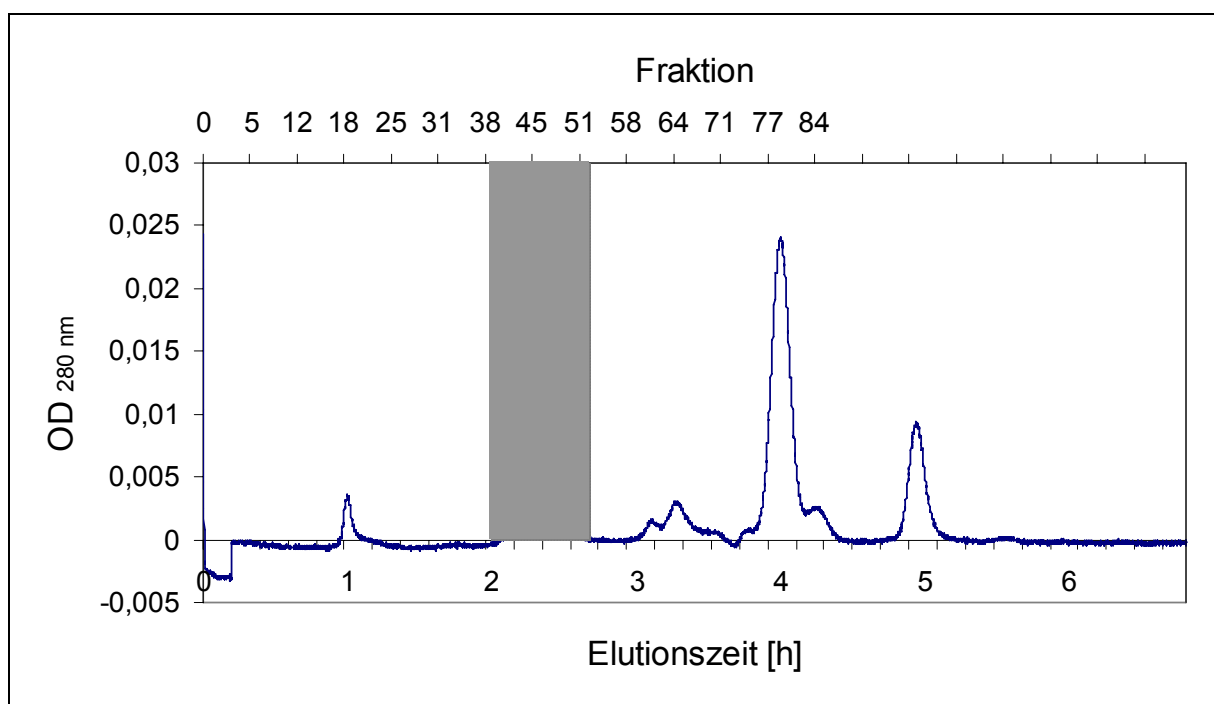


Abb. 3.16: Elutionsprofil einer SEC des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen-Austausch. Die Fraktionen mit Tyrosinase-Aktivität sind dunkel unterlegt. Der qualitative Nachweis einer Tyrosinase-Aktivität ist in Abb. 3.17 dargestellt, die quantitative Bestimmung der Aktivität ist in Abb. 3.18 wiedergegeben. Abb. 3.19 zeigt eine SDS-PAGE der Fraktionen 45 und 46, sowie der Fraktionen 61, 64 und 80.

Die Aktivität der Ausgangsprobe lag bei 14,5 U/ml vor bzw. 6,5 U/ml nach Anionen-Austausch. Eine Quantifizierung des Proteingehalts wurde nicht durchgeführt.

Das Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturfiltrats enthielt nach Anionen-Austausch mehrere Fraktionen mit deutlicher Absorption bei 280 nm. Um die tyrosinasehaltigen Fraktionen zu identifizieren, wurde die Diphenolase-Aktivität in den Fraktionen mittels eines Tropfentests ermittelt, bei dem 5 µl der Probe mit 5 µl einer 15 mM L-Dopa-Lösung inkubiert wurden (Abb. 3.17). Hierbei wurden nur die Fraktionen untersucht, bei denen im Elutionsprofil auch ein Absorptionssignal detektiert wurde, bzw. bei denen die Absorption innerhalb des entsprechenden Peaks maximal war.

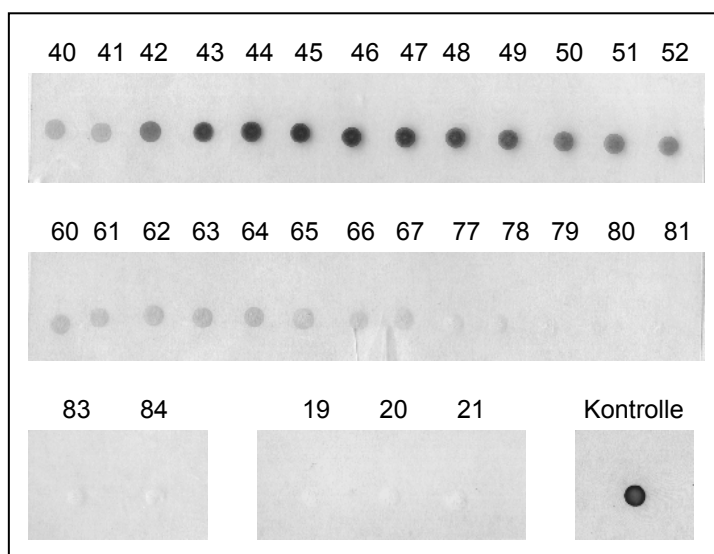


Abb. 3.17: Nachweis der Tyrosinase-Aktivität in den eluierten Fraktionen der SEC. Als Kontrolle diente die Ausgangsprobe mit einer Aktivität von 6,5 U / ml.

In den Fraktionen 40 - 67 konnte eine deutliche Diphenolase-Aktivität nachgewiesen werden, die bei den Fraktionen 45 und 46 die stärkste Farbreaktion hervorrief. Die Fraktionen 19 - 21, 60 - 67, 77 - 81, sowie 83 - 84, wiesen zwar eine starke bis sehr starke Absorption bei 280 nm auf, zeigten aber keine Tyrosinase-Aktivität. Lediglich in den Fraktionen 60 - 67 konnte noch eine geringfügige Aktivität detektiert werden. Die Aktivität in den Fraktionen 40 - 52 wurde mittels Dopachrom-Assay quantifiziert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 3.18 dargestellt.

Die Bestimmung der Diphenolase-Aktivität ergab für Fraktion 46 den höchsten Wert, wobei die Aktivität in den Fraktionen 40 - 45 stetig anstieg und in Fraktionen 47 - 52 wieder abfiel. Die Abnahme der Aktivität in den hinteren Fraktionen war jedoch weniger stark, als die Zunahme der Aktivität in den vorderen (siehe Abb. 3.18). Dieser Befund stand in Einklang mit dem asymmetrischen Peak der Tyrosinase im Elutionsprofil der SEC (siehe Abb. 3.16).

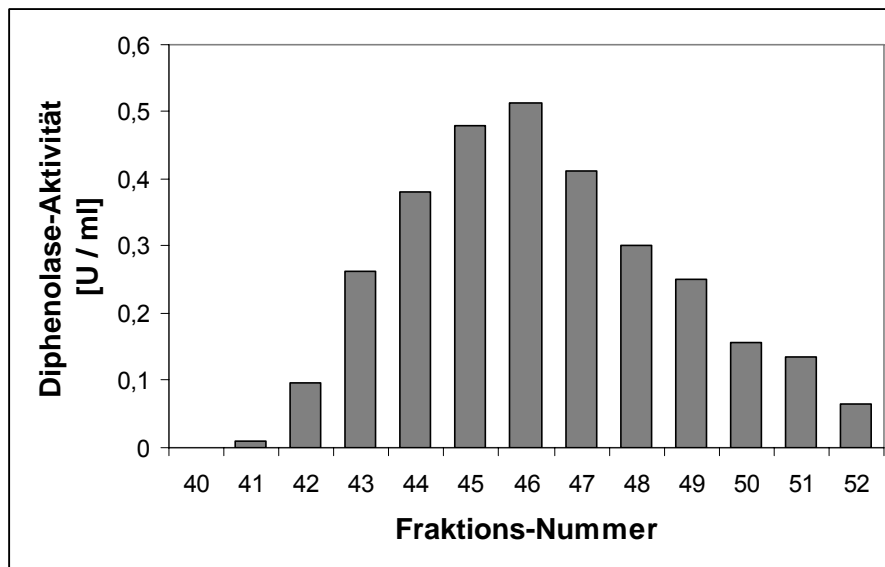


Abb. 3.18: Diphenolase-Aktivität der SEC-Fraktionen 40 - 52. Der asymmetrische Verlauf von Zunahme und Abnahme der Aktivität um das Aktivitäts-Maximum bei Fraktion 46 ist deutlich zu erkennen.

Für die Bestimmung des Proteingehalts in der Fraktion 46 wurden zwei Methoden angewandt. Durch Berechnung der Enzymkonzentration aus der Absorption bei 280 nm unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten der *S. glaucescens* Tyrosinase wurde ein Wert von 0,52 µg/ml ermittelt. Die Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradford-Test ergab einen Wert von 1,16 µg/ml. Die beiden Werte unterschieden sich recht deutlich, wodurch die resultierenden spezifischen Aktivitäten mit 981 U/mg bzw. 440 U/mg entsprechend stark voneinander abwichen. Der augenscheinlich sehr geringe Proteingehalt der Proben verhinderte somit eine verlässliche Aussage über die tatsächliche Menge. Auch die relative Reinheit des Enzyms konnte anhand der spezifischen Aktivität nur grob abgeschätzt werden.

Mittels SDS-PAGE konnte in den Fraktionen 45 und 46 jedoch lediglich eine einzelne Proteinbande nachgewiesen werden, deren Molekulargewicht dem einer monomeren Tyrosinase entsprach. Die Fraktionen 61, 64 und 80, die eine starke Absorption bei 280 nm aufwiesen, beinhalteten scheinbar keine Proteine (Abb. 3.19).

Die Absorptionsspektren der Fraktionen 46 und 80 wiesen zudem wesentliche Unterschiede auf (Abb. 3.20). Während Fraktion 46 mit der scheinbar reinen Tyrosinase ein deutlich ausgeprägtes Absorptions-Maximum bei etwa 280 nm aufwies, lag das der Fraktion 80 bei 265 nm. Dies spricht dafür, dass im Gegensatz zu den tyrosinasehaltigen Fraktionen, die übrigen SEC-Fraktionen kein Protein, sondern andere Bestandteile, wie z. B. polyphenolische Pigment-Komplexe enthielten (vgl. Abb. 3.15).

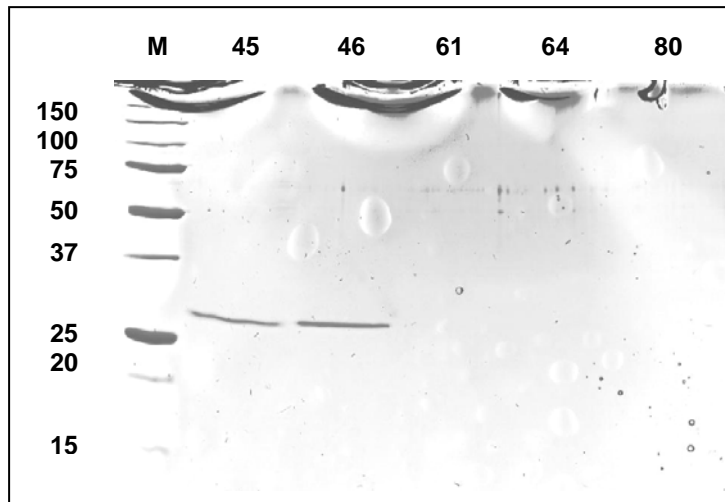


Abb. 3.19: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der SEC-Fraktionen 45, 46, 61, 64 und 80.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

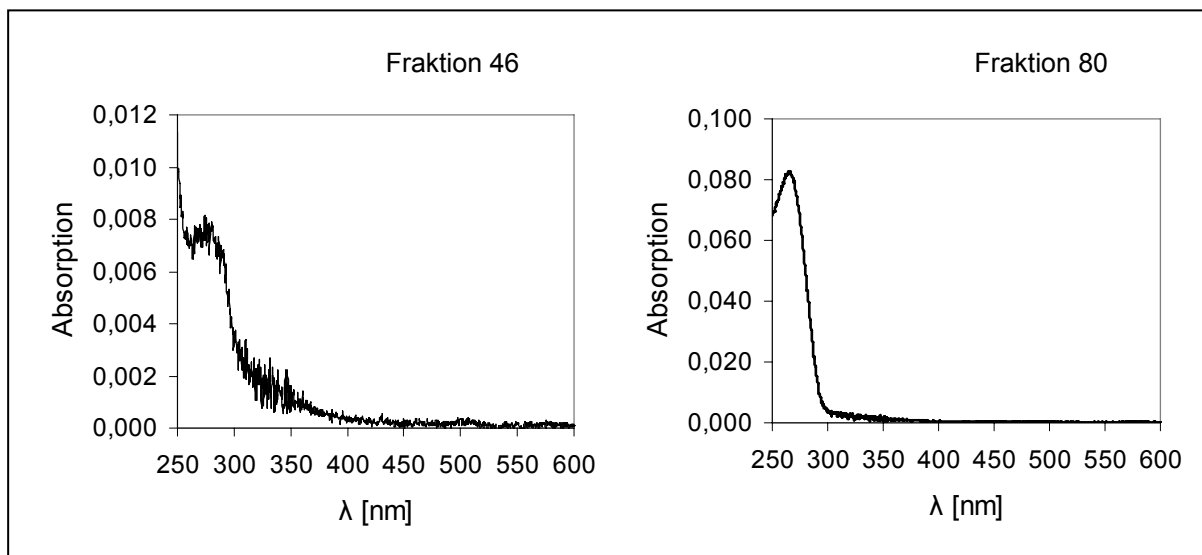


Abb. 3.20: Absorptionsspektren der SEC-Fraktionen 46 und 80. Das Absorptions-Maximum der tyrosinasehaltigen Fraktion 46 (links) liegt bei 280 nm, das der offenbar nicht proteinhaltigen Fraktion 80 liegt bei 265 nm.

In einem weiteren Schritt wurden die tyrosinasehaltigen SEC-Fraktionen vereint und mittels Gefriertrocknung aufkonzentriert. Das Ergebnis einer solchen Einengung ist im Folgenden exemplarisch dargestellt.

Die tyrosinasehaltigen Fraktionen aus drei SEC-Läufen wurden vereint, wodurch 25 ml Probe mit einer Diphenolase-Aktivität von 0,17 U/ml erhalten wurden. Die durchschnittliche Aktivität der Ausgangsproben betrug 4,82 U/ml, das aufgetragene Volumen in den drei Läufen betrug insgesamt 7 ml. Somit konnten nach der SEC von den ursprünglich 33,6 U Gesamtaktivität etwa 13 % (4,3 U) gewonnen werden. Nach der Gefriertrocknung betrug das Probenvolumen 1,5 ml, die Diphenolase-Aktivität lag bei 1,82 U/ml. Somit blieben noch 8 % (2,7 U) der für diesen Reinigungsschritt eingesetzten Gesamt-Aktivität erhalten.

Abb. 3.21 zeigt das Absorptionsspektrum der gefriergetrockneten SEC-Fractionen. Zur besseren Darstellung wurde auch hier der Streuungsanteil rechnerisch eliminiert. Neben einem Absorptionsmaximum bei 280 nm ist ein weiteres Maximum bei 315 nm zu erkennen. Sowohl die vorliegende Streuung in den Proben, als auch die Absorption im Bereich 300 - 330 nm deuten darauf hin, dass das Protein immer noch Kontaminationen mit Pigmentresten aufweist. Insbesondere der Absorptions-Peak um 315 nm ist hierfür ein Indiz, da das Absorptionsmaximum von Chinonen im Bereich von 305 nm liegt [193]. Dass die Streuung zum Teil auf eine Teildenaturierung der Tyrosinase zurückzuführen ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

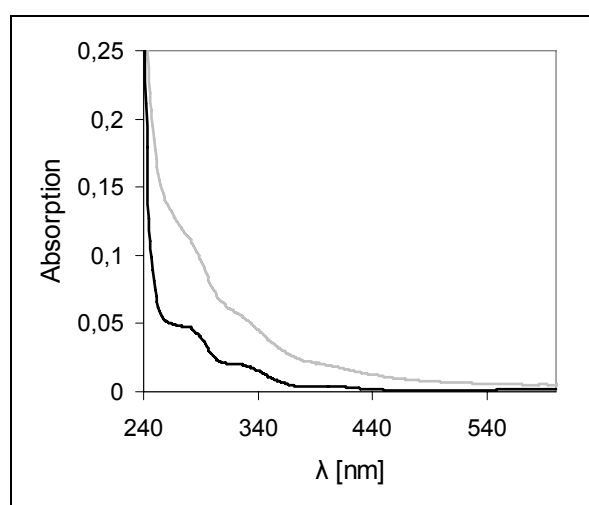


Abb. 3.21: Absorptionsspektrum der gereinigten Tyrosinase. Die Probe wurde mittels Anionen-Austausch und SEC präpariert und mittels Gefriertrocknung konzentriert. Dargestellt ist sowohl das gemessene Spektrum (grau), als auch der um den Streuungsanteil korrigierte Verlauf (schwarz). Neben der für Proteine typischen Absorption bei 280 nm ist eine weitere Absorptionsbande bei 315 nm zu erkennen, die auf Pigmentverunreinigungen hindeutet.

Eine apparente Reinheit im Hinblick auf die Gelelektrophorese konnte zwar erreicht werden, jedoch zeigte sich spektroskopisch nicht das erwartete Bild.

In weiteren Präparationsansätzen wurde auf das bereits in Kapitel 3.1.2.3 erwähnte unlösliche Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung zurückgegriffen. Der Verlauf einer SEC mit Material aus dieser Probe ist im Folgenden kurz dargestellt. Die Diphenolase-Aktivität der Ausgangsprobe lag bei 52,2 U/ml, nach Anionen-Austausch betrug der Wert noch 28,2 U/ml (54 %). Das Probenvolumen belief sich auf 4 ml (112,8 U Gesamtaktivität), die Fraktionsgröße wurde von 1,5 ml auf 2 ml erhöht. Abb. 3.22 zeigt das Elutionsprofil der Chromatographie.

Im Verlauf der Chromatographie wurden neben der Tyrosinase auch hier einige weitere Fraktionen mit zum Teil erheblicher Absorption bei 280 nm eluiert, wobei das Profil von dem der vorangegangenen Proben leicht abwich. Diese Abweichungen betrafen jedoch nur den Bereich der letzten aufgefangenen Proben, in denen über-

wiegend Pigmente vermutet wurden und können vermutlich auf die unterschiedliche Konsistenz der eingesetzten Proben zurückgeführt werden.

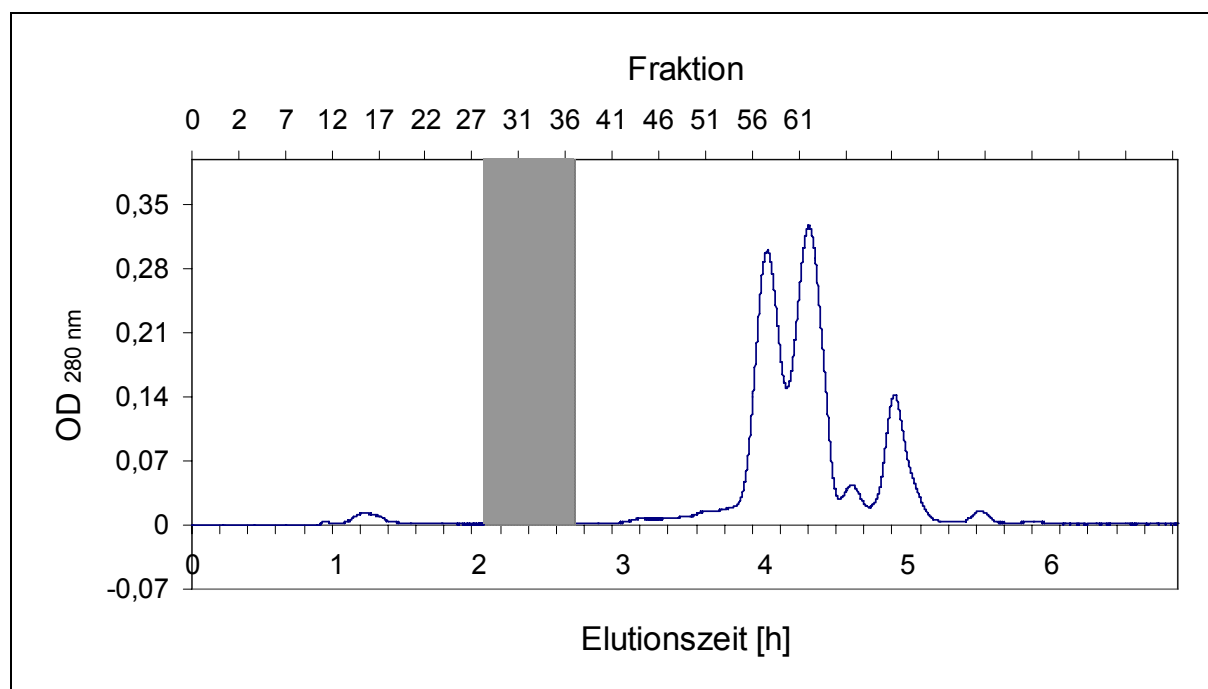


Abb. 3.22: Elutionsprofil einer SEC des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen-Austausch. Als Ausgangsprobe diente ein Filtrat des unlöslichen Pellets der Ammoniumsulfat-Fällung. Die Fraktionen mit Tyrosinase-Aktivität sind dunkel unterlegt. Die starke Absorption in den später eluierten Fraktionen ist auf chinonhaltige Pigmente, nicht auf Protein zurückzuführen.

Die Diphenolase-Aktivität in den tyrosinasehaltigen Fraktionen 29 - 37 wurde mittels Dopachrom-Assay ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 3.7 dargestellt. Die Abschätzung des Proteingehaltes in den Fraktionen 32 - 34 erfolgte aus der Absorption bei 280 nm.

Fraktion	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	0,12	1,12	3,75	6,21	5,90	4,55	2,70	1,41	0,58
Proteingehalt [µg/ml]	n. b.	n. b.	n. b.	16,9	15,4	12,4	n. b.	n. b.	n. b.
Spezifische Aktivität [U/mg]	-	-	-	368	384	368	-	-	-

Tab. 3.7: Diphenolase-Aktivität und Proteingehalt der SEC-Fraktionen 29 - 37. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte photometrisch mit 15 mM L-Dopa in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0 bei 25 °C. Die Abschätzung des Proteingehalts wurde anhand der Absorption bei 280 nm durchgeführt.

In Fraktion 32 konnte die höchste Tyrosinase-Aktivität festgestellt werden. Ähnlich wie bereits im vorangegangenen Ansatz zeigten sich hier ein starker Anstieg in der Aktivität von Fraktion 29 - 31 und ein weniger starker Abfall in der Aktivität von Fraktion 33 - 37. Mit den errechneten Werten für den Proteingehalt wurden sehr ähnliche Werte für die spezifische Aktivität ermittelt. Diese lag mit 373 ± 9 U/mg sehr nahe an dem Wert 440 U/mg, der mit dieser Methode bereits im vorangegangenen Ansatz für die Fraktion 46 ermittelt wurde.

Im Folgenden wurden die tyrosinasehaltigen SEC-Fractionen vereint und mittels Zentrifugalfiltration aufkonzentriert. Die Probe wies eine Diphenolase-Aktivität von 26,8 U/ml in einem Volumen von 4,5 ml auf. Sie enthielt mit 93,9 U noch etwa 83 % der eingesetzten Gesamtaktivität. Abb. 3.23 zeigt die Absorptionsspektren der SEC-Fraktion 32 und des Konzentrats der tyrosinasehaltigen Fractionen.

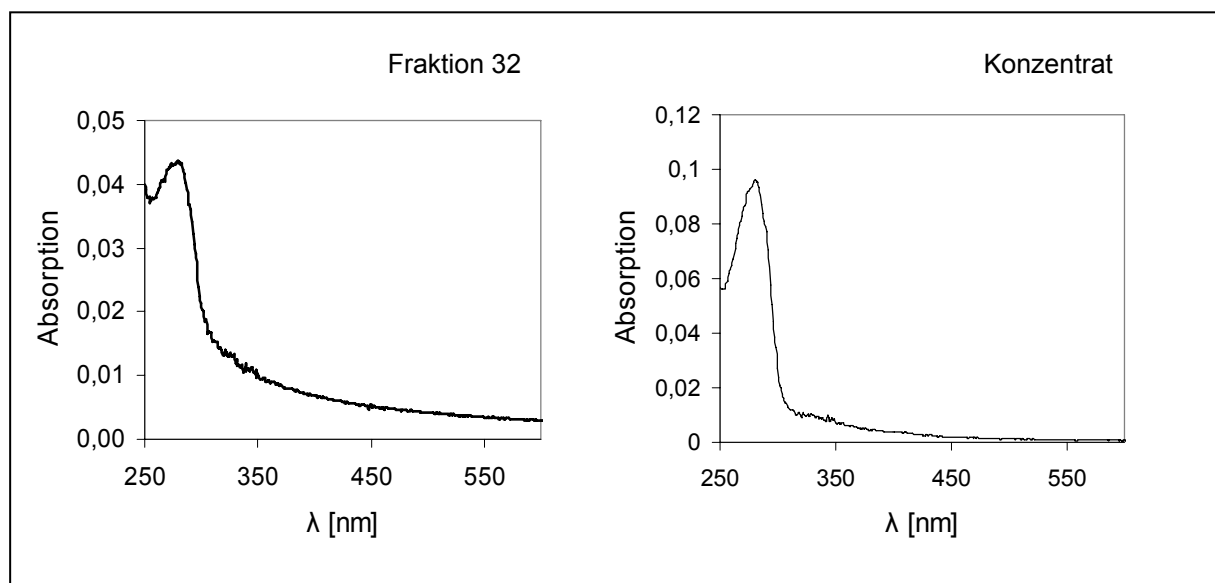


Abb. 3.23: Absorptionsspektren der SEC-Fractionen 32 und des Konzentrats der tyrosinasehaltigen SEC-Fractionen 29 - 37. Das schwache Absorptionssignal bei 340 nm könnte ein Hinweis auf das Vorliegen oxygenierter Kupferzentren sein, da die Tyrosinase nach der Präparation nicht vollständig in der *met*-Form vorliegt.

Die Isolierung und Reinigung der Tyrosinase aus dem Überstand einer *S. antibioticus*-Kultur mittels Ammoniumsulfat-Fällung, Anionen-Austausch und Größenausschluss-Chromatographie erbrachte insgesamt sehr zufrieden stellende Resultate.

Für spektroskopische Methoden im UV/Vis-Bereich, sowie für Untersuchungen der Kinetik der katalysierten Reaktionen konnten sehr große Mengen an reinem Probenmaterial in nativer Form gewonnen werden. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in

Tab. 3.8 noch einmal hinsichtlich der Ausbeuten zusammengefasst dargestellt. Es ist zu beachten, dass von den 250 ml bzw. 100 ml Probe nach Anionen-Austausch nur maximal 4 ml für die SEC eingesetzt werden konnten. Dadurch kann die Ausbeute in diesem und den darauf folgenden Schritten durch Wiederholen um mindestens den Faktor 25 verbessert werden.

A	Fällung	Anionen-Austausch	SEC	Konzentrierung
Volumen [ml]	250	250	25	1,5
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	14,0 - 25,6	4,4 - 8,0 (18 - 45 %)	0,2 (ca. 1 %)	1,8 (7 - 13 %)
Proteingehalt [µg/ml]	ca. 2000	n. b.	n. b.	n. b.
Spezifische Aktivität [U/mg]	7 - 13	-	ca. 440	-
Gesamtaktivität [U]	3500 - 6400	1100 - 2000 (31%)	5 (ca. 0,1 %)	3 (ca. 0,1 %)

B	Fällung	Anionen-Austausch	SEC	Konzentrierung
Volumen [ml]	100	100	18	4,5
Diphenolase-Aktivität [U/ml]	52,2	28,2 (54 %)	5,6 (11 %)	26,8 (51 %)
Proteingehalt [µg/ml]	n. b.	n. b.	15	36,7
Spezifische Aktivität [U/mg]	-	-	370	730
Gesamtaktivität [U]	5220	2820 (54 %)	113 (2,2 %)	94 (1,8 %)

Tab. 3.8: Diphenolase-Aktivität und Proteingehalt während der Reinigung der Tyrosinase aus dem Kulturfiltrat von *S. antibioticus*. **A:** Überstand der Ammoniumsulfat-Fällung. **B:** Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung. Die Abschätzung des Proteingehalts wurde anhand der Absorption bei 280 nm durchgeführt.

3.1.3 Rekombinante Expression der Tyrosinase aus *S. antibioticus*

Parallel zu der Anreicherung der nativen Tyrosinase aus großvolumigen Kulturansätzen wurde versucht, das Enzym aus *S. antibioticus* nach einem Protokoll von Hopwood *et al.* [166] rekombinant in *S. lividans* zu exprimieren. Mit einer erfolgreichen heterologen Überexpression könnte das Kulturvolumen deutlich reduziert und zur Gewinnung ausreichender Mengen des Enzyms die Kultivierung im Platz- und Kosten sparenden Labor-Maßstab durchgeführt werden. Zudem wäre eine Grundlage für weiterführende Mutagenese-Experimente geschaffen.

3.1.3.1 Transformation von *S. lividans*

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.4.5 und 2.4.6 beschrieben. Die Temperatur während der Protoplastierung (70 min) betrug 23 °C. Die Transformation erfolgte zum einen mit 200 ml Protoplasten-Suspension für 40 min (A) und zum anderen mit 300 µl Protoplasten-Suspension für 30 min (B) auf Eis. Beide Transformations-Ansätze wurden auf jeweils 3 R2YE-Platten verteilt und 15 h bei 28 °C inkubiert. Nach Überschichten der regenerierten Ansätze mit 200 µl Thiostrepton-Lösung, wurden diese weiter bei 28 °C inkubiert.

3.1.3.2 Selektion der Transformanten

Nach 72 h konnten drei potentielle Transformanten auf einer der R2YE-Platten des Ansatzes A entdeckt werden. Weitere 24 h später zeigten sich auch auf einer weiteren Platte des Ansatzes A und auf einer Platte des Ansatzes B Kolonien.

Zwei der der Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in je 10 ml HA-Medium mit 50 µl/ml Thiostrepton überimpft. Drei Kolonien wurden auf HA-Platten mit 50 µl/ml Thiostrepton ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank bei 28 °C, die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 200 Upm.

Zur eindeutigen Identifizierung der selektionierten Transformanten wurden diese neben *S. antibioticus* und nicht-transformiertem *S. lividans* auf verschiedenen Agar-Platten kultiviert. Hierzu wurde GYM-Medium als Nährmedium, thiostreptonhaltiges HA-Medium zur Selektion der Transformanten, sowie tyrosinhaltiges AGMIT-Medium

zum Nachweis der Tyrosinase-Expression verwendet. Abb. 3.24 zeigt das Wachstum der drei Stämme auf den genannten drei Medien.

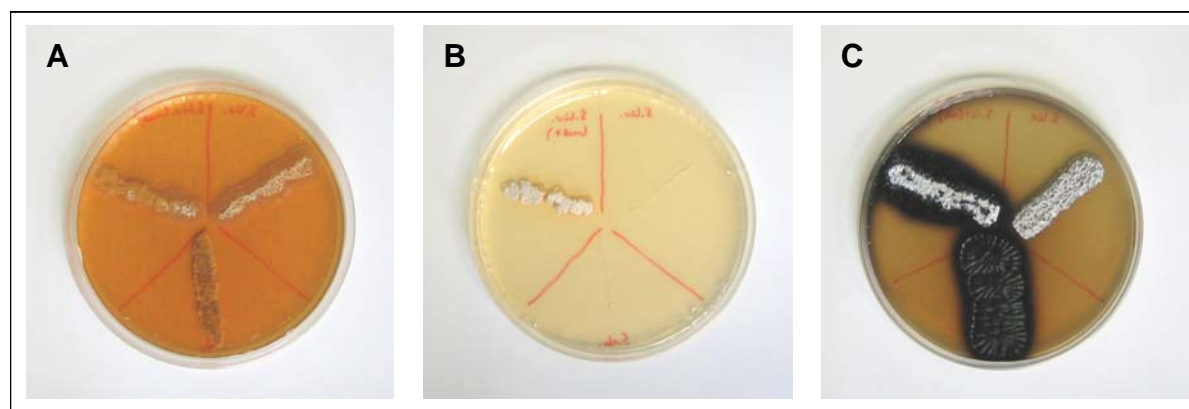


Abb. 3.24: Wachstum von *S. lividans* nach Transformation (links), *S. antibioticus* (unten), sowie nicht-transformiertem *S. lividans* (rechts). **A:** GYM-Medium. Alle drei Stämme zeigten bereits nach drei Tagen ausgeprägtes Zellwachstum entlang des Impfstrichs. **B:** HA-Medium mit 50 µg/ml Thiostrepton. Nach sieben Tagen ist lediglich die transformierte *S. lividans*-Kultur zu sehen, die beiden übrigen Stämme zeigten aufgrund fehlender Resistenz keinerlei Wachstum. **C:** AGMIT-Medium mit 1 mg/ml L-Tyrosin. Bereits nach drei Tagen konnte ähnlich starkes Zellwachstum wie auf der GYM-Platte festgestellt werden. Die Melaninbildung begann in Form eines Pigmenthofes um die Zellen bei *S. antibioticus* unmittelbar, im Fall der transformierten *S. lividans*-Kultur jedoch erst nach etwa 14 Tagen. Somit ist zum Zeitpunkt der Dokumentation die Melaninbildung bei *S. antibioticus* bereits deutlich stärker ausgeprägt und erstreckt sich über die gesamte Zellmasse.

Die Tatsache, dass die transformierten *S. lividans*-Zellen als einzige auf dem thiostrreptonhaltigen HA-Medium wuchsen, spricht dafür, dass die Transformation erfolgreich verlaufen ist. Die im Vergleich zu *S. antibioticus* verlangsamte Melaninbildung spricht allerdings nicht dafür, dass das gewählte Expressionssystem für die Anreicherung der Tyrosinase geeignet ist.

3.1.3.3 Zellaufschluss

Zur Produktion der Tyrosinase wurde eine 72 h alte 10 ml-Flüssigkultur der transformierten *S. lividans*-Zellen in 700 ml thiostrreptonhaltiges AGMIT-Medium überführt und bei Raumtemperatur mit 200 Upm auf dem Schüttler inkubiert.

Nach 72 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und auf zwei 50 ml-Kunststoffröhrchen verteilt. Beide Proben wurden mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,5 auf ein Endvolumen von ca. 10 ml aufgefüllt und mittels Ultraschall-Sonde aufgeschlossen, wobei einem der Ansätze 100 µl PMSF, ein Serin-Proteasen-Inhibitor, zugesetzt wurde.

Ein Schnell-Test auf Monophenol-Hydroxylase- und Diphenol-Oxygenase-Aktivität mittels MBTH-Tüpfeltest verlief sowohl in den Zell-Lysaten, als auch im Kulturfiltrat negativ. Da die Tyrosinase bei der heterologen, rekombinanten Überexpression in *S. lividans* fast ausschließlich intrazellulär vorliegt [91], war der Nachweis einer Tyrosinase-Aktivität im Kulturfiltrat nicht zu erwarten. Abb. 3.25 zeigt eine denaturierende SDS-PAGE der Zell-Lysate in An- und Abwesenheit von PMSF. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben konnte nicht festgestellt werden.

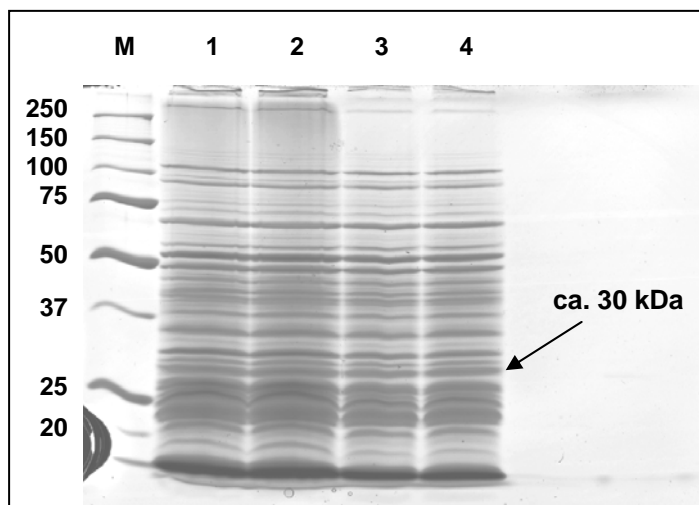


Abb. 3.25: Denaturierende SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Zell-Lysate ohne (1 & 2) und mit PMSF (3 & 4).

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

Anhand des verwendeten Proteinstandards wurde mit der Auswertungs-Software der Gel-Dokumentationseinheit das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden ermittelt. Zwar konnte bei ca. 30,2 kDa eine deutliche Bande gefunden werden, inwieweit es sich hierbei zumindest anteilig um die Tyrosinase handelte, blieb jedoch unklar. Eine weitere Aufreinigung und Anreicherung des Zielproteins erschien daher nicht sinnvoll.

Die heterologe, rekombinante Überexpression der *S. antibioticus*-Tyrosinase in *S. lividans* mit Hilfe des Plasmid-Vektors pIJ702 scheint für die Anreicherung des Enzyms in nennenswerten Mengen ungeeignet zu sein. Für weiterführende Versuche wäre die Verwendung alternativer Wirte, wie z. B. *S. antibioticus* im Rahmen einer homologen, rekombinanten Überexpression in Erwägung zu ziehen [191]. Auch der Einsatz modifizierter Plasmide könnte die Enzymausbeute deutlich erhöhen [91, 191]. Der hierfür am ehesten geeignete Plasmid-Vektor pIJ703 ist jedoch kommerziell nicht erhältlich und müsste zuvor synthetisiert werden. Die für diese Arbeiten erforderlichen Ressourcen wurden zwar bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft beantragt, leider jedoch nicht bewilligt.

Somit bleibt festzuhalten, dass für funktionelle und strukturelle Untersuchungen an der Tyrosinase aus *S. antibioticus* im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die Anreicherung des nativen Enzyms aus einem verhältnismäßig großen Kulturvolumen erfolgte. Diese lieferte jedoch bereits im ersten Ansatz genug Material für eine Vielzahl umfassender Untersuchungen.

3.2 Physiko-chemische Charakterisierung der Tyrosinase aus *S. antibioticus*

Nach der Isolierung und Aufreinigung der Tyrosinase wurde das native Enzym zunächst elektrophoretisch charakterisiert und nach Transfer auf eine PVDF-Membran durch N-terminale Sequenzierung und anschließendem Datenbankabgleich identifiziert. Zudem wurden von dem gereinigten Enzym Absorptions- und Fluoreszenz Spektren aufgenommen.

3.2.1 Denaturierende SDS-PAGE und analytische IEF

Mit der SDS-PAGE (Abb. 3.26 A) konnte in den Proben eine einzige Proteinbande nachgewiesen werden, deren Molekulargewicht mit ca. 30 kDa dem einer monomeren Tyrosinase entsprach. In der analytischen IEF (Abb. 3.26 B) wurde ebenfalls nur eine Proteinbande detektiert, deren isoelektrischer Punkt bei ca. 9,5 lag und mit dem für die *S. antibioticus*-Tyrosinase bereits ermittelten Wert übereinstimmte (siehe Abb. 3.6, Kapitel 3.1.1.3). Nach der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel in zwei Teile zerschnitten und beide Teile unterschiedlichen Färbungen unterzogen. Neben einer Proteinfärbung mit Kristallviolett erfolgte eine Aktivitätsfärbung mit 5 mM Tyramin-Lösung zum Nachweis einer Monophenolase-Aktivität.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE und der analytischen IEF deuteten bereits auf das Vorliegen einer reinen Tyrosinase hin. Dieser Befund wurde durch den positiven Nachweis einer Monophenolase-Aktivität nach der isoelektrischen Fokussierung bestätigt. Dass die *S. antibioticus*-Tyrosinase als Monomer vorliegt, kann aus bisherigen Studien an anderen, homologen *Streptomyces*-Tyrosinasen gefolgert werden. Die monomere Struktur der *S. glaucescens*- und *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase wurde dort mittels analytischer Ultrazentrifugation und Gelfiltration belegt [37, 97].

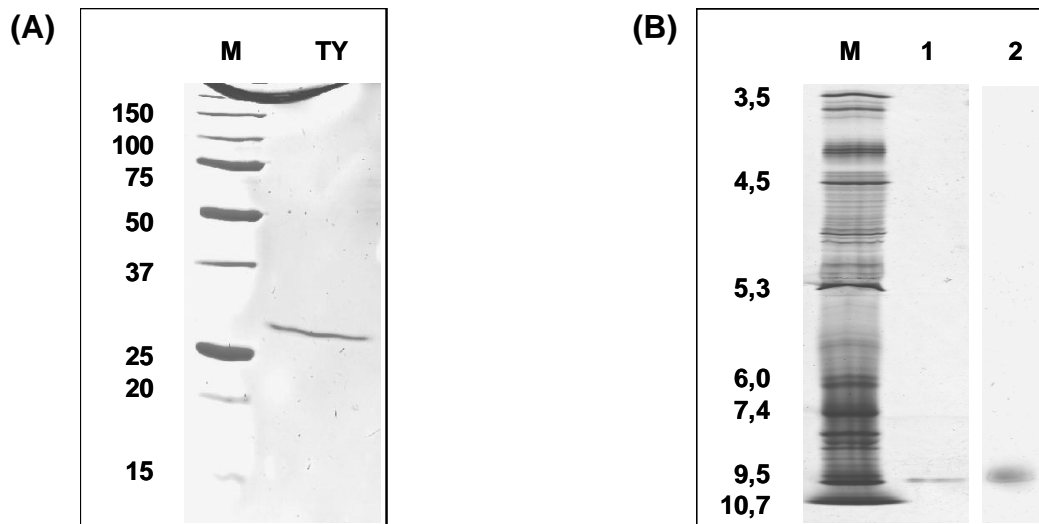


Abb. 3.26: SDS-PAGE (A) und analytische IEF (B) der Tyrosinase aus *S. antibioticus*.

(A): TY: Tyrosinase aus *S. antibioticus* nach der Aufreinigung.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

(B): 1: Tyrosinase aus *S. antibioticus* nach Proteinfärbung mit Kristallviolett.

2: Tyrosinase aus *S. antibioticus* nach Aktivitätsfärbung mit 5 mM Tyramin.

M (IEF-Marker): Serva Liquid Mix 3 - 10 (Serva, Heidelberg). Die isoelektrischen Punkte der Markerproteine sind in pH-Einheiten angegeben.

Das ermittelte Molekulargewicht des monomeren Enzyms liegt bei ca. 30 kDa, der isoelektrische Punkt liegt bei ca. 9,5.

3.2.2 N-terminale Sequenzierung

Zur zweifelsfreien Identifizierung des gereinigten Enzyms wurde eine Probe nach denaturierender Gelelektrophorese auf PVDF-Membranen transferiert (Abb. 3.27) und mittels Edmann-Abbau und einer HPLC-Analyse der abgespaltenen Aminosäurederivate N-terminal ansequenziert.

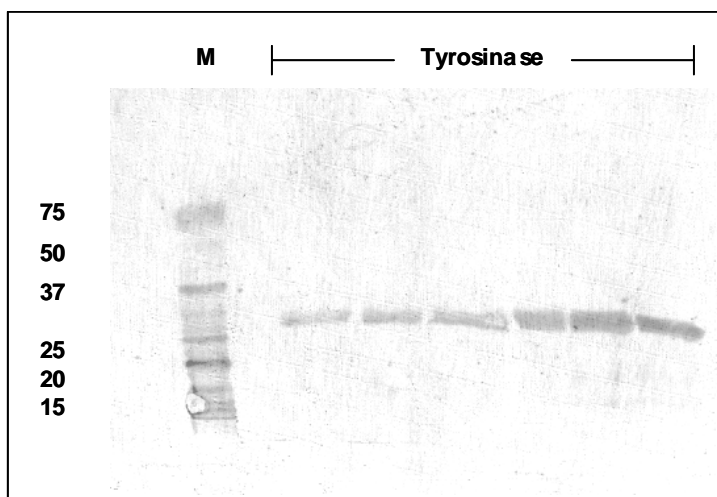


Abb. 3.27: Western Blot der Tyrosinase auf eine PVDF-Membran nach denaturierender Gelelektrophorese. Der Elektrottransfer erfolgte mittels Tank-Blot, die Färbung der transferierten Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

Als Resultat dieser Sequenzierung konnten die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren bestimmt werden, die zu 100 % mit dem N-Terminus der bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit der Zugangsnummer P07524 (früher B23971) hinterlegten Sequenz der *S. antibioticus*-Tyrosinase übereinstimmen. Die Gesamtsequenz der Tyrosinase ist im Folgenden wieder gegeben, die 20 N-terminalen Aminosäuren ohne das initiale Methionin sind rot hervor gehoben.

Primärsequenz der *S. antibioticus* Tyrosinase (P07524):

MTVRKNQASLTAEEKRRFVAALLELKRTGRYDAFVTTHNAFILGDTDNGERTGHRSPS
FLPWHRRLLEFERALQSVDAVALPYWDWSADRSTRSSLWAPDFLGGTGRSRDGQVM
DGPFAASAGNWPINVRVDGRTFLRRALGAGVSELPTRAEVDSVLAMATYDMAPWNSGS
DGFRNHLEGWRGVNLHNRVHVWVGGQMATGVSPNDPVFWLHHAYIDKLWAEWQRRHPS
SPYLPGGGTPNVVDLNETMKPWNDTTPAALLDHTRHYTFDV

3.2.3 UV/VIS- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Zur näheren Betrachtung des isolierten Enzyms wurden von diesem sowohl Absorptions-, als auch Fluoreszenzspektren aufgenommen.

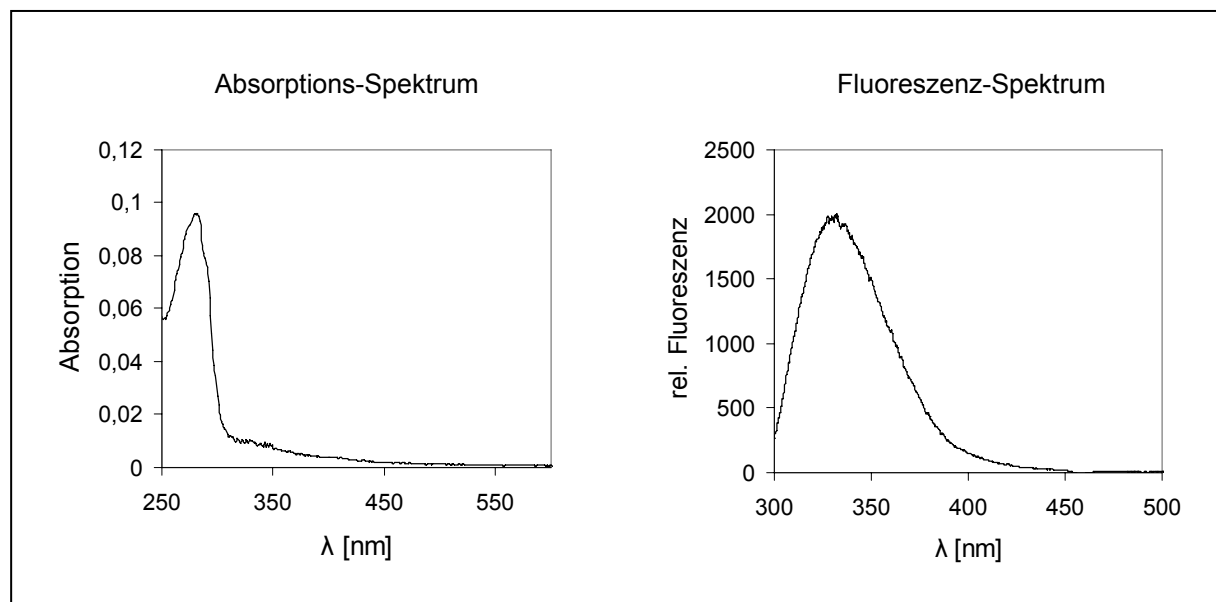


Abb. 3.28: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Tyrosinase aus *S. antibioticus* in 25 mM PIPES-Puffer (pH 7,0). Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 280 nm, die Fluoreszenz-Intensität ist in relativen Einheiten angegeben.

Das Absorptionsspektrum der Tyrosinase besitzt einen Peak mit einem Maximum bei 280 nm, das durch die aromatischen Aminosäuren des Enzyms hervorgerufen wird.

Zwischen 310 und 450 nm steigt das Absorptionssignal zu niedrigeren Wellenlängen hin geringfügig an. Jedoch waren weder bei 345 nm, noch bei 590 - 600 nm ausgeprägte Absorptionssignale erkennbar, die durch einen $O_2^{2-} \rightarrow Cu(II)$ Charge transfer Übergang an oxygenierten Typ-3-Kupferzentren hervorgerufen werden [38, 63]. Somit wurde die bereits getroffenen Annahme, dass die Tyrosinase nach der Präparation überwiegend in der *met*-Form vorliegt, bestätigt [63, 64, 191].

Das Emissions-Fluoreszenzspektrum der Tyrosinase ist typisch für ein Protein, das die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin enthält. Das Emissions-Maximum liegt nach Anregung der Fluoreszenz mit Licht der Wellenlänge 280 nm bei 332 nm.

3.3 Homologie-Modell der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*

Um ein dreidimensionales Abbild der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* zu erhalten, wurde ein Homologie-Modell auf der Basis einer bekannten Röntgenstruktur erstellt. Zum Zeitpunkt der dargestellten Arbeiten war die einzig verfügbare Röntgenstruktur eines Proteins mit Typ-3-Kupferzentrum neben einigen Hämocyanin-Strukturen, die der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *Ipomoea batatas*. Wegen ihrer katalytischen Aktivität und ihres Molekulargewichts wurde die von Klambunde *et al.* 1998 [35] gelöste Struktur der *met*-Form (NCBI-Zugangsnummer 1BT1) als Vorlagestruktur (Template) herangezogen. Die Aminosäure-Sequenz der *S. antibioticus*-Tyrosinase besitzt eine Identität von nur 26 % und eine Homologie von 36 % mit der Sequenz der Catecholoxidase. Diese Werte sind für ein verlässliches Homologie-Modell zwar grenzwertig aber dennoch ausreichend, da erwartet werden konnte, dass zumindest der Bereich des aktiven Zentrums sehr ähnlich aufgebaut ist. Die Peripherie des Enzyms wurde hierbei zwar ebenfalls modelliert, die strukturelle Analyse beschränkte sich jedoch auf die Umgebung des aktiven Zentrums.

Nach Erstellung und Diskussion von Sequenz-Alignments wurde die Homologisierung durchgeführt. Das Haupt-Augenmerk lag hierbei nicht nur auf den Positionen der Kupfer-ligandierenden Histidine, sondern auch auf der Lage von Glycin 204 in der *S. antibioticus*-Tyrosinase, da diese Aminosäure im Alignment dem Phenylalanin 261 der *I. batatas*-Catecholoxidase gegenübersteht.

Phenylalanin 261 limitiert in der Catecholoxidase offenbar den Zugang ins aktive Zentrum, wodurch sich die eingeschränkte katalytische Aktivität gegenüber der Tyrosinase erklären ließe [44].

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *
1BT1 : APIQAPEISKCVVPPADLPPGAVVDNCCPPVASNIVDYKLPVTTMKVRPAAHMTDKDAIAKFAKAVELMKALPADDPRNFYQQALVHCA : 90
SabTY : -----MTVRKNQASLTAEEKRRFVAALLELKR-----GRYDAFVTTTHNA : 40

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
1BT1 : YCNGGYDQVNFDPQEIQVHNSWLFPPFHRWYLYFYERILGKLGIDPSFGLPFQWWDNPGGMVLPDFLNDSTSSLYDSMRNQSHLPPVVVD : 180
SabTY : FILGDTDN-----ERTGHRSPSFLPWRRRFLLEFERALQSVDA--SVALPYWDWSADRSTRSSLWAPDFLGGTGRSRDQVMDGPFAAS : 123

      *      200      *      220      *      240      *      260      *
1BT1 : LGYNGADTDVTDQQRITDNLALMYKQVMTNAGTAEFLGKAYRAGDAPSPG-----AGSIETSPIPIHRWVGDPRNTNMDMGNYYS : 263
SabTY : AGNWPINVRVDGRTFLRRALGAGVSELPTRAEVDVSLAMATYDMAPWNSGSDGFRNHLEGRGVNLENRVRVHWVGG-----QMATGVVS : 206

      280      *      300      *      320      *      340
1BT1 : AGRDIAFYCHHSNVDRMTIQQQLARDYTDSDWLNATFLFYDENGQAVKVRIGDSLNDQKMGYKYAKTPLPWL : 336
SabTY : -PMDPVFWLHHAYIDKLWAEWQ---RRHPSPYLPGGGTPNVVDLNETMKPWMDTTPAALLDHTRHHTFDV-- : 273

```

Abb. 3.29: Sequenz-Alignment der *S. antibioticus*-Tyrosinase (SabTY) und der *I. batatas*-Catecholoxidase (1BT1). Die Kupferligandierenden Histidine sind blau unterlegt, Glycin 204 und das korrespondierende Phenylalanin 261 sind orange unterlegt.

Zunächst wurde das Alignment für die Homologisierung manuell modifiziert und die Sekundärstruktur-Elemente der *I. batatas*-Catecholoxidase als zusätzliche Alignment-Parameter verwendet. Diese wurden dann bei dem Sequenzalignment und der nachfolgenden Generierung des Homologie-Modells der *S. antibioticus* Tyrosinase berücksichtigt.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *
1BT1 : APIQAPEISKCVVPPADLPPGAVVDNCCPPVASNIVDYKLPVTTMKVRPAAHMTDKDAIAKFAKAVELMKALPADDPRNFYQQALVHCA : 90
SabTY : -----MTVRKNQASLTAEEKRRFVAALLELKR-----GRYDAFVTTTHNA : 40

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
1BT1 : YCNGGYDQVNFDPQEIQVHNSWLFPPFHRWYLYFYERILGKLGIDPSFGLPFQWWDNPGGMVLPDFLNDSTSSLYDSMRNQSHLPP : 176
SabTY : FILGDTDN-----GERTGHRSPSFLPWRRRFLLEFERALQSV--DASVALPYWDWSADRSTRSSLWAPDFLGGTGRSRDQVMDGP : 119

      *      200      *      220      *      240      *      260      *
1BT1 : VVVDLGYNGADTDVTDQQRITDNLALMYKQVMTNAGTAEFLGKAYRAGDAPSPG-----PGACSIETSPIPIHRWVGDPRNTNMD : 257
SabTY : FAASAGNWPINVRVDGRTFLRRALGAGVSELPTRAEVDVSLAMATYDM--APWNSGSDGFRNHLEGRGVNLENRVRVHWVGG-----Q : 200

      280      *      300      *      320      *      340      *
1BT1 : MGNFYSAGFDIAFYCHHSNVDRMTIQQQLARDYTDSDWLNATFLFYDENGQAVKVRIGDSLNDQKMGYKYAKTPLPWL----- : 336
SabTY : MATGVSPMDPVFWLHHAYIDKLWAEWQ---RRHPSPYLPGGGTPNVVDLNETMKPWMDTTPAALLDHTRHHTFDV-- : 273

```

Abb. 3.30: Manuell modifiziertes Sequenz-Alignment der *S. antibioticus*-Tyrosinase (SabTY) und der *I. batatas*-Catecholoxidase (1BT1). Die Sekundärstruktur-Elemente der Catecholoxidase sind farbig markiert. Grün: Helices (α -Helices und 310-Helices); orange: β -Faltblätter.

Das Programm *Modeller* 6v2 lieferte anschließend ein Ensemble 30 hypothetischer Sätze von Raumkoordinaten für die Atome der Tyrosinase in Anlehnung an die räumliche Orientierung der im Alignment entsprechenden Aminosäuren der Catecholoxidase. Diese dreidimensionalen Modelle wurden durch Optimierung der molekularen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion erreicht, die auf Homologie basierende Parameter mit stereochemischen Parametern vereint. Abschließend erfolgte eine Überprüfung der Modelle anhand von Ensemble-Varianz, Energieverteilung und Stereochemie (Ramachandran-Plot). Da sich diese Modelle lediglich in den peripheren Bereichen abseits des aktiven Zentrums unterschieden und über diese Regionen aufgrund des mäßig geeigneten Templates keine Abschätzung erfolgen kann, konnten alle 30 Strukturen als gleichwertig angesehen werden. Die so gewonnenen Modelle konnten im pdb-Dateiformat in gängigen Visualisierungs-Programmen, wie z. B. *Rasmol* oder *SwissPDBViewer* dargestellt werden. Mittels Struktur-Alignments konnte somit auch visuell die Güte des Modells überprüft werden.

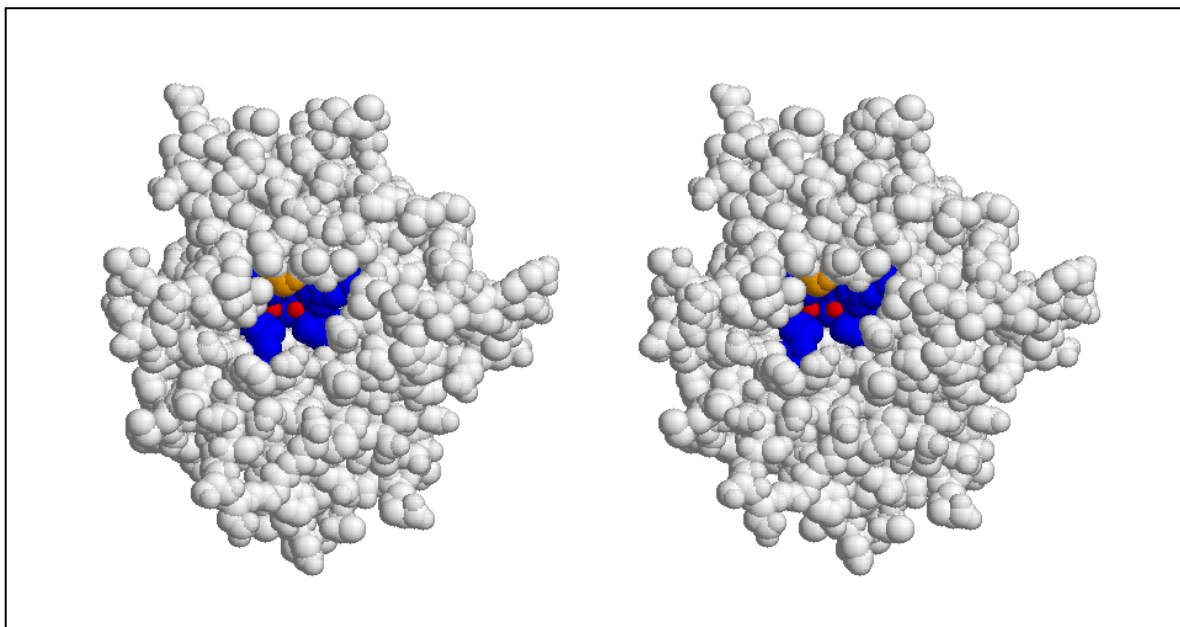


Abb. 3.31: Stereoabbildung des Homologie-Modells der *S. antibioticus*-Tyrosinase. Rot: Kupfer-Atome; blau: Kupfer-ligandierende Histidine; orange: Glycin 204. Das Cu_A -Atom befindet sich links, Cu_B rechts. Die Abbildung wurde in modifizierter Form bereits publiziert [92].

Das in Abb. 3.31 dargestellte Modell (V3-SaTyr-10.pdb) zeigt die monomere Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*. Sehr gut zu erkennen ist der völlig offenen Zugang zum aktiven Zentrum. Das Gly-204 ist tatsächlich im Bereich des aktiven Zentrums in direkter räumlicher Nachbarschaft zum Cu_A lokalisiert, wobei Cu_A frei zugänglich bleibt. In der Röntgenstruktur der Catecholoxidase ist, wie bereits erwähnt

an dieser Position das Phe-261 in einer Weise orientiert, dass es Cu_A mit seinem Phenyl-Rest förmlich abschirmt. Der direkte Vergleich der Modellstruktur mit der Struktur der *I. batatas*-Catecholoxidase offenbart eine große Ähnlichkeit (Abb. 3.32a), wobei die vorher festgelegten räumlichen Randbedingungen in Übereinstimmung mit Energieverteilung und Stereochemie erfüllt wurden. Das *4- α -helix-bundle*, in das die Kupfer-Atome eingebettet sind, sowie das rückseitig orientierte β -Faltblatt sind im Modell derart orientiert, dass sie fast deckungsgleich mit der Catecholoxidase angeordnet sind. Die um 63 Aminosäuren längere Catecholoxidase verfügt über eine periphere β -Faltblatt-Struktur, die der Tyrosinase hingegen fehlt.

Einige Monate nach dem Erstellen der Modellstruktur der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde von Matoba *et al.* mit der Kristallstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase die erste experimentell gelöste Struktur einer Tyrosinase überhaupt veröffentlicht [36]. Diese Tyrosinase weist gegenüber der Tyrosinase aus *S. antibioticus* eine Sequenzhomologie von 91 % und eine Sequenzidentität von 82 % auf. Bei einem Vergleich des Homologie-Modells mit der Struktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase in der *met*-Form (NCBI-Zugangsnummer 2AHK) zeigen sich weite Bereiche mit sehr großer Übereinstimmung (Abb. 3.32b) und das, obwohl das Modell der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit einem Protein als Template erstellt wurde, das nur 26 % Sequenzidentität mit dem Zielmolekül aufweist. Aus diesem Befund lässt sich ableiten, dass das Faltungsmotiv in dieser Proteinfamilie sehr stark konserviert ist.

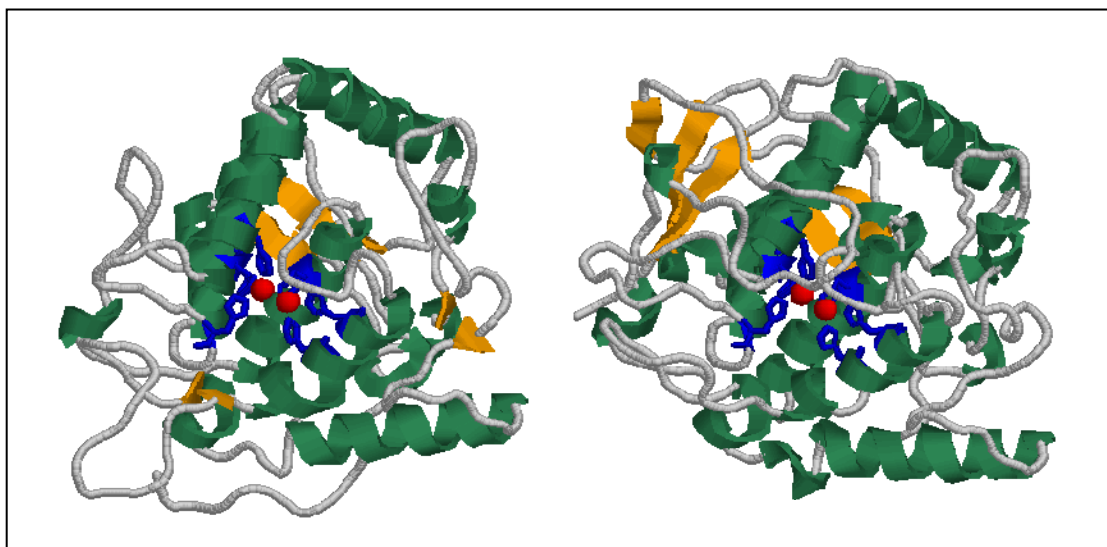


Abb. 3.32a: Homologie-Modell der *S. antibioticus*-Tyrosinase (V3-SaTyr-10, links) und Röntgenstruktur der *I. batatas*-Catecholoxidase (1BT1, rechts). Rot: Kupfer-Atome; blau: Kupferligandierende Histidine; grün: Helices (α -Helices und 310-Helices); orange: β -Faltblätter. Die Sequenzidentität liegt bei 26 %, die Sequenzhomologie bei 36 %.

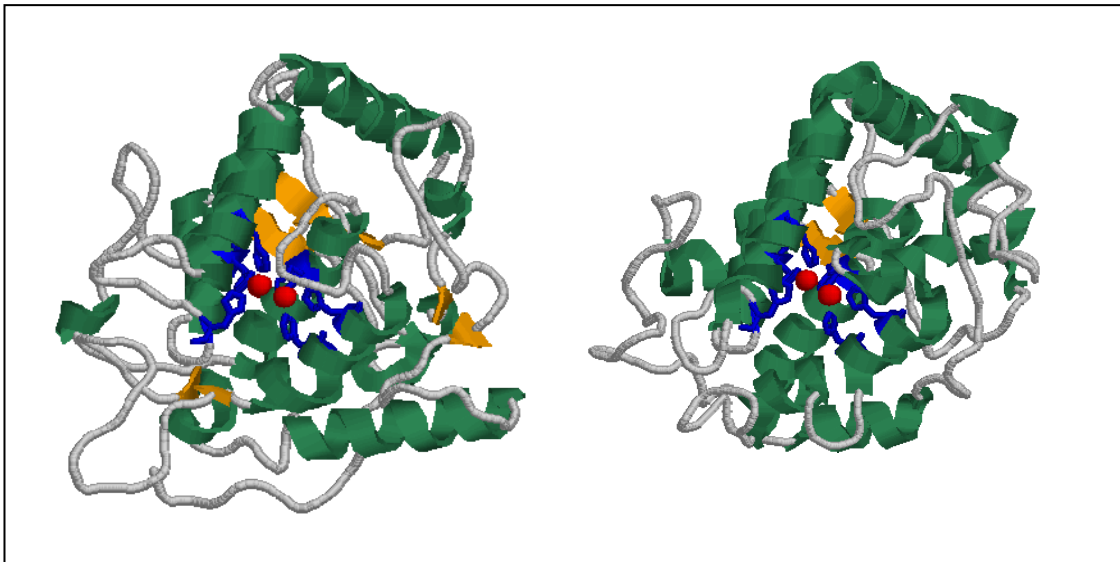


Abb. 3.32b: Homologie-Modell der *S. antibioticus*-Tyrosinase (V3-SaTyr-10, links) und Röntgenstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase (2AHK, rechts). Farbzweisung wie oben. Die Sequenzidentität liegt bei 82 %, die Sequenzhomologie bei 91 %.

Ein mittels *Yasara* v6.6.20 erstelltes Struktur-Alignment des Homologie-Modells der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit dem Template (1BT1) ergab eine effektive Abweichung von 0,81 Å über den Kernbereich des Enzyms (Abb. 3.33). Dieser beinhaltet vor allem das *4- α -helix-bundle*, sowie das Kupferzentrum. Die peripheren Bereiche wurden aufgrund der strukturellen Abweichungen hierbei nicht berücksichtigt.

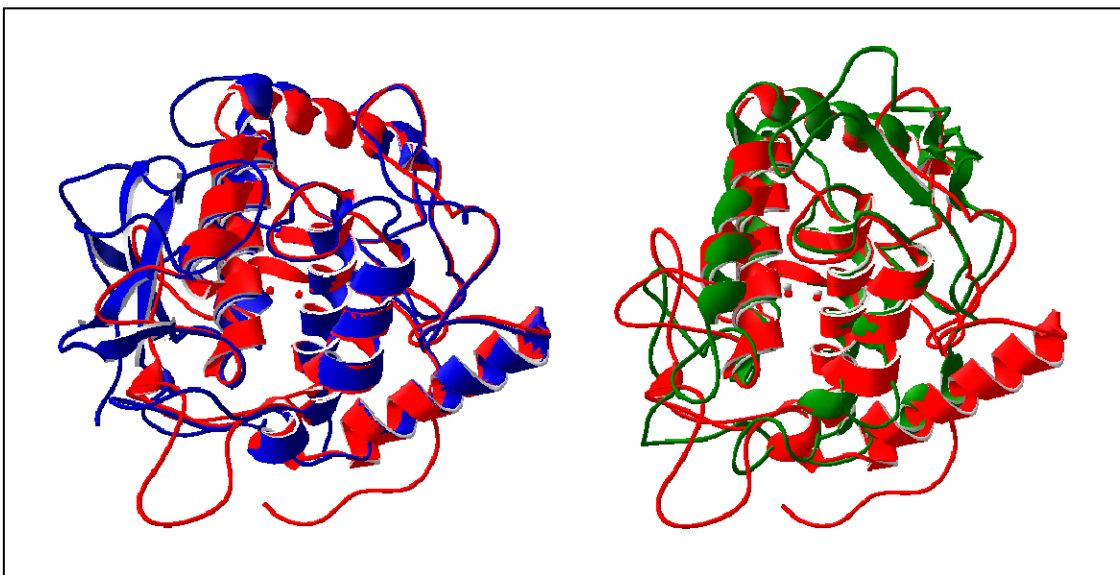


Abb. 3.33: Struktur-Alignments des Homologie-Modells der *S. antibioticus*-Tyrosinase (rot) mit der Vorlagestruktur der *I. batatas*-Catecholoxidase 1BT1 (blau), sowie mit der Kristallstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase 2AHK (grün). In den zentralen Bereichen ist die Modellstruktur der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit beiden Kristallstrukturen fast deckungsgleich.

Das Alignment der modellierten *S. antibioticus*-Tyrosinase mit der Kristallstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase (2AHK) ergab eine Abweichung von 0,87 Å. Auch hier wurden lediglich die zentralen Bereiche der Enzyme berücksichtigt. Die beiden Kristallstrukturen 1BT1 und 2AHK wichen mit effektiven 1,08 Å voneinander ab, wobei auch bei diesem Struktur-Alignment nur die oben genannten Proteinbereiche betrachtet wurden. Der für die Alignments angewandte Algorithmus [194] ist in das *Yasara / What if* Programmpaket implementiert und gruppiert vollautomatisch strukturell ähnliche Fragmente von eingeladenen Proteinstrukturen.

Eine Überlagerung der aktiven Zentren der drei genannten Enzyme ist in Abb. 3.34 dargestellt. Hierbei zeigt sich ein weiteres Mal, dass das Modell in den katalyserelevanten Strukturbereichen der Vorlagestruktur sehr nahe kommt, zum anderen zeigt sich auch sehr deutlich eine enorme Ähnlichkeit dieser beiden Strukturen zu der räumlichen Anordnung des aktiven Zentrums in der Kristallstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase. Tab. 3.9 gibt einen Überblick über die Atom-Abstände in den dargestellten aktiven Zentren.

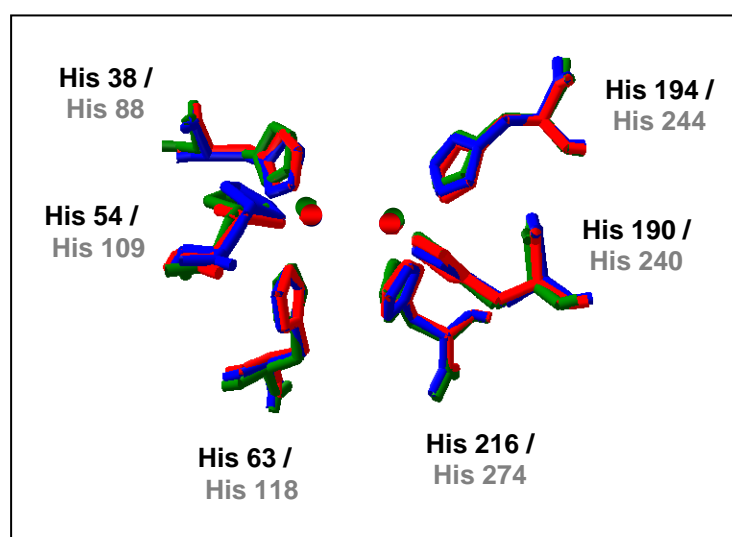


Abb. 3.34: Überlagerung der aktiven Zentren der *I. batatas*-Catecholoxidase (blau), der *S. antibioticus*-Tyrosinase (rot) und der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase (grün). Das Cu_A-Atom ist in der Abbildung links, Cu_B rechts (Kugeln). Die Histidine der *Streptomyces*-Tyrosinasen sind in schwarz, die der Catecholoxidase sind in grau angegeben.

	1BT1		S.ant. TY	2AHK
Cu _A – H 88	2,05 Å	Cu _A – H 38	1,97 Å	2,10 Å
Cu _A – H 109	2,24 Å	Cu _A – H 54	2,14 Å	2,26 Å
Cu _A – H 118	2,26 Å	Cu _A – H 63	2,22 Å	2,44 Å

Cu_B – H 240	2,08 Å	Cu_B – H 190	2,01 Å	2,05 Å
Cu_B – H 244	2,29 Å	Cu_B – H 194	2,26 Å	2,16 Å
Cu_B – H 274	2,15 Å	Cu_B – H 216	2,08 Å	2,19 Å
Cu_A – Cu_B	3,03 Å	Cu_A – Cu_B	3,07 Å	3,32 Å

Tab. 3.9: Kern-Kern-Abstände der Cu-Atome zu den N_ε-Atomen der ligandierenden Histidine, sowie der Cu-Atome zueinander. **1BT1:** *I. batatas*-Catecholoxidase, **S.ant. TY:** *S. antibioticus*-Tyrosinase, **2AHK:** *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase.

Die ermittelten Abstandswerte variieren in den drei Strukturen nur geringfügig, wodurch die starke Homologie der aktiven Zentren nochmals unterstrichen wird. Da die *S. antibioticus*-Tyrosinase anhand der *I. batatas*-Catecholoxidase modelliert wurde, sind diese Abstandswerte zueinander ein wenig ähnlicher, als zu den Werten der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase. Insgesamt unterscheiden sich die Abstände in den einzelnen Positionen aber stets um weniger als 10 %.

Obwohl das erstellte Homologie-Modell durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur einer anderen *Streptomyces*-Tyrosinase an Wert verloren hatte, konnten einige Aspekte bezüglich Substratbindung und Reaktionsmechanismus nun differenzierter betrachtet werden. Auf die Erstellung eines neuen Homologie-Modells der *S. antibioticus*-Tyrosinase auf Basis der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase wurde jedoch verzichtet, da die zu erwartenden Verbesserungen in der Strukturvorhersage den Bereich des aktiven Zentrums vermutlich nur unwesentlich betroffen hätten. Zudem erschien dies in Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung durch das Vorliegen echter Strukturdaten in allen katalyserelevanten Oxidations-Zuständen als unnötig.

Bei der Betrachtung des aktiven Zentrums wurden im Folgenden sowohl das ursprüngliche Modell der *S. antibioticus*-Tyrosinase, als auch die neu gewonnenen Kristallstruktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase berücksichtigt.

Das aktive Zentrum ist bei dem Modell, sowie in der Kristallstruktur offen zugänglich. Verglichen mit der Kristallstruktur der Catecholoxidase blockiert hier keine sperrige Seitenkette das Cu_A-Atom (Abb. 3.35).

Die auf der Basis des Sequenz-Alignments dem Phe-261 der *I. batatas*-Catecholoxidase äquivalente Position Gly-204 liegt in beiden Fällen am äußersten Rand der Bindungstasche. Im Hinblick auf die Architektur des aktiven Zentrums und seiner Umgebung fällt bei den Streptomyces-Tyrosinasen die Position 42 auf. Diese wird in den beiden betrachteten Enzymen von einem Isoleucin besetzt und kann als sterisches Äquivalent zum Phe-261 betrachtet werden, da die Entfernung dieser Aminosäuren zum aktiven Zentrum etwa gleich groß ist. Es ist jedoch zu erkennen, dass auch diese Seitenkette die Substratbindung räumlich nicht einschränkt (Abb. 3.35). Somit kann bereits anhand dieses Befunds vermutet werden, dass Cu_A für die Bindung und den Umsatz von Monophenolen verantwortlich ist und sich aus der eingeschränkten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums bei Catecholoxidasen das Fehlen einer Monophenolase-Aktivität ergibt. Dieses steht im Gegensatz zu den von Matoba *et al.* [36] postulierten Reaktionsmechanismus, der auf der Basis von Molekülsimulationen die Bindung von Monophenolen an Cu_B als initialen Schritt bei der Umsetzung dieser Substrate annimmt [6, 195, 196]. Ein kritischer Vergleich der hypothetischen Reaktionsmechanismen, insbesondere bezüglich der Bindung von Monophenolen an das aktive Zentrum wird in Kapitel 4.4 durchgeführt.

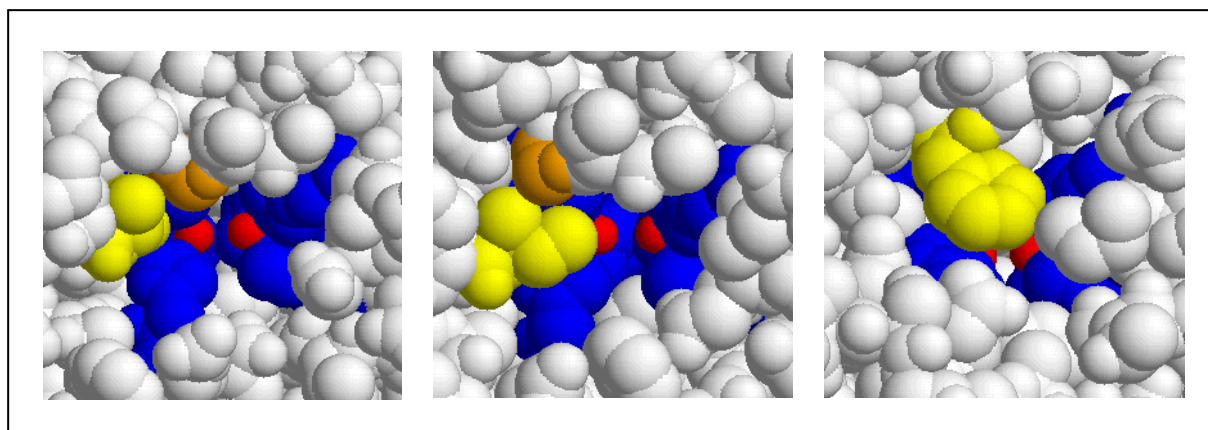


Abb. 3.35: Blick in das aktive Zentrum der Tyrosinasen von *S. antibioticus* (Modell, links), *S. castaneoglobisporus* (2AHK, Mitte) und der Catecholoxidase aus *I. batatas* (1BT1, rechts). Rot: Kupfer-Atome; blau: Kupfer-ligandierende Histidine; orange: Gly-204; gelb: Ile-42 (Tyrosinasen) bzw. Phe-261 (Catecholoxidase). Das Cu_A -Atom ist in den Darstellungen jeweils links orientiert.

Auch bei den Hämocyaninen aus Arthropoden und aus Mollusken wird der Zugang zum aktiven Zentrum limitiert. In beiden Fällen schirmt eine zweite Protein-Domäne das Kupferzentrum soweit ab, dass diese Proteine lediglich Sauerstoff binden und transportieren können. Zudem blockieren Aminosäure-Seitenketten aus den ab-

schirmenden Domänen den Zugang von phenolischen Substraten in die Bindungstasche des aktiven Zentrums [6, 196]. Eine detaillierte Erörterung der strukturellen Gemeinsamkeiten der Hämocyanine, Catecholoxidasen und Tyrosinasen hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität und deren Aktivierbarkeit erfolgt in den Kapiteln 4.3 - 4.6.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch Mutagenese-Experimente an der *S. antibioticus*-Tyrosinase vorgesehen waren, diese jedoch aus Mangel an Ressourcen nicht durchgeführt werden konnten, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die geplanten Arbeiten gegeben werden.

Als interessante Positionen für einen Austausch wären in erster Linie Gly-204 und Ile-42 zu nennen. Der Austausch einer dieser beiden Aminosäuren gegen ein Phenylalanin müsste im Bereich des aktiven Zentrums eine ähnliche Situation herbeiführen, wie bei der Catecholoxidase. Die hierbei zu klärenden Fragen sind, ob und wenn ja wie weit die Fähigkeit zur Hydroxylierung von Monophenolen bei den Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Enzym eingeschränkt wird, und ob die Diphenolase-Aktivität von der veränderten Struktur unbeeinflusst bleibt.

Für gerichtete Mutagenesen kämen aber auch Asn-191, sowie Asp-209 in Frage. Diesen beiden Aminosäuren äquivalente Positionen wurden bereits von Jackman *et al.* [172, 197] in der *S. glaucescens*-Tyrosinase isofunktionell ausgetauscht. Beide Mutationen führten zu Enzymen, die in ihrer Aktivität stark eingeschränkt, im Falle des Austausches an Position 191 durch den Verlust eines Cu-Atoms sogar nahezu inaktiv waren. Das Asparagin an Position 191 ist eine stark konservierte Aminosäure in Tyrosinasen, wobei das korrespondierende Asp-352 im Hämocyanin von *Panulirus interruptus* an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt ist, die zur Stabilisierung der oxy-Form benötigt werden, nicht aber die Konformation des aktiven Zentrums beeinflussen [29]. Ähnlich verhält es sich mit dem Aspartat 209 der Tyrosinasen, dessen äquivalente Aminosäure im *P. interruptus*-Hämocyanin (Asp-377) in unmittelbarer Nähe zum Cu_B liegt und eine Wasserstoffbrücke zu einem Arginin (Arg-271) ausbildet [197].

Da die *S. glaucescens*-Tyrosinase eine Sequenzidentität von 86 % mit der *S. antibioticus*-Tyrosinase aufweist, wäre es durchaus interessant zu untersuchen, ob die oben geschilderten Ergebnisse auch im Falle der *S. antibioticus*-Tyrosinase zu beobachten sind. Zudem ließen sich die Untersuchungen auf weitere Seitenketten ausweiten, deren Position in der Modellstruktur der *S. antibioticus*-Tyrosinase auf

eine Beteiligung an sensiblen Wasserstoffbrücken schließen lässt. Als Beispiele wären hierfür Arg-55, Glu-182 und His-215 zu nennen. Wie groß jedoch der Erkenntnisgewinn für eine endgültige Klärung des Reaktionsmechanismus hierbei sein wird, ist eher fraglich. Die Positionen Gly-204 und Ile-42 stellen hierfür vermutlich deutlich reizvollere Ziele dar.

Die für Mutagenese-Experimente an der *S. antibioticus*-Tyrosinase vorgeschlagenen Positionen sind in Abb. 3.36 noch einmal bildlich dargestellt.

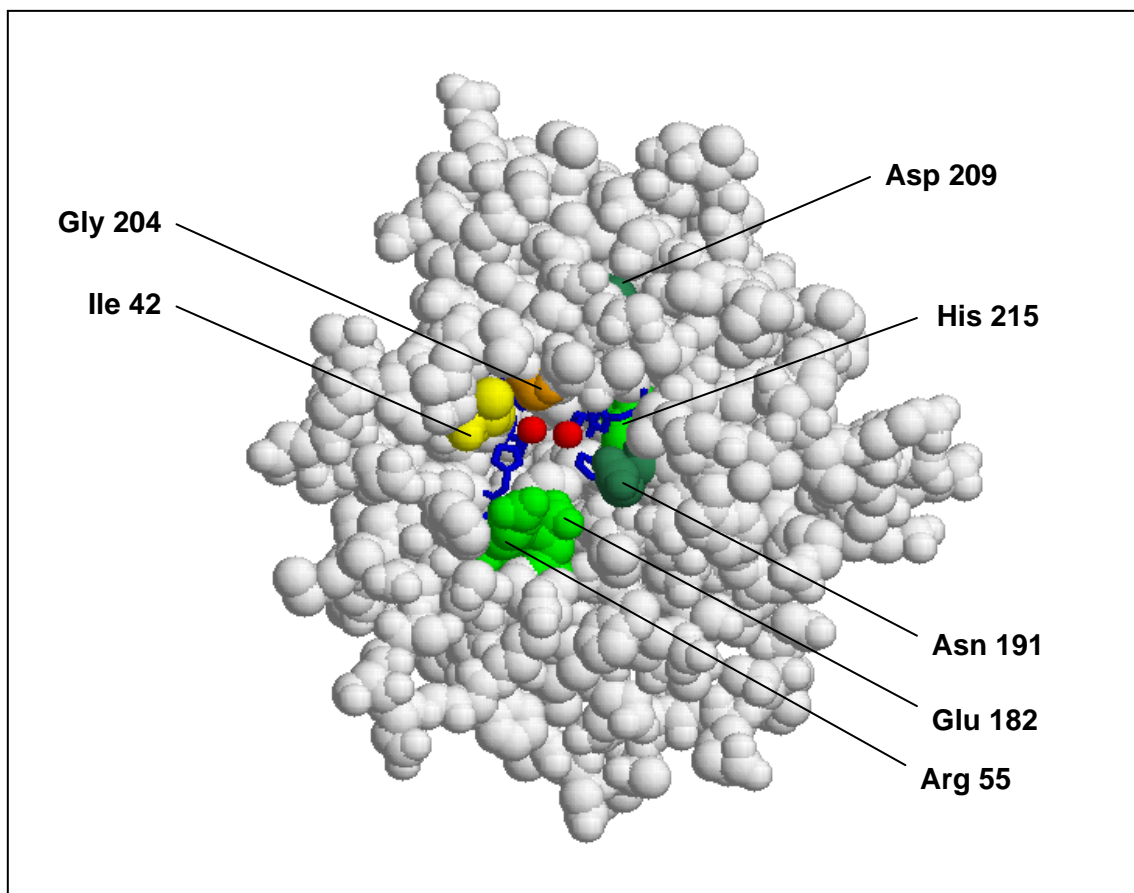


Abb. 3.36: Modellstruktur der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit den für Mutagenese-Experimente vorgeschlagenen Aminosäuren. Die Kupfer-ligandierenden Histidine sind zur besseren Übersicht ohne van-der-Waals-Radien dargestellt. Ein Austausch der Aminosäure an Position 42 bzw. 204 führt möglicherweise zu einem Verlust der Monophenolase-Aktivität durch Abschirmung von Cu_A (links), Austausche an den übrigen Positionen (55, 182, 191, 209 und 215) verändern Anzahl und Lage von Wasserstoffbrücken im Bereich des aktiven Zentrums und beeinflussen dadurch möglicherweise das Substratspektrum und die Reaktionskinetik der Tyrosinase.

3.4 Kinetische Charakterisierung der Tyrosinasen aus *Streptomyces antibioticus* und *Agaricus bisporus*

Die Untersuchung der Kinetik der Tyrosinase-Reaktion erfolgte unter Verwendung verschiedener mono- und diphenolischer Substrate, sowie bekannter Inhibitoren. Neben der gereinigten Tyrosinase aus dem Bakterium *Streptomyces antibioticus* wurde hierbei die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus dem essbaren Champignon *Agaricus bisporus* als Referenz eingesetzt.

3.4.1 Enzyme

Die beiden verwendeten Enzyme aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* wurden vor ihrer Verwendung elektrophoretisch charakterisiert (Abb. 3.37).

Während das Enzym aus *S. antibioticus* wie bereits dargestellt als Monomer mit einem Molekulargewicht von 30 kDa vorliegt, handelt es sich bei dem Enzym aus *A. bisporus* um ein Heterotetramer. Dieses setzt sich aus je zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 43 kDa (H, *heavy*) und 13 kDa (L, *light*) zusammen, wodurch die native Form dieses Enzyms (H₂L₂) ein Molekulargewicht von 112 kDa aufweist [3, 198]. Lediglich die schwere Peptidkette verfügt über ein Kupferzentrum. Die Funktion der leichten Kette ist unklar, zumal mittlerweile auch aktive, monomere Isoformen der *A. bisporus*-Tyrosinase isoliert wurden, deren Molekulargewicht dem der schweren Kette entspricht [3, 199].

Im SDS-Gel traten im Fall der *A. bisporus*-Tyrosinase mehrere Banden auf (Abb. 3.37 A). Neben den monomeren Untereinheiten bei ca. 43 kDa und 13 kDa waren bei ca. 69 kDa, 30 kDa, 23 kDa, 21 kDa und 13 kDa weitere Proteinbanden nachweisbar. Zusätzlich waren in einigen Fällen Doppel- oder Mehrfachbanden erkennbar, die möglicherweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher Isoformen zurück zu führen sind. Bei der 69 kDa-Bande handelte es sich vermutlich um ein Trimer (HL₂), das schon früher, selbst nach reduzierender Denaturierung im SDS-Gel beobachtet werden konnte [3, 199]. Ob es sich bei den übrigen Banden um weitere Oligomere von Tyrosinase-Untereinheiten oder um andere Proteine handelte, kann jedoch nicht beantwortet werden. Die *S. antibioticus*-Tyrosinase erschien hingegen erwartungsgemäß nur als Monomer mit einem Molekulargewicht von 30 kDa, weitere Proteinbanden konnten nicht nachgewiesen werden.

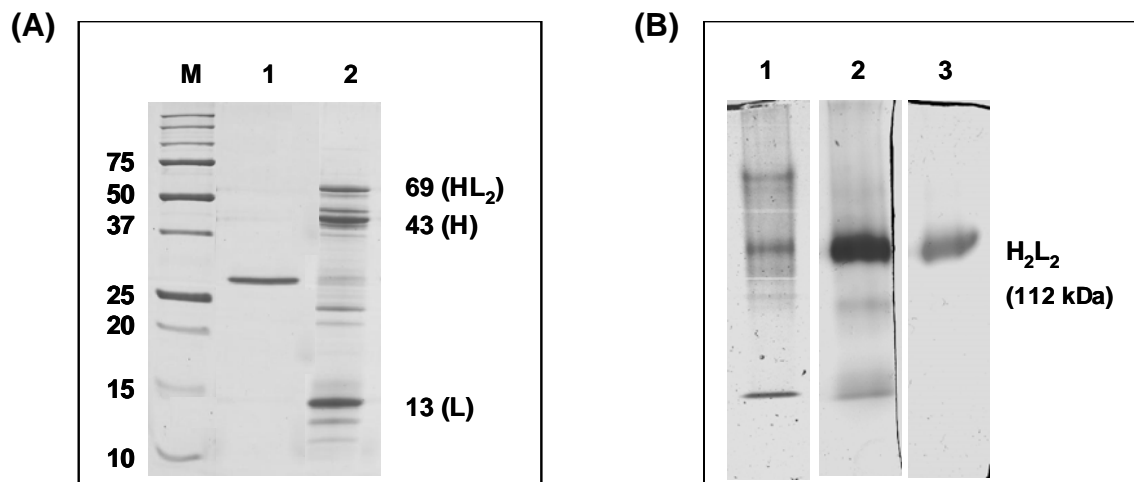


Abb. 3.37: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid-Gel) der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* (A) und native PAGE (10 % Polyacrylamid-Gel) der Tyrosinase aus *A. bisporus* (B).

(A): **M** (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München).

Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: Tyrosinase aus *S. antibioticus*.

2: Tyrosinase aus *A. bisporus* (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Die Molekulargewichte der leichten (L) und schweren (H) Untereinheiten, sowie des Trimers (HL₂) sind in kDa angegeben.

(B): 1: Tyrosinase aus *A. bisporus* nach Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

2: Tyrosinase aus *A. bisporus* nach Aktivitätsfärbung mit 5 mM L-Dopa

3: Tyrosinase aus *A. bisporus* nach Aktivitätsfärbung mit 5 mM Tyramin

Bei der einzelnen Bande mit Monophenolase- und Diphenolase-Aktivität handelt es sich vermutlich um die heterotetramere Form des Enzyms. Eine Zuordnung der Banden mittels SDS-PAGE war nicht möglich.

In der nativen PAGE konnten bei der *A. bisporus*-Tyrosinase vier diskrete Proteinbanden angefärbt werden, von denen drei Banden über Diphenolase-Aktivität, jedoch nur eine über Monophenolase-Aktivität verfügte (Abb. 3.37 B). Letztere war auch bei den beiden anderen Färbemethoden dominant und stellt somit vermutlich die heterotetramere Form des Enzyms dar. Eine Zuordnung der übrigen Aktivitätsbanden zu bestimmten Oligomerisierungszuständen oder Isoformen der Tyrosinase konnte anhand dieser Daten nicht durchgeführt werden. Zudem tritt dieses Enzym oft gleichzeitig in aktiven und latenten Formen auf [3]. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass das verwendete Tyrosinase-Präparat aus *A. bisporus* inhomogen war und überdies Verunreinigungen mit Pigmenten aufwies. Für eine Betrachtung der Enzymkinetik wurde dies aber nicht als störend eingestuft. Eine native PAGE der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde bereits im Rahmen der analytischen IEF des gereinigten Enzyms durchgeführt (Abb. 3.26 B). Da hierbei sowohl nach der Protein-, als auch nach der Aktivitätsfärbung nur eine Bande detektiert wurde, konnte das Vorliegen von Oligomeren oder unterschiedlichen Isoformen ausgeschlossen werden.

3.4.2 Substrate

Als Substrate dienten neben L-Tyrosin und L-Dopa, die decarboxylierten Derivate dieser Substanzen, Tyramin und Dopamin, sowie der synthetische Methylester des L-Tyrosins und die als sekundärer Pflanzenstoff natürlich vorkommende Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure). Die Messungen der Enzymaktivität erfolgten photometrisch oder polarographisch.

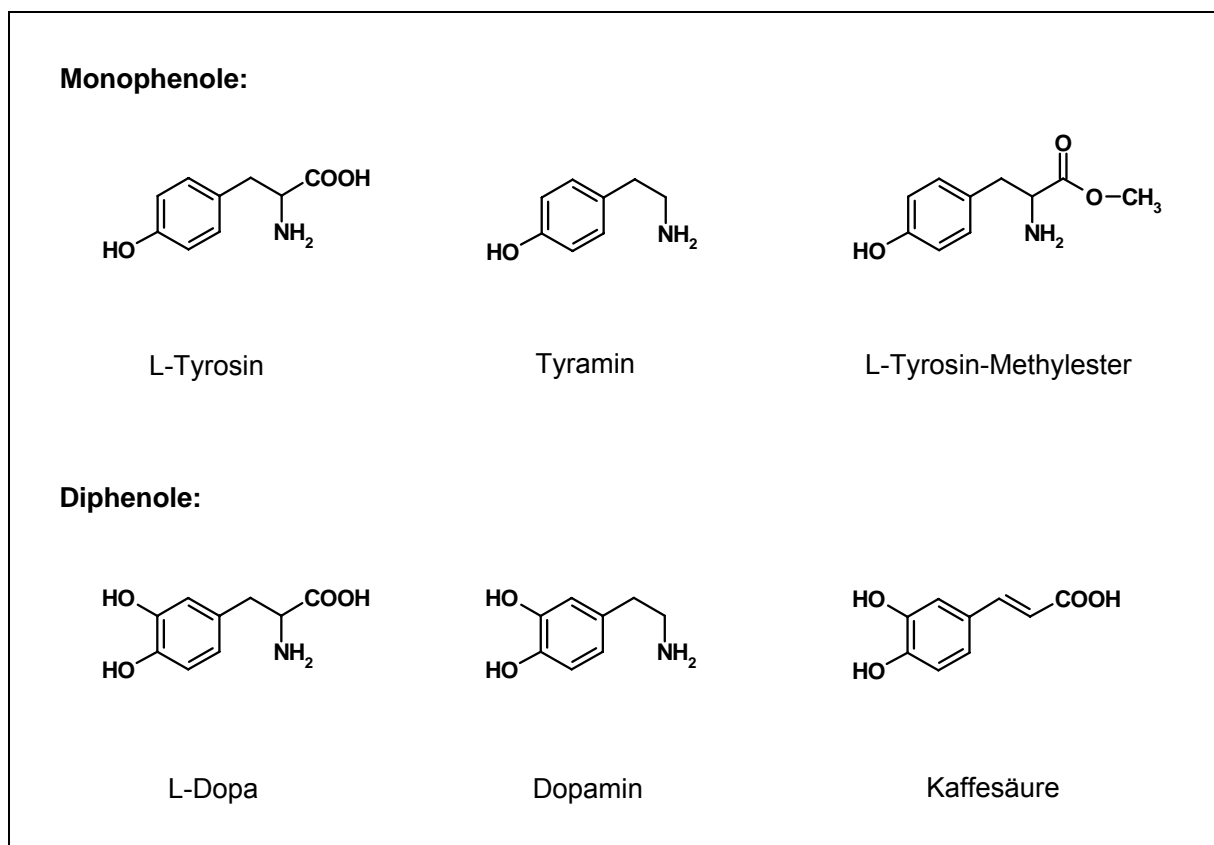


Abb. 3.38: Die verwendeten mono- und diphenolische Substrate der Tyrosinase

In den folgenden Abbildungen (Abb. 3.39 und 3.40) sind die Produktspektren der verwendeten Substrate nach ihrem enzymatischen Umsatz durch die Tyrosinase dargestellt. Hierzu wurde jeweils eine 1 mM Substratlösung in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0 mit 0,1 U *S. antibioticus*-Tyrosinase bei 25 °C inkubiert und Absorptionsspektren dieser Lösungen in Abständen von 1 min aufgenommen. Bei den diphenolischen Substraten war die Reaktion nach 15 min bereits abgeschlossen. Aufgrund der Lag-Phase wurde die Messdauer beim Umsatz monophenolischer Substrate auf 40 min erweitert, wobei die Reaktion auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet war.

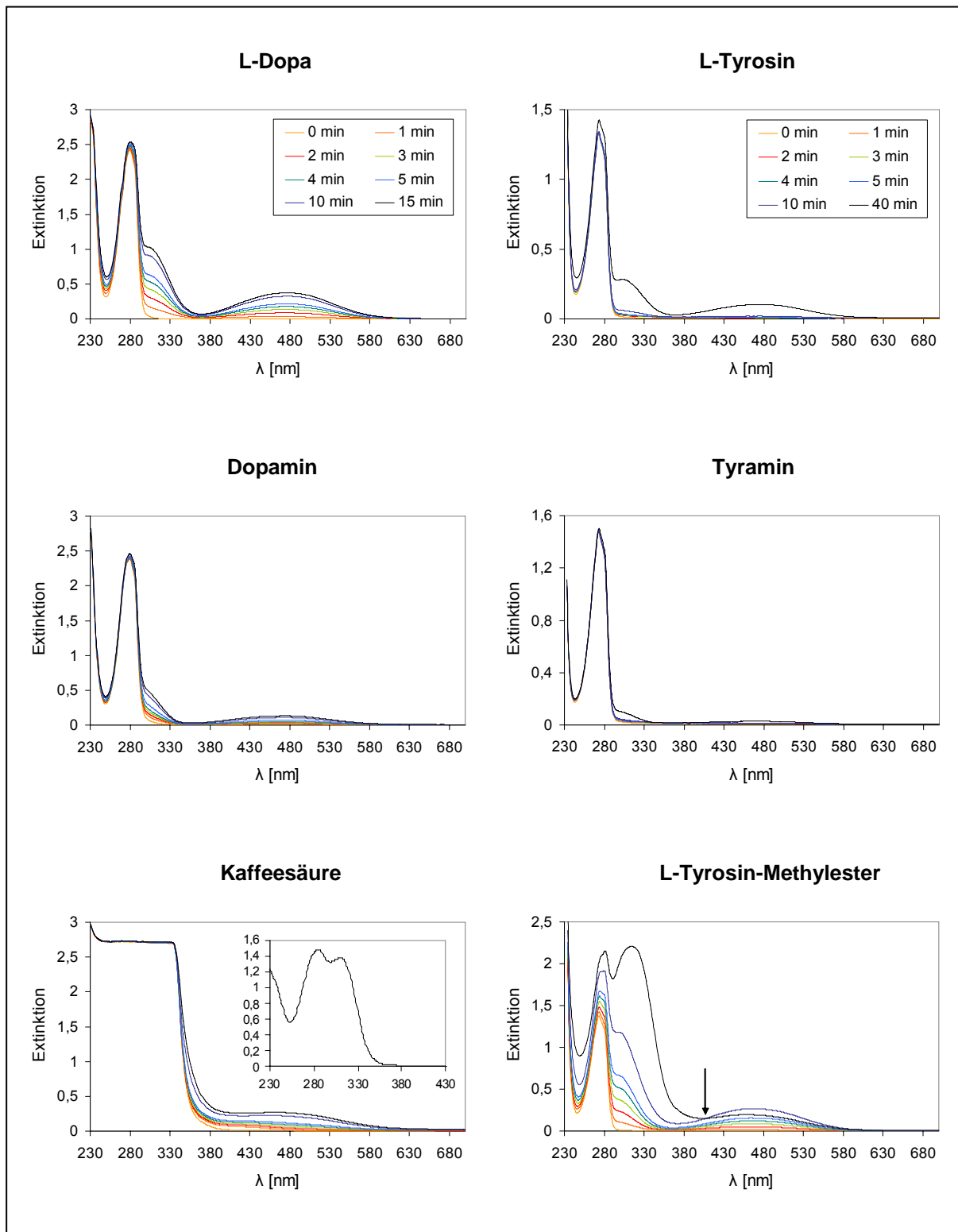


Abb. 3.39: Produktspektren der mono- und diphenolischen Substrate beim Umsatz durch die *S. antibioticus*-Tyrosinase. Die Konzentration der Substrate betrug in allen Fällen 1 mM. Die Aufnahme der Spektren erfolgte nach 1, 2, 3, 4, 5, 10 und 15 min, im Falle der monophenolischen Substrate nach 40 statt nach 15 min (die Legende ist jeweils nur einmal, stellvertretend für alle drei Messreihen einer Substratklasse eingefügt). Als Grundlinie diente die Absorption des Reaktionspuffers (0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0).

Die eingefügte Abbildung im Diagramm der Kaffeesäure zeigt die Absorption einer 0,1 M Substratlösung im Bereich 230 bis 430 nm. Der Pfeil im Diagramm des L-Tyrosin-Methylesters markiert einen Überschneidungspunkt, der erst im späteren Reaktionsverlauf auftritt.

Zur genaueren Betrachtung der reinen Produktabsorption wurde in der nächsten Abbildung die Absorption der Substratlösungen als Grundlinie herangezogen.

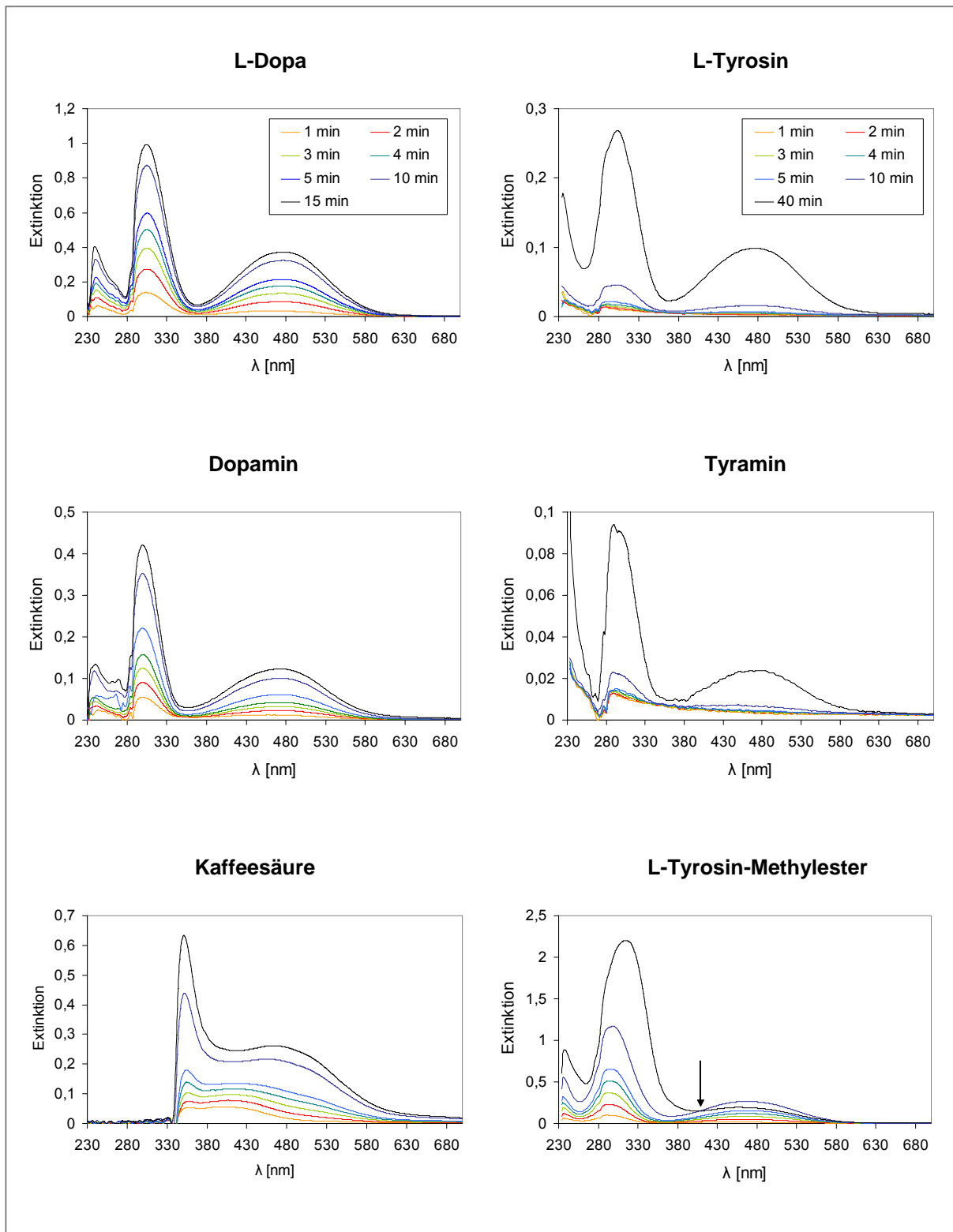


Abb. 3.40: Differenzspektren der Produkte aus dem Umsatz der mono- und diphenolischen Substrate aus Abb. 3.39. Als Grundlinien dienen die Absorptionsspektren der jeweiligen Substratlösung.

Die Absorptionsspektren der Substratlösungen zeigten jeweils eine schmale Absorptionsbande im Nah-UV-Bereich mit einem Maximum bei 274 nm im Falle von L-Tyrosin, Tyramin und dem L-Tyrosin-Methylester. Bei L-Dopa und Dopamin lag das Maximum bei 279 nm. Die Kaffeesäure hingegen wies zwei Absorptionsmaxima bei 285 nm und 310 nm auf.

Die erzeugten Produktspektren zeigten ein sehr ähnliches Bild, wobei die Spektren der umgesetzten Kaffeesäure, sowie des L-Tyrosin-Methylesters einige signifikante Abweichungen gegenüber den anderen vier Substraten aufwiesen. In allen Spektren zeigten sich bereits nach 2-3 min deutliche Absorptionsbanden um 300 nm und 475 nm, die im weiteren zeitlichen Verlauf an Intensität zunahmen. Die Absorption im Bereich von 280 nm stieg während der Reaktion ebenfalls leicht an. Die beiden Absorptionssignale bei 300 nm und 475 nm sind auf das gebildete Dopachrom bzw. dessen Derivate Dopaminchrom und Dopachrom-Methylester, sowie auf Kaffeeyl-Chinon zurückzuführen und sind charakteristisch für die meisten einfachen Chinone [74, 200]. Im Falle von L-Tyrosin und L-Dopa lagen die Maxima der Absorptionsbanden während der Reaktion konstant bei 305 nm und 475 nm. Bei Tyramin und Dopamin lagen die Absorptionsmaxima des gebildeten Produkts (Dopaminchrom) bei 290 nm und bei 480 nm, wobei auch diese Positionen im Verlauf der Reaktion erhalten blieben.

Die Absorptionsmaxima im Produktspektrum des L-Tyrosin-Methylesters lagen bei 290 nm und um 450 nm. Das Maximum der Bande bei 450 nm verschob sich innerhalb der ersten Minuten von ursprünglich 445 nm zu 460 nm. Nach einer Inkubationszeit von 40 min konnte eine Abnahme in der Absorptionsintensität und ein Maximum bei 457 nm festgestellt werden, gleichzeitig verschob sich das Maximum bei 290 nm zu 315 nm. Der dadurch hervorgerufene Überschneidungspunkt der Spektren deutet darauf hin, dass das entstehende Produkt (Dopachrom-Methylester) auf unbekanntem Weg weiter reagierte, jedoch aufgrund der abnehmenden Absorption im visuellen Bereich vermutlich nicht oder nur unvollständig zu einem Melanin-ähnlichem Pigment polymerisierte.

Das beim Umsatz der Kaffeesäure erzeugte Absorptionsspektrum besitzt je eine Bande um 350 nm und um 450 nm. Das Maximum der Absorptionsbande um 430 nm verschob sich im Laufe der Reaktion von 403 nm zu 462 nm. Im Gegensatz zu den Produktspektren der übrigen fünf Substrate überlagern sich die beiden Absorptions-

banden des Oxidationsprodukts der Kaffeesäure (Kaffeeyl-Chinon) sehr stark, so dass kein ausgeprägtes Minimum zwischen den Banden erkennbar war.

Für die quantitative Untersuchung der Reaktionskinetik wurde im Folgenden bei allen eingesetzten Substraten die Absorptionzunahme bei 475 nm als Messsignal festgelegt (Dopachrom-Assay).

Da im Bereich um 475 nm die molaren Extinktionskoeffizienten von Dopachrom ($\lambda_{\max} = 475 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Dopaminchrom ($\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$, $\epsilon_{\max} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sehr ähnlich sind [201], konnte die Bildung dieser Produkte semi-quantitativ verglichen werden. Die Umsatzrate der *S. antibioticus*-Tyrosinase fiel bei Tyramin und Dopamin etwa 15- bis 20-fach geringer aus, als bei Tyrosin und Dopa. Nach der Reaktion in einer 1 mM Substratlösung betrug die Extinktion bei 475 nm nach 10 min im Falle von L-Tyrosin 0,016 und im Falle von L-Dopa 0,324. Bei Tyramin lag dieser Wert bei 0,007 und bei Dopamin bei 0,100. In einem parallelen Ansatz mit der *A. bisporus*-Tyrosinase ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier lag die Umsatzrate gegenüber Tyramin und Dopamin etwa dreimal höher, als gegenüber Tyrosin und Dopa. Die Extinktionswerte bei 475 nm betragen 0,239 bei Dopamin und 0,080 bei L-Dopa nach 10 min Reaktionszeit bzw. 0,052 bei Tyramin und 0,019 bei L-Tyrosin nach 45 min Reaktionszeit. Hieraus ergibt sich für die beiden Enzyme eine gegensätzliche Spezifität gegenüber diesen Substraten.

3.4.3 Umsatzkinetik der Tyrosinase-Reaktion

Zur Betrachtung der uninhibierten Reaktionskinetik der Tyrosinase wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration für einige mono- und diphenolische Substrate erfasst. Hierzu wurden die Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* jeweils in Substratlösungen mit steigender Konzentration inkubiert und die Produktbildung im *steady-state* photometrisch bei 475 nm detektiert. Die Messungen erfolgten bei 25 °C in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0. Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit diente die Anfangssteigung (zwischen 5 und 15 s) der Absorptionzunahme in $[\text{dOD} (475 \text{ nm}) \text{ min}^{-1}]$.

Zur Aufhebung der Lag-Phase beim Umsatz der monophenolischen Substrate wurde diesen Ansätzen stets 0,01 mM L-Dopa zugegeben. Als diphenolische Substrate wurden L-Dopa und Dopamin, als monophenolische Substrate L-Tyrosin-Methylester und Tyramin eingesetzt.

Auf L-Tyrosin wurde aufgrund seiner sehr schlechten Löslichkeit in wässrigen Puffern verzichtet, die Kaffeesäure wurde wegen ihrer sehr stark abweichenden absorptiven Eigenschaften für diese Untersuchung nicht verwendet.

3.4.3.1 Umsatz von L-Dopa

Abbildung 3.41 zeigt die Auftragung der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die L-Dopa-Konzentration, sowie die ermittelten Enzym-Parameter für beide Tyrosinasen. Da für das gemessene Produkt Dopachrom der molare Extinktionskoeffizient bekannt ist ($\epsilon_{475} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), konnte die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl in der Einheit [dOD (475 nm) min^{-1}], als auch in $\mu\text{M min}^{-1}$ angegeben werden.

Die Bestimmung der Enzym-Parameter K_M und v_{max} erfolgte nach dem Formalismus von Michaelis und Menten [202, 203], unter der Voraussetzung, dass eine Reaktion 1. Ordnung vorliegt: $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$ (mit E = Enzym; S = Substrat; ES = Enzym-Substrat-Komplex; P = Produkt). Die Abhängigkeit von K_M und v_{max} von der Reaktionsgeschwindigkeit v und der Substratkonzentration $[S]$ wird hierbei durch die folgende Gleichung ausgedrückt:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Gl. 1}).$$

Die nicht-lineare Regression der Messdaten erfolgte rechnergestützt unter Verwendung des Programms *Sigma Plot 7.0* nach der Methode der kleinsten Quadrate (Marquard-Levenberg Algorithmus). Als Maß für die Varianz der Messpunkte diente stets der bereinigte R^2 -Wert (\bar{R}^2), der unter Berücksichtigung der Anzahl unabhängiger Variablen aus dem Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R bestimmt wurde. Der bei der Bestimmung der Wechselzahl eingehende, relative Fehler der Enzymkonzentration (ΔE_0) wurde für alle im Folgenden dargestellten Messreihen bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase auf 5 % festgelegt, was etwa dem relativen Fehler von v_{max} bei diesem Enzym entspricht. Für die *A. bisporus*-Tyrosinase wurde aufgrund der Unreinheit des Enzym-Präparates ein doppelt so hoher Wert (10 %) für den relativen Fehler der Enzymkonzentration angenommen.

Bei beiden Enzymen lag für L-Dopa eine hyperbolische Sättigungskinetik vor. Bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde allerdings der Grenzwert nicht annähernd erreicht, während bei der *A. bisporus*-Tyrosinase bereits ab ca. 4 mM ein Plateau vorlag. Eine weitere Erhöhung der L-Dopa-Konzentration konnte aufgrund der eingeschränkten

Löslichkeit dieses Substrates nicht durchgeführt werden. Somit konnte das Auftreten von Substratinhibition durch L-Dopa in wässriger Lösung bei beiden Tyrosinasen ausgeschlossen werden. Die Affinität der *A. bisporus*-Tyrosinase gegenüber L-Dopa ($K_M = 0,26 \pm 0,01$ mM) lag etwa 30mal höher als die der *S. antibioticus*-Tyrosinase ($K_M = 8,0 \pm 0,6$ mM). Die Wechselzahl (k_{cat}) hingegen betrug bei der *A. bisporus*-Tyrosinase 378 ± 38 s⁻¹, bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase 1282 ± 89 s⁻¹. Somit ist der L-Dopa-Umsatz durch die *S. antibioticus*-Tyrosinase etwa 4mal schneller, als durch die *A. bisporus*-Tyrosinase, die Substratbindung dagegen 30mal schwächer.

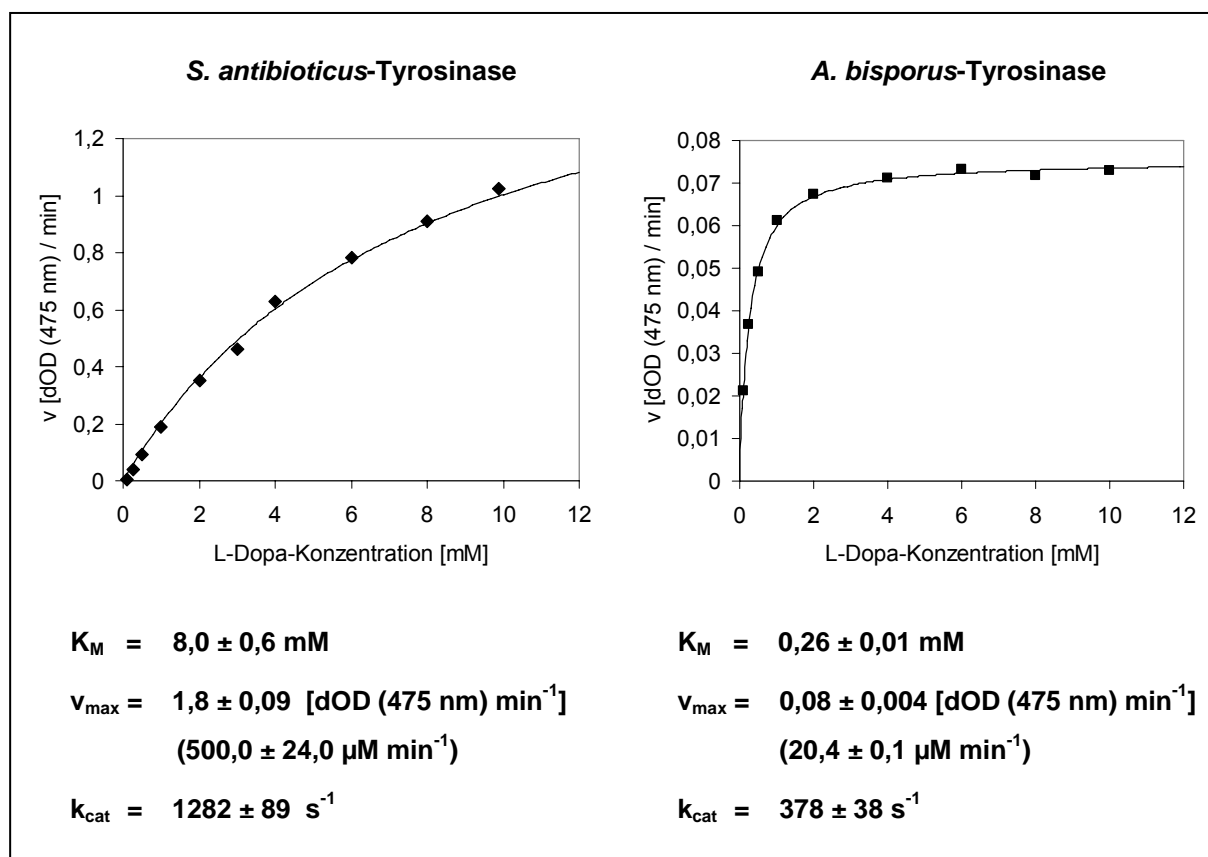


Abb. 3.41: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der L-Dopa-Konzentration (0,1-10 mM). Die Enzymmenge betrug in den dargestellten Messreihen $6,5 \pm 0,33$ nM bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase und $0,9 \pm 0,09$ nM bei der *A. bisporus*-Tyrosinase. \bar{R}^2 hatte in beiden Fällen den Wert 0,998.

Für beide Enzyme existieren publizierte Vergleichswerte. Für die *A. bisporus*-Tyrosinase geben verschiedene Autoren unterschiedliche K_M -Werte von 0,26 mM [67] bis 0,8 mM L-Dopa [204] an. Die Angaben von k_{cat} schwanken hierbei zwischen $83,5$ s⁻¹ [205] und 221 s⁻¹ [67]. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte K_M -Wert liegt somit nahe an den bisher veröffentlichten Literaturwerten, die hohe Abweichung des k_{cat} -Wertes ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass das in dieser Ar-

beit verwendete Präparat im Gegensatz zu dem der genannten Autoren keiner weiteren Aufreinigung unterzogen wurde. Somit war das Vorhandensein weiterer, aktiver Tyrosinase-Spezies neben der tetrameren Form, sowie der Einfluss von zweifellos vorhandenen aber unbekanntem Pigment-Komponenten nicht auszuschließen. Die chemische und mechanische Beanspruchung des Enzyms durch eine Aufreinigung und der damit in aller Regel verbundene Aktivitätsverlust sind beim Vergleich der ermittelten mit den bereits publizierten Umsatzgeschwindigkeiten ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Die für die *S. antibioticus*-Tyrosinase vorliegenden Vergleichswerte für K_M (8,9 mM) und k_{cat} (1300 s⁻¹) [191] stehen jedoch beide in gutem Einklang mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten.

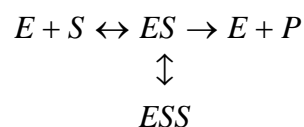
3.4.3.2 Umsatz von Dopamin

Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 3.42 dargestellt. Da für das detektierte Dopaminchrom kein Extinktionskoeffizient für 475 nm bekannt war, erfolgte die Angabe der Reaktionsgeschwindigkeit in relativen Einheiten [dOD (475 nm) min⁻¹].

Die Auswertung der Messdaten erfolgte bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit Hilfe von Gl. 1 wie bereits für L-Dopa beschrieben (siehe 3.4.3.1). Im Falle der *A. bisporus*-Tyrosinase konnte eine deutliche Substratinhibition festgestellt werden. Deshalb wurde bei dieser Messreihe zur Ermittlung der Enzym-Parameter eine modifizierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung [206] herangezogen:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_I}\right) + K_M} \quad (\text{Gl. 2}).$$

Hierbei wird die Annahme berücksichtigt, dass der Enzym-Substrat-Komplex durch die Bindung eines zweiten Substrat-Moleküls an eine zweite, periphere Bindungsstelle inhibiert wird, also keine Konkurrenz von Substrat-Molekülen um die gleiche Bindungsstelle vorliegt:



Die Gleichgewichtskonstante zwischen dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) und dem inhibierten Enzym-Substrat-Komplex (ESS) wird als Inhibitionskonstante K_I bezeichnet und hat wie die Michaelis-Konstante K_M die Dimension einer Konzentration.

Für die *A. bisporus*-Tyrosinase wurde ein K_M -Wert von $1,4 \pm 0,2$ mM Dopamin ermittelt, der Wert für die *S. antibioticus*-Tyrosinase lag mit $17,8 \pm 1,7$ mM etwa 13mal höher. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann zum Vergleich der beiden Enzyme, normiert auf die Enzymkonzentration in $[(\text{dOD (475 nm) min}^{-1}) / \text{nM Tyrosinase}]$ angegeben werden. Der auf diese Weise ermittelte Wert liegt bei der *A. bisporus*-Tyrosinase mit $0,178 \pm 0,008$ etwa 5mal höher, als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit $0,034 \pm 0,002$. Die Inhibitionskonstante K_I für die Substratinhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase durch Dopamin hatte den Wert $32,7 \pm 4,2$ mM und betrug damit etwa das 23-fache der K_M .

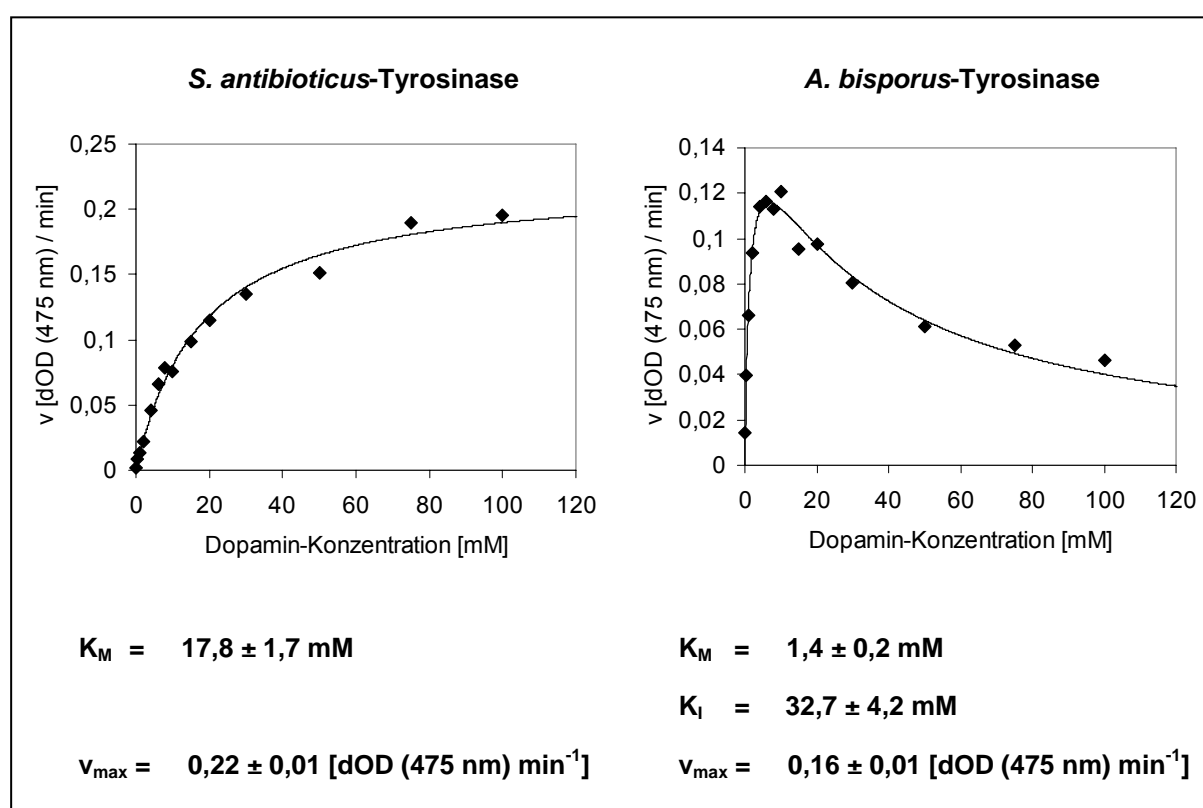


Abb. 3.42: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Dopamin-Konzentration (0,1-100 mM). Die Enzymmenge betrug in den dargestellten Messreihen $6,5 \pm 0,33$ nM bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase und $0,9 \pm 0,09$ nM bei der *A. bisporus*-Tyrosinase. Die \bar{R}^2 -Werte lagen bei 0,989 (*S. antibioticus*) und 0,978 (*A. bisporus*).

Für die Kinetik des Dopamin-Umsatzes liegen in der Literatur bisher nur Vergleichswerte für die *A. bisporus*-Tyrosinase vor. Die Angaben für K_M schwanken hierbei zwischen 0,72 mM [207] und 2,2 mM [204], Hinweise auf eine Substratinhibition bei sehr hohen Substrat-Konzentrationen (> 15 mM) fehlen jedoch bisher, weshalb für K_I kein Literaturwert vorliegt. Die Wechselzahl wird je nach Autor mit 177 s^{-1} bis $475,1 \text{ s}^{-1}$ angegeben [204, 205, 207, 208] und liegt somit 2 - 4mal über dem Wert für L-Dopa

($83,5 \pm 108 \text{ s}^{-1}$). Aus den in dieser Arbeit ermittelten v_{max} -Werten konnte die Wechselzahl lediglich anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des Dopaminchrom bei 480 nm ($\epsilon_{480} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) abgeschätzt werden. Das Absorptionsspektrum von Dopaminchrom (Abb. 3.40, Mitte) weist um das Absorptionsmaximum bei 480 nm eine sehr breite Bande auf, weshalb der numerische Unterschied zwischen ϵ_{480} und ϵ_{475} als geringfügig anzusehen ist. Für die *A. bisporus*-Tyrosinase wurde auf diese Weise ein k_{cat} -Wert von $998 \pm 113 \text{ s}^{-1}$ ermittelt, der ähnlich stark von den Literaturwerten abwich, wie im Falle von L-Dopa. Bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde ein Wert von $171 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Verglichen mit dem Wert $1282 \pm 89 \text{ s}^{-1}$ beim L-Dopa-Umsatz kann so die bereits getroffene Feststellung bekräftigt werden, dass die *S. antibioticus*-Tyrosinase L-Dopa effizienter umsetzt, als Dopamin (siehe 3.4.2). Der umgekehrte Befund für die *A. bisporus*-Tyrosinase wurde ebenfalls bestätigt ($k_{cat(\text{Dopamin})} = 998 \pm 113 \text{ s}^{-1}$ und $k_{cat(\text{L-Dopa})} = 378 \pm 38 \text{ s}^{-1}$).

Ähnlich wie beim L-Dopa-Umsatz hatte die Michaelis-Konstante der *S. antibioticus*-Tyrosinase einen deutlich höheren Wert, als die der *A. bisporus*-Tyrosinase, jedoch trat auch bei sehr hohen Konzentrationen keinerlei Substratinhibition auf. Die Ursache hierfür könnte in der verschiedenartigen Quartärstruktur der untersuchten Tyrosinasen liegen, was an dieser Stelle jedoch rein spekulativ ist. Das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Enzyme bzgl. Substratsättigung und Substratinhibition wurde bislang noch nicht beschrieben.

3.4.3.3 Umsatz von Tyramin

Da bei der *A. bisporus*-Tyrosinase, wie auch schon im Falle von Dopamin (siehe 3.4.3.2), eine Substratinhibition festgestellt werden konnte, wurde für die Auswertung bei diesem Enzym erneut die erweiterte Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 2) angewandt. Für die Auswertung der Messdaten bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde wie bisher die klassische Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) herangezogen. Die graphische Auswertung der Messreihen, sowie die ermittelten Enzym-Parameter sind in Abb. 3.43 dargestellt.

Die ermittelten K_M -Werte für Tyramin lagen bei beiden Tyrosinasen deutlich niedriger als für Dopamin. Der Wert der *A. bisporus*-Tyrosinase war mit $0,3 \pm 0,1 \text{ mM}$ etwa 6mal niedriger als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase mit $1,9 \pm 0,3 \text{ mM}$.

Eine Normierung der Reaktionsgeschwindigkeit auf die Enzymkonzentration ergab einen Wert von $0,011 \pm 0,001$ [(dOD (475 nm) min⁻¹) / nM Tyrosinase] bei der *A. bisporus*-Tyrosinase und einen Wert von $0,006 \pm 0,001$ bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase. Der Umsatz von Tyramin erfolgte durch die *A. bisporus*-Tyrosinase demnach etwa doppelt so schnell, wie durch die *S. antibioticus*-Tyrosinase. Somit ergab sich ein ähnliches Bild, wie beim Dopamin-Umsatz, wo der K_M -Wert der *A. bisporus*-Tyrosinase ca. 13mal niedriger lag, als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase und der v_{max} -Wert um den Faktor 5 größer war.

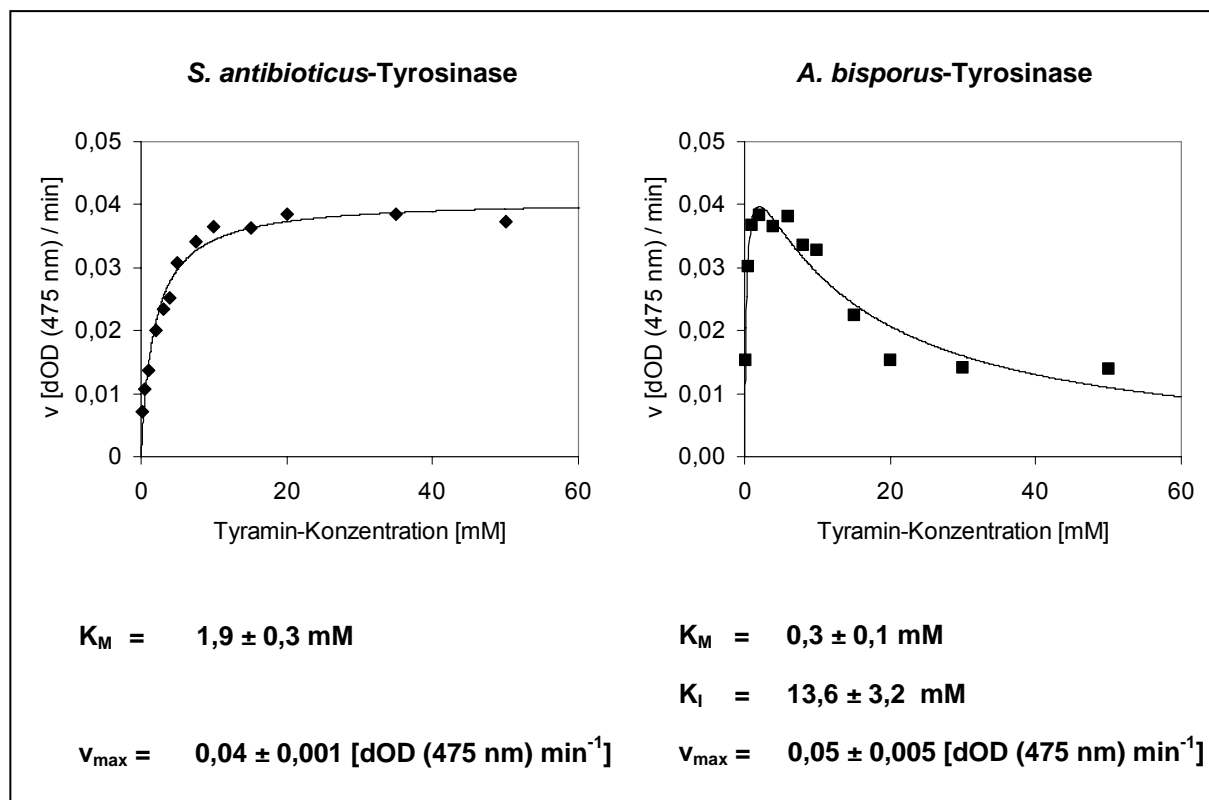


Abb. 3.43: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Tyramin-Konzentration (0,1-50 mM). Die Enzymmenge betrug in den dargestellten Messreihen $6,5 \pm 0,33$ nM bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase und $4,5 \pm 0,45$ nM bei der *A. bisporus*-Tyrosinase. Die \bar{R}^2 -Werte lagen bei 0,961 (*S. antibioticus*) und 0,911 (*A. bisporus*).

Aus den normierten v_{max} -Werten für Tyramin und Dopamin konnte auch das relative Verhältnis von Mono- zu Diphenolase-Aktivität bestimmt werden. Im Falle der *A. bisporus*-Tyrosinase lag dieses bei etwa 1:16 ($0,011$ zu $0,178$ [(dOD (475 nm) min⁻¹) / nM Tyrosinase]), bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase bei etwa 1:6 ($0,006$ zu $0,034$). Die Inhibitionskonstante K_I für die Substratinhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase durch Tyramin hatte den Wert $13,6 \pm 3,2$ mM und betrug damit etwa das 45-fache der K_M .

Für die Kinetik des Tyramin-Umsatzes existieren abermals nur für die *A. bisporus*-Tyrosinase bereits publizierte Daten. Die Angaben für den K_M -Wert liegen hierbei zwischen 0,51 mM [204] und 1,51 mM [205]. Eine Substratinhibition wurde in diesem Zusammenhang bislang noch nie beschrieben, ein Vergleichswert für K_I steht somit nicht zur Verfügung. k_{cat} wird mit 12,2 s⁻¹ [205] bis 25,9 s⁻¹ [208] angegeben. Die Wechselzahl ist damit 14 - 38mal kleiner, als bei Dopamin (177 - 475,1 s⁻¹). Eine Abschätzung der Wechselzahl anhand der in dieser Arbeit ermittelten v_{max} -Werte und des molaren Extinktionskoeffizienten von Dopaminchrom bei 480 nm ($\epsilon_{480} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lieferte für die *A. bisporus*-Tyrosinase den Wert $56 \pm 8 \text{ s}^{-1}$. Für die *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde ein Wert von $31 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ berechnet.

Der Umsatz von Tyramin durch die beiden eingesetzten Tyrosinasen zeigt ähnliche Charakteristika, wie der Umsatz von Dopamin. Während K_M bei der *A. bisporus*-Tyrosinase wesentlich kleiner ist, als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase, tritt nur bei der *A. bisporus*-Tyrosinase das Phänomen der Substratinhibition auf.

3.4.3.4 Umsatz von L-Tyrosin-Methylester

Die Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der L-Tyrosin-Methylester-Konzentration wurde nur für die *S. antibioticus*-Tyrosinase bestimmt. Der Umsatz von L-Tyrosin-Methylester durch die *A. bisporus*-Tyrosinase war selbst nach Erhöhung der Enzymkonzentration auf 18 nM kaum messbar.

Die Auswertung der Messreihe, sowie die ermittelten Enzym-Parameter sind in Abb. 3.44 dargestellt. Aufgrund der eindeutigen Sättigungs-Kinetik wurde für die Auswertung der Messreihe die klassische Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) verwendet. Hierdurch wurde ein K_M -Wert von $0,4 \pm 0,1 \text{ mM}$ ermittelt. Da für Dopachrom-Methylester kein Extinktionskoeffizient verfügbar war, erfolgte die Angabe der Reaktionsgeschwindigkeit in relativen Einheiten [dOD (475 nm) min⁻¹]. Die Abschätzung der Wechselzahl k_{cat} wurde anhand des v_{max} -Wertes und des molaren Extinktionskoeffizienten des Dopachroms ($\epsilon_{475} = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durchgeführt und ergab einen Wert von $8 \pm 2 \text{ s}^{-1}$.

Publizierte vergleichswerte lagen für die *S. antibioticus*-Tyrosinase nicht vor. Für die aufgereinigte, tetramere Tyrosinase aus *A. bisporus* wurden durch einen MBTH-Assay mit L-Tyrosin-Methylester hingegen in der Vergangenheit bereits K_M - und k_{cat} -Werte ermittelt [208]. Diese lagen bei 0,38 mM und 3,4 s⁻¹.

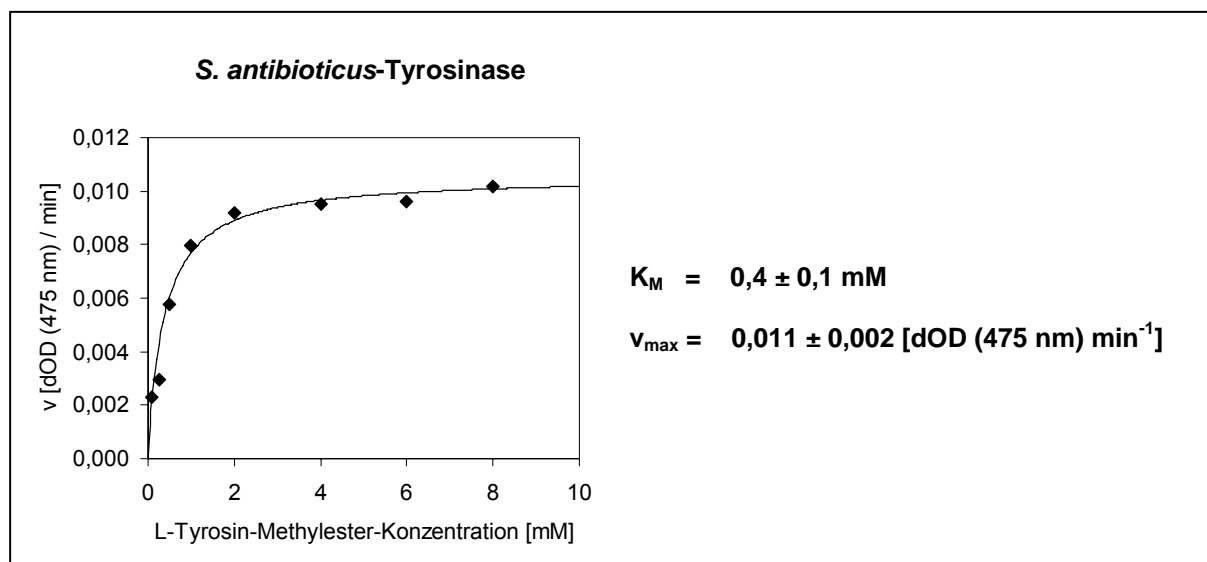


Abb. 3.44: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der L-Tyrosin-Methylester-Konzentration (0,1-10 mM). Die Enzymmenge betrug in der dargestellten Messreihe $6,5 \pm 0,33 \text{ nM}$, \bar{R}^2 lag bei 0,974.

Die für die verwendeten Substrate ermittelten Enzymparameter der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* sind in Tab. 3.10 zusammengefasst. Zusätzlich wurde durch den Quotienten k_{cat} / K_M ein Maß für die katalytische Effizienz angegeben, die außer im Falle des L-Tyrosin-Methylesters bei der *A. bisporus*-Tyrosinase deutlich höher ausfiel, als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase.

Tyrosinase		<i>S. antibioticus</i>	<i>A. bisporus</i>
L-Dopa	K_M (mM)	$8,0 \pm 0,6$	$0,26 \pm 0,01$
	k_{cat} (s^{-1})	1282 ± 89	378 ± 38
	k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	161 ± 16	1453 ± 53
Dopamin	K_M (mM)	$17,8 \pm 1,7^a$	$1,4 \pm 0,2$
	K_i (mM)	-	$32,7 \pm 4,2^a$
	k_{cat} (s^{-1})	171 ± 11^a	998 ± 113
	k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	10 ± 1	713 ± 108
Tyramin	K_M (mM)	$1,9 \pm 0,3^a$	$0,3 \pm 0,1$
	K_i (mM)	-	$13,6 \pm 3,2^a$
	k_{cat} (s^{-1})	31 ± 2^a	56 ± 8
	k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	17 ± 3	187 ± 62
L-Tyrosin-Methylester	K_M (mM)	$0,4 \pm 0,07^a$	$0,38 \pm 0,04^b$
	k_{cat} (s^{-1})	8 ± 2^a	$3,40 \pm 0,14^b$
	k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	21 ± 5	9 ± 1

Tab. 3.10: Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* für die untersuchten mono- und diphenolischen Substrate.

^a: keine publizierten Vergleichswerte vorhanden. ^b: übernommen aus [208].

Die Beobachtung, dass die Diphenolase-Reaktion gemessen an der Wechselzahl k_{cat} bei den untersuchten Tyrosinasen wesentlich schneller abläuft, als die Monophenolase-Reaktion, steht im Einklang mit bisherigen Studien an diesen Enzymen [67, 191, 204, 205, 207, 208] und kann direkt auf die molekularen Mechanismen dieser Reaktionen zurückgeführt werden [49, 50].

Sowohl für die meisten der für die *S. antibioticus*-Tyrosinase ermittelten Enzymparameter, als auch bezüglich der Substratinhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase durch Dopamin und Tyramin existieren bisher in der Literatur keinerlei Vergleichswerte. Es ist zudem sehr überraschend, dass von einer Substratinhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase in früheren Arbeiten niemals berichtet wurde.

In einer aktuellen Studie an einer hexameren Tyrosinase aus der Europäischen Languste *Palinurus elephas* konnte ebenfalls eine Substratinhibition durch Dopamin und Tyramin festgestellt werden [209]. Das unterschiedliche Verhalten von verschiedenen Tyrosinasen in Bezug auf Substratsättigung und Substratinhibition und vor allem dessen strukturelle Ursachen stellen somit einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende und vertiefende Studien dar.

3.4.4 Inhibition der Tyrosinase-Reaktion

Die Untersuchung der inhibierten Reaktionskinetik der Tyrosinase erfolgte zunächst mit dem gut charakterisierten, kompetitiven Inhibitor L-Mimosin, sowie dem bislang nur qualitativ untersuchten Hemmstoff Homocystein.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der inhibierende Einfluss von Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Tyrosinase untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt das Enzym aus *S. antibioticus* noch nicht zur Verfügung stand, wurden diese Messungen ausschließlich an der *A. bisporus*-Tyrosinase durchgeführt.

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgten die Messungen der inhibierten Reaktionskinetik unter den gleichen Bedingungen, wie die Messungen der uninhibierten Kinetik (siehe 3.4.3).

3.3.4.1 Inhibition durch Mimosin

Das Alkaloid Mimosin (α -Amino- β -[1-(3-hydroxy-4-oxopyridin)]-propionsäure) ist eine toxische, nicht-proteinogene Aminosäure, die aus den Blättern und Samen einiger Leguminosen, wie der namensgebenden Mimose (*Mimosa pudica*), isoliert werden kann [210].

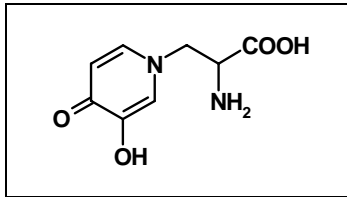
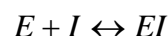


Abb. 3.45: Strukturformel von L-Mimosin, einem kompetitiven Inhibitor der Tyrosinase.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Tyrosinase-Substraten wie L-Tyrosin und L-Dopa inhibiert L-Mimosin die Tyrosinase reversibel und kompetitiv [211, 212]. Für die nicht-lineare Regression der Messdaten wurde deshalb neben der klassischen Auswertung unter Anwendung der unmodifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1), die Modell-Annahme zur kompetitiven Inhibition [213], eine erweiterte Form der Michaelis-Menten-Gleichung herangezogen:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (\text{Gl. 3}).$$

In diesem Modell konkurrieren Substrat (S) und Inhibitor (I) um das aktive Zentrum.



Die Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI), wird durch die Inhibitionskonstante K_I ausgedrückt, die die Dimension einer Inhibitor-Konzentration $[I]$ besitzt. Durch eine Erhöhung der Substratkonzentration $[S]$ kann die Wirkung des Inhibitors aufgehoben werden. v_{\max} bleibt dadurch konstant, während die Michaelis-Konstante K_M scheinbar erhöht wird. Diese scheinbare (apparente) K_M steht dabei in linearem Zusammenhang mit der Inhibitor-Konzentration:

$$K_{M(\text{apparent})} = \frac{K_M}{K_I} \cdot [I] + K_M \quad (\text{Gl. 4}).$$

Durch diese lineare Abhängigkeit ergibt sich bei der graphischen Auftragung von $K_{M(\text{apparent})}$ gegen $[I]$ eine Gerade mit der Steigung K_M / K_I .

Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate entspricht dabei dem Wert für K_M , der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht dem Wert für $-K_I$.

Zur Auswertung der Messdaten mit der klassischen Michaelis-Menten-Gleichung wurden die Regressionskurven für jede einzelne Datenreihe mittels Gl. 1 bestimmt, wodurch zunächst lediglich die Werte für v_{max} und K_M bzw. $K_M (apparent)$ erhalten wurden. Die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I erfolgte nach Gl. 4 aus dem Ergebnis einer gewichteten, linearen Regression der Auftragung von den ermittelten Werten für $K_M (apparent)$ gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration. Die simultane Anpassung aller Datenreihen mittels der erweiterten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3) ergab je einen Wert für v_{max} , K_M und K_I . Die Ergebnisse der Datenanpassung sind für die *S. antibioticus*-Tyrosinase in Abb. 3.46a und 3.46b, für die *A. bisporus*-Tyrosinase in Abb. 3.47a und 3.47b dargestellt. Die zugehörigen Enzym-Parameter sind in Tab. 3.11 bzw. 3.12 aufgeführt.

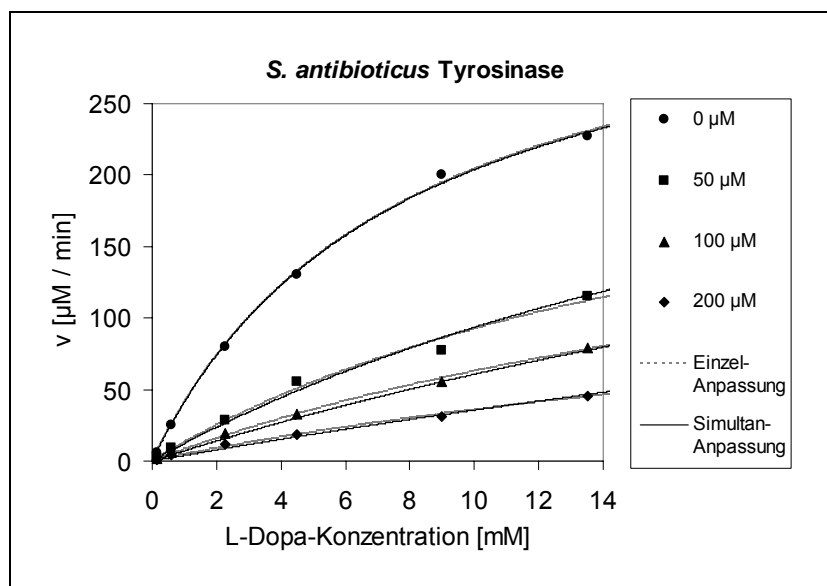


Abb. 3.46a: Inhibition der *S. antibioticus*-Tyrosinase durch 50, 100 und 200 μM L-Mimosin. Dargestellt sind sowohl die nicht-lineare Einzel-Anpassung, als auch die nicht-lineare Simultan-Anpassung der Messreihen in der direkten Auftragung. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $6,5 \pm 0,33 \text{ nM}$.

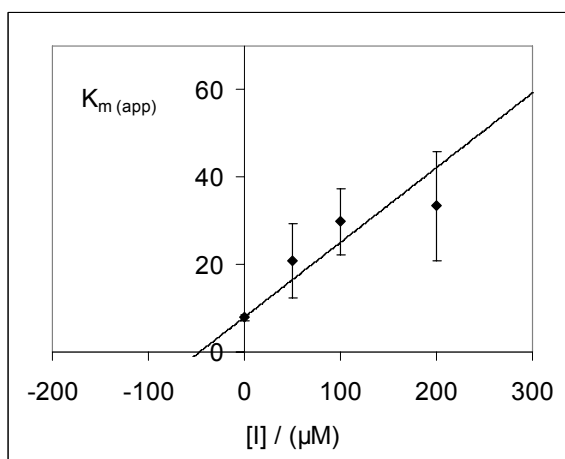


Abb. 3.46b: Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I der *S. antibioticus*-Tyrosinase für L-Mimosin aus der Einzel-Anpassung der Messreihen. Aufgetragen wurden die apparenten K_M -Werte gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration. Die lineare Regression erfolgte gewichtet, unter Berücksichtigung der einzelnen Standard-Fehler für $K_M (app)$ ($\bar{R}^2 = 0,860$). Die so ermittelte Inhibitionskonstante K_I hatte den Wert $53,8 \pm 7,4 \mu\text{M}$.

[Mimosin]	Einzel-Anpassung (nach Gl. 1):				Simultan-Anpassung (nach Gl. 3):
	0 μM	50 μM	100 μM	200 μM	
v_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	365,7 \pm 14,9	285,1 \pm 79,1	250,0 \pm 47,5	155,3 \pm 44,4	362,1 \pm 13,2
k_{cat} (s^{-1})	938 \pm 60	731 \pm 206	641 \pm 126	719 \pm 209	928 \pm 57
K_M (mM)	7,9 \pm 0,7	20,9 \pm 8,6*	29,8 \pm 7,6*	33,7 \pm 12,5*	7,8 \pm 0,6
K_I (μM)	53,8 \pm 7,4**				18,6 \pm 0,9
	$\bar{R}^2 = 0,998$	$\bar{R}^2 = 0,985$	$\bar{R}^2 = 0,996$	$\bar{R}^2 = 0,993$	$\bar{R}^2 = 0,997$

Tab. 3.11: Die Enzymparameter der *S. antibioticus*-Tyrosinase für die Inhibition durch L-Mimosin nach Einzel- und Simultan-Anpassung der Messreihen. * Apparente K_M -Werte ($K_{M(\text{app})}$). ** Bei der Einzel-Anpassung wurde die Inhibitionskonstante aus der Auftragung der $K_{M(\text{app})}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentration ermittelt (Abb. 3.46b).

Beide Regressionsalgorithmen lieferten sehr ähnliche Enzym-Parameter, wodurch der bereits vielfach belegte, kompetitive Charakter der Mimosin-Inhibition bestätigt werden konnte. Die für die *S. antibioticus*-Tyrosinase ermittelten Enzym-Parameter K_M und v_{\max} lagen in guter Übereinstimmung mit den für L-Dopa in Kapitel 3.4.3.1 bestimmten Werten. Für die Inhibitionskonstante K_I ergab sich nach der Simultan-Anpassung ein Wert von 18,6 μM , nach der Einzel-Anpassung von 53,8 μM . Beide Werte lagen somit in der gleichen Größenordnung, wie die von Bubacco *et al.* [191] bereits publizierte Inhibitionskonstante von 30,0 μM .

Die Diskrepanz der beiden aus den vorliegenden Messdaten bestimmten Werte beruht im Wesentlichen auf der Tatsache, dass der Grenzwert für die Reaktionsgeschwindigkeit in den dargestellten Kurven (Abb. 3.46a) nicht erreicht wurde und somit die Abhängigkeit des v_{\max} -Wertes von der Substrat-Konzentration bei der Einzel-Anpassung stark von dem Wert für K_M beeinflusst wird (Gl.1). Verdeutlicht wird das durch die in Tab. 3.11 aufgeführten v_{\max} -Werte, da diese mit steigender Inhibitor-Konzentration erheblich abnehmen, obwohl sie bei einer rein kompetitiven Inhibition konstant bleiben sollten. Des Weiteren wird aus der Auftragung von $K_{M(\text{app})}$ gegen $[I]$ (Abb. 3.46b) deutlich, dass der zu erwartende, lineare Zusammenhang nur unzureichend gegeben ist, wodurch die auf diese Weise ermittelte Inhibitionskonstante einen wesentlich größeren Fehlerwert aufweist, als die in der Simultan-Anpassung bestimmte Inhibitionskonstante. Somit stellt letztere eine verlässlichere Näherung an die tatsächliche K_I dar, deren exakter Wert aufgrund der fehlenden Substratsättigung nicht genau bestimmbar ist.

Bei der Auswertung der Messdaten, die mit der *A. bisporus*-Tyrosinase erhalten wurden, kam die oben geschilderte Problematik weit weniger zum Tragen. Das frühe Erreichen einer Substrat-Sättigung, führte bei der Einzel-Anpassung in allen Fällen zu ähnlich großen v_{max} -Werten, wodurch die ermittelten Inhibitionskonstanten bei beiden Anpassungsverfahren mit $6,3 \pm 3,7 \mu\text{M}$ bzw. $7,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ sehr nahe beieinander lagen. Dennoch führte die Schwankung in den v_{max} -Werten erneut zu einem deutlich größeren Fehlerwert der K_I bei der klassischen Auswertung aus der Einzel-Anpassung, als bei der K_I aus der Simultan-Anpassung.

Insgesamt ist der Unterschied beider Regressionsalgorithmen in den resultierenden Werten jedoch als gering einzustufen, weshalb die mittels Simultan-Anpassung bestimmten Werte, sowie die zugrunde liegende Modell-Annahme (Gl. 3) als gesichert angesehen werden können.

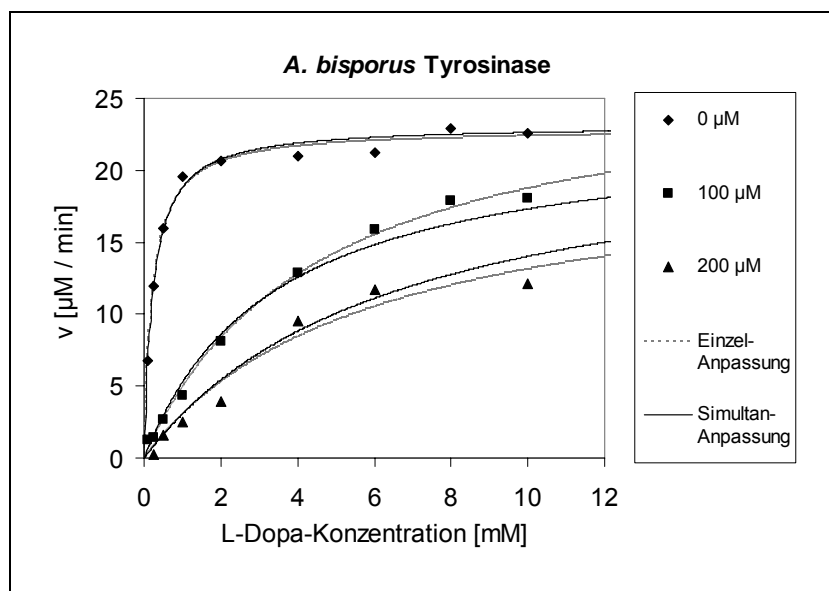


Abb. 3.47a: Inhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase durch 100 und 200 μM L-Mimosin.

Dargestellt sind sowohl die nicht-lineare Einzel-Anpassung, als auch die nicht-lineare Simultan-Anpassung der Messreihen in der direkten Auftragung.

Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $0,9 \pm 0,09 \text{ nM}$.

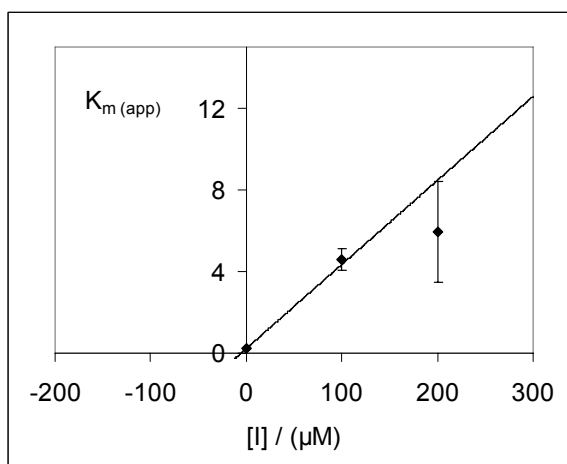


Abb. 3.47b: Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I der *A. bisporus*-Tyrosinase für L-Mimosin.

Aufgetragen wurden die apparenten K_M -Werte gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration. Die lineare Regression erfolgte gewichtet, unter Berücksichtigung der einzelnen Standard-Fehler für $K_{M(app)}$ ($\bar{R}^2 = 0,918$).

Die so ermittelte Inhibitionskonstante K_I hatte den Wert $6,3 \pm 3,7 \mu\text{M}$.

[Mimosin]	Einzel-Anpassung (nach Gl. 1):			Simultan-Anpassung (nach Gl. 3):
	0 μM	100 μM	200 μM	
v_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	22,8 \pm 0,3	27,3 \pm 1,4	20,9 \pm 4,4	23,2 \pm 0,4
k_{cat} (s^{-1})	422 \pm 43	505 \pm 57	388 \pm 90	429 \pm 44
K_M (mM)	0,22 \pm 0,02	4,6 \pm 0,53 [*]	5,9 \pm 2,5 [*]	0,23 \pm 0,03
K_i (μM)	6,3 \pm 3,7^{**}			7,3 \pm 0,8
	$\bar{R}^2 = 0,988$	$\bar{R}^2 = 0,995$	$\bar{R}^2 = 0,952$	$\bar{R}^2 = 0,988$

Tab. 3.12: Die Enzymparameter der *A. bisporus*-Tyrosinase für die Inhibition durch L-Mimosin nach Einzel- und Simultan-Anpassung der Messreihen. ^{*} Apparente K_M -Werte ($K_{M(\text{app})}$). ^{**} Bei der Einzel-Anpassung wurde die Inhibitionskonstante aus der Auftragung der $K_{M(\text{app})}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentration ermittelt (Abb. 3.47b).

Für die *A. bisporus*-Tyrosinase wurden ebenfalls Werte ermittelt, die von denen aus Kapitel 3.4.3.1 nur geringfügig abwichen. Die Inhibitionskonstante K_i lag sowohl nach der Einzel-Anpassung, als auch nach der Simultan-Anpassung sehr nahe an dem von Golicnik und Stojan [214] ermittelten Wert von 7,9 μM .

Somit konnten unter Berücksichtigung der Modellannahme zur kompetitiven Inhibition für beide Tyrosinasen sehr verlässliche Enzym-Parameter für den L-Dopa-Umsatz und die Hemmung des Umsatzes durch L-Mimosin bestimmt werden.

In Tab. 3.13 sind diese Werte noch einmal zusammengefasst und den Werten aus Kapitel 3.4.3.1 gegenübergestellt, wobei für die inhibierte Kinetik lediglich auf die Ergebnisse der Simultan-Anpassung zurückgegriffen wurde.

Tyrosinase	<i>S. antibioticus</i>		<i>A. bisporus</i>	
	L-Mimosin-Inhibition	uninhibiert	L-Mimosin-Inhibition	uninhibiert
k_{cat} (s^{-1})	928 \pm 57	1282 \pm 89	429 \pm 44	378 \pm 38
K_M (mM)	7,8 \pm 0,6	8,0 \pm 0,6	0,23 \pm 0,03	0,26 \pm 0,01
K_i (μM)	18,6 \pm 0,9	-	7,3 \pm 0,8	-

Tab. 3.13: Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* für den uninhibierten und den durch Mimosin inhibierten Umsatz von L-Dopa.

3.4.4.2 Inhibition durch Homocystein

Homocystein ist eine nicht-proteinogene, schwefelhaltige Aminosäure, die im Stoffwechsel von Säugetieren bei der Demethylierung von Methionin entsteht. Aufgrund seiner Cytotoxizität wird Homocystein in diesen Organismen bei ausreichender Versorgung mit Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ rasch zu Cystein metabolisiert.

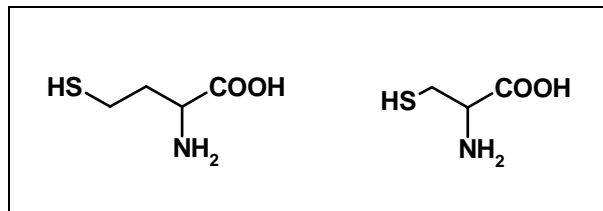


Abb. 3.48: Strukturformeln von L-Homocystein (links) und L-Cystein (rechts). Im Gegensatz zum strukturell sehr ähnlichen Cystein ist Homocystein kein Substrat der Phaeomelanin-Synthese, sondern es inhibiert die Aktivität der Tyrosinase

Das im Blutplasma des Menschen zirkulierende Homocystein stellt oberhalb des normalen Konzentrationsbereichs von 5 - 15 μM einen bekannten Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen dar [215] und kann zudem bei unterschiedlichen Krebs-erkrankungen auf Tumorwachstum hindeuten [216]. Patienten mit einer genetisch bedingten Störung der Cystathion- β -Synthase, dem Enzym das Homocystein über Cystathion zu Cystein abbaut, weisen häufig neben erhöhten Homocystein-Werten auch eine Hypopigmentierung auf [217]. Diese konnte zwar bereits auf die Inhibition der Tyrosinase durch Homocystein zurückgeführt werden, eine genaue Charakterisierung der Inhibition erfolgte bislang jedoch nicht.

Die hier durchgeführte Untersuchung der Inhibition der Tyrosinase durch Homocystein erfolgte abermals an den Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus*. Die Auswertung der Messdaten erbrachte eine offensichtlich kompetitive Inhibition, weshalb für die Bestimmung der Enzymparameter wie auch schon beim Mimosin (siehe 3.4.4.1) auf die entsprechende Modell-Annahme (Gl. 3) zurückgegriffen wurde. Gestützt wurde diese Annahme durch die bereits formulierte Hypothese, dass Homocystein über seine freie Sulfhydrylgruppe mit den Kupfer-Ionen der Tyrosinase wechselwirkt, da durch die Zugabe von Kupfersulfat der Einfluss von Homocystein auf die Aktivität humaner Melanom-Zellen-Tyrosinase aufgehoben werden konnte [217]. Zusätzlich wurde die Auswertung der Daten unter Anwendung der unmodifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) durchgeführt, um das Vorliegen der kompetitiven Inhibition zu bekräftigen.

Die Ergebnisse der Datenanpassung sind für die *S. antibioticus*-Tyrosinase in Abb. 3.49a und 3.49b, für die *A. bisporus*-Tyrosinase in Abb. 3.50a und 3.50b dargestellt. Die zugehörigen Enzym-Parameter sind in Tab. 3.14 bzw. 3.15 aufgeführt.

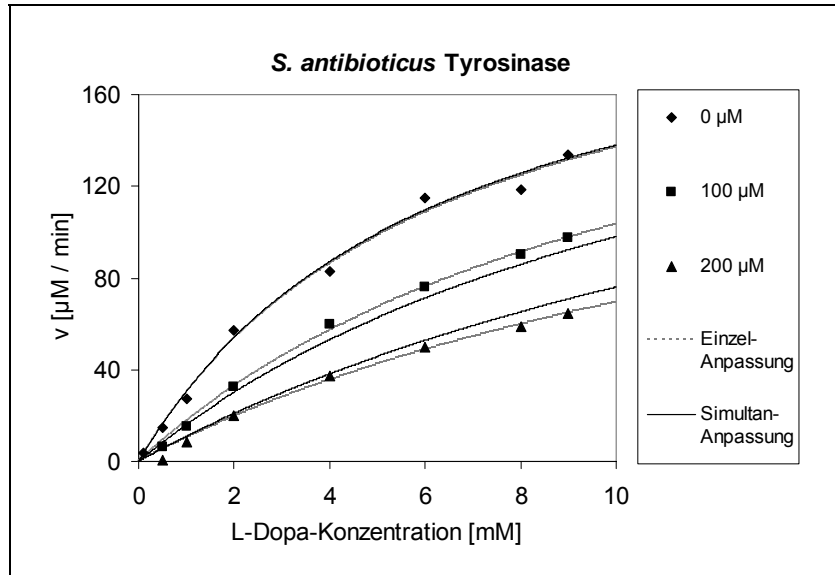


Abb. 3.49a: Inhibition der *S. antibioticus*-Tyrosinase durch 100 und 200 μM DL-Homocystein. Dargestellt sind sowohl die nicht-lineare Einzel-Anpassung, als auch die nicht-lineare Simultan-Anpassung der Messreihen in der direkten Auftragung. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $3,75 \pm 0,2 \text{ nM}$.

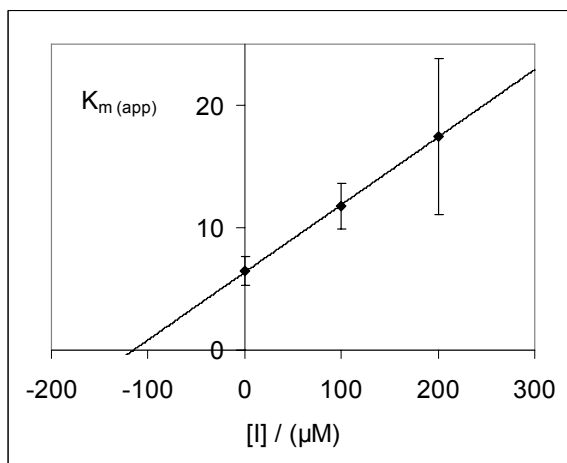


Abb. 3.49b: Bestimmung der Inhibitionskonstante K_I der *S. antibioticus*-Tyrosinase für DL-Homocystein. Aufgetragen wurden die apparenten K_M -Werte gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration. Die lineare Regression erfolgte gewichtet, unter Berücksichtigung der einzelnen Standard-Fehler für $K_{M(\text{app})}$ ($\bar{R}^2 = 0,999$). Die so ermittelte Inhibitionskonstante K_I hatte den Wert $114,9 \pm 17,1 \mu\text{M}$.

Die aus den beiden Regressions-Algorithmen resultierenden Werte für die Enzym-Parameter der *S. antibioticus*-Tyrosinase lagen sehr nahe beieinander, wodurch der kompetitive Charakter der Inhibition durch Homocystein bereits indirekt bestätigt wurde. Zudem war die zu erwartende Linearität in der Abhängigkeit der apparenten K_M von der Inhibitor-Konzentration eindeutig gegeben, was als ein sicheres Merkmal für eine rein kompetitive Inhibition angesehen wird [213].

[Homocystein]	Einzel-Anpassung (nach Gl. 1):			Simultan-Anpassung (nach Gl. 3):
	0 μM	100 μM	200 μM	
v_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	225,3 \pm 21,3	224,9 \pm 22,9	190,1 \pm 49,6	225,5 \pm 18,8
k_{cat} (s^{-1})	1001 \pm 107	1000 \pm 113	845 \pm 225	1002 \pm 97
K_M (mM)	6,5 \pm 1,2	11,7 \pm 1,9*	17,4 \pm 6,4*	6,3 \pm 1,0
K_I (μM)	114,9 \pm 17,1**			95,2 \pm 10,4
	$\bar{R}^2 = 0,992$	$\bar{R}^2 = 0,996$	$\bar{R}^2 = 0,989$	$\bar{R}^2 = 0,987$

Tab. 3.14: Enzymparameter der *S. antibioticus*-Tyrosinase für die Inhibition durch DL-Homocystein nach Einzel- und Simultan-Anpassung der Messreihen. * Apparente K_M -Werte ($K_{M(\text{app})}$). ** Bei der Einzel-Anpassung wurde die Inhibitionskonstante aus der Auftragung der $K_{M(\text{app})}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentration ermittelt (Abb. 3.49b).

Da die Inhibition durch Homocystein, verglichen mit der Inhibition durch Mimosin deutlich schwächer ausfiel, waren auch die Abweichungen der v_{\max} -Werte von ihrem Mittelwert weit geringer, als bei Mimosin. Dadurch hatten die ermittelten Inhibitionskonstanten bei beiden Anpassungsverfahren sehr ähnliche Werte mit ebenfalls ähnlichen Fehlerwerten. Die Werte für die Michaelis-Konstante fielen jedoch mit 6,5 \pm 1,2 mM bzw. 6,3 \pm 1,0 mM verglichen mit den bisher bestimmten Werten verhältnismäßig niedrig aus (siehe 3.4.3.1 und 3.4.4.1).

Die *A. bisporus*-Tyrosinase zeigte bei der Inhibition durch Homocystein ein ähnliches Bild, wie die *S. antibioticus*-Tyrosinase. Auch hier konnte auf das Vorliegen einer kompetitiven Inhibition durch den Vergleich der Enzym-Parameter aus der Einzel- und der Simultan-Anpassung geschlossen werden.

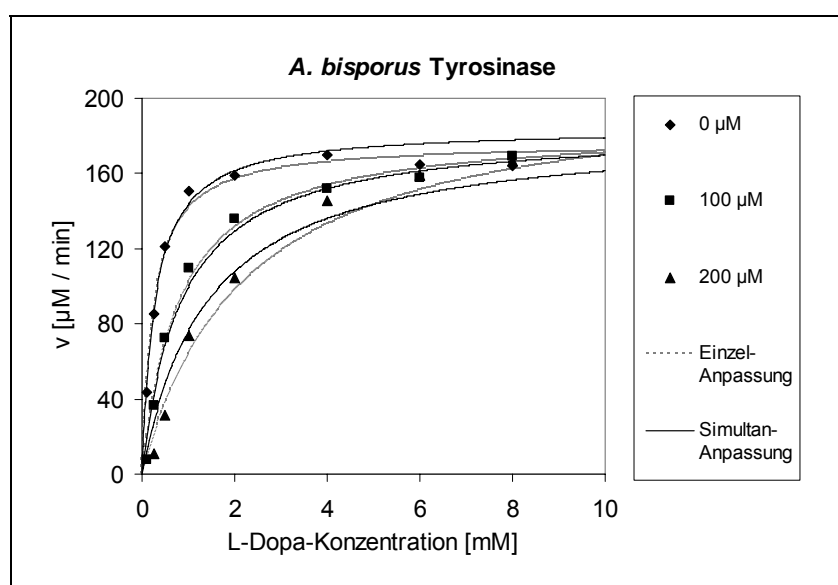


Abb. 3.50a: Inhibition der *A. bisporus*-Tyrosinase durch DL-Homocystein. Dargestellt sind sowohl die nicht-lineare Einzel-Anpassung, als auch die nicht-lineare Simultan-Anpassung der Messreihen in der direkten Auftragung. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen 7,2 \pm 0,7 nM.

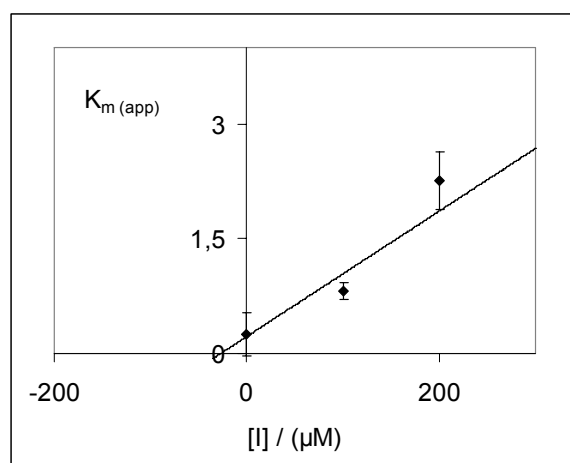


Abb. 3.50b: Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der *A. bisporus*-Tyrosinase für DL-Homocystein.

Aufgetragen wurden die apparenten K_M -Werte gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration.

Die lineare Regression erfolgte gewichtet, unter Berücksichtigung der einzelnen Standard-Fehler für $K_{M(app)}$ ($\bar{R}^2 = 0,835$).

Die so ermittelte Inhibitionskonstante K_i hatte den Wert $49,8 \pm 8,7 \mu\text{M}$.

Da eine Linearität in der Abhängigkeit der apparenten K_M von der Inhibitor-Konzentration in diesem Fall nur annähernd erfüllt war, ergab sich eine starke Abweichung der resultierenden Inhibitionskonstante von dem mittels Simultan-Anpassung bestimmten Wert, wobei erstere zusätzlich mit einem sehr hohen Fehlerwert ($\pm 80\%$) behaftet war.

[Homocystein]	Einzel-Anpassung (nach Gl. 1):			Simultan-Anpassung (nach Gl. 3):
	0 μM	100 μM	200 μM	
v_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	$176,5 \pm 4,0$	$184,8 \pm 0,8$	$208,2 \pm 13,4$	$184,1 \pm 4,3$
k_{cat} (s^{-1})	408 ± 42	428 ± 47	482 ± 57	426 ± 44
K_M (mM)	$0,25 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,11^*$	$2,26 \pm 0,37^*$	$0,28 \pm 0,04$
K_i (μM)	$26,9 \pm 21,7^{**}$			$49,8 \pm 8,7$
	$\bar{R}^2 = 0,980$	$\bar{R}^2 = 0,986$	$\bar{R}^2 = 0,986$	$\bar{R}^2 = 0,974$

Tab. 3.15: Enzymparameter der *A. bisporus*-Tyrosinase für die Inhibition durch DL-Homocystein nach Einzel- und Simultan-Anpassung der Messreihen. * Apparente K_M -Werte ($K_{M(app)}$). ** Bei der Einzel-Anpassung wurde die Inhibitionskonstante aus der Auftragung der $K_{M(app)}$ -Werte gegen die Inhibitor-Konzentration ermittelt (Abb. 3.50b).

Insgesamt konnte durch das Ergebnis der Datenanpassung für beide Tyrosinasen eine kompetitive Inhibition durch Homocystein bestätigt werden und unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Modell-Annahme konnten verlässliche Enzym-Parameter bestimmt werden.

In Tab. 3.16 sind diese Werte zusammengefasst und den Werten aus Kapitel 3.4.3.1 gegenübergestellt. Für die inhibierte Kinetik wurde aufgrund der insgesamt niedrigeren Fehlerwerte lediglich auf die Ergebnisse der Simultan-Anpassung zurückgegriffen.

Tyrosinase	<i>S. antibioticus</i>		<i>A. bisporus</i>	
	DL-Homocystein-Inhibition	uninhibiert	DL-Homocystein-Inhibition	uninhibiert
k_{cat} (s^{-1})	1002 ± 97	1282 ± 89	426 ± 44	378 ± 38
K_M (mM)	6,3 ± 1,0	8,0 ± 0,6	0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,01
K_i (μM)	95,2 ± 10,4	-	49,8 ± 8,7	-

Tab. 3.16: Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* für den uninhibierten und den durch Homocystein inhibierten Umsatz von L-Dopa.

3.4.5 Einfluss von Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Tyrosinase

Einige der bekannten, positiven Effekte von Wein, insbesondere von Rotwein auf die menschliche Gesundheit werden vermutlich durch dessen polyphenolische Komponenten (Anthocyanidine, Flavonole und phenolische Säuren) hervorgerufen. Ihre Fähigkeit zum Abfangen freier Radikale und zur Verminderung der Oxidation von *low-density* Lipoproteinen (LDL) ist *in vitro* mehrfach beschrieben worden und wird oft mit einer protektiven Wirkung gegenüber koronaren Herzerkrankungen in Zusammenhang gebracht [218-220]. Des Weiteren hemmen polyphenolische Verbindungen aus Weinen, sowie aus verschiedenen anderen Pflanzen und deren Produkten in unterschiedlichen experimentellen Modellsystemen die Karzinogenese und das Wachstum einiger Tumore [221]. Auch die Proliferation humaner Melanom-Zellen konnte in Gegenwart polyphenolischer Weininhaltsstoffe drastisch eingeschränkt werden. In derselben Studie konnte gleichzeitig auch ein signifikanter Effekt dieser Verbindungen auf die Tyrosinase-Aktivität in (nicht-tumorigenen) humanen Melanocyten beobachtet werden [222]. In wie weit ein kausaler Zusammenhang zwischen den beobachteten Effekten besteht, konnte jedoch experimentell nicht belegt werden.

Angeregt durch diese Arbeiten wurde im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen über die Kinetik der Tyrosinase-Reaktion auch der Einfluss von Inhaltsstoffen hiesiger Weine auf die Aktivität des Enzyms betrachtet.

Eine Isolation der einzelnen phenolischen Komponenten erfolgte aufgrund der fehlenden technischen Möglichkeiten nicht, weshalb eine detaillierte Analyse der Wechselwirkung an dieser Stelle nicht durchgeführt werden konnte. Die Messungen der Tyrosinase-Aktivität erfolgten daher polarographisch in nahezu unbehandeltem Flaschenwein, bei dem lediglich der pH-Wert mit 0,1 M KOH von 3,0 - 3,6 auf 7,0 erhöht wurde, um die Aktivität bei einem für das Enzym geeigneten pH-Wert zu bestimmen. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml, als Substrat für die Tyrosinase-Reaktion wurde das Diphenol Dopamin gewählt. Bei den verwendeten Weinen handelte es sich um lokale Erzeugnisse (Rheinhessen-Weine), wobei neben zwei Rotweinen (Spätburgunder und Dornfelder) auch ein Weißwein (Riesling) eingesetzt wurde. Alle drei Weine entstammten demselben Jahrgang (2001). Als Kontrollmessungen diente die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Tyrosinase in Phosphatpuffer, sowie in Phosphatpuffer, der auf den gleiche Alkoholgehalt (in %Vol) eingestellt wurde, wie der jeweils betrachtete Wein. Auf diese Weise konnte der Einfluss des denaturierenden Ethanol auf die Enzym-Aktivität von der inhibierenden Wirkung der Inhaltsstoffe abgegrenzt werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden direkt aus dem Sauerstoffverbrauch abgelesen, wobei der Umsatz von einem Mol Sauerstoff dem Umsatz von zwei Mol Diphenol entsprach. Oxidative Folgereaktionen, die überwiegend autokatalytisch ablaufen, konnten hierbei aufgrund ihrer geringen Geschwindigkeit in den ersten Minuten der Reaktion vernachlässigt werden. Durchgeführt wurden die Messungen ausschließlich mit der *A. bisporus*-Tyrosinase, da das Enzym aus *S. antibioticus* zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht zur Verfügung stand. Da die Mechanismen der beobachtbaren Inhibition der Tyrosinase aufgrund der fehlenden Möglichkeiten zur Isolation der relevanten Weinhaltstoffe nicht näher charakterisiert werden konnten, erschien ein Vergleich der beiden Enzyme bezüglich der Inhibition zu einem späteren Zeitpunkt auch nicht reizvoll.

In Abb. 3.51 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten der *A. bisporus*-Tyrosinase in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Phosphatpuffer, sowie in Rotwein (Spätburgunder) und Weißwein (Riesling) gegen die Substrat-Konzentration aufgetragen, die aus der Datenanpassung mittels Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) bestimmten Kinetik-Parameter sind in Tab. 3.17 aufgeführt. Aus den jeweiligen Werten für v_{max} wurden die relativen Tyrosinase-Aktivitäten in den verschiedenen Reaktionsmedien berechnet. Diese sind in Tab. 3.18 wieder gegeben.

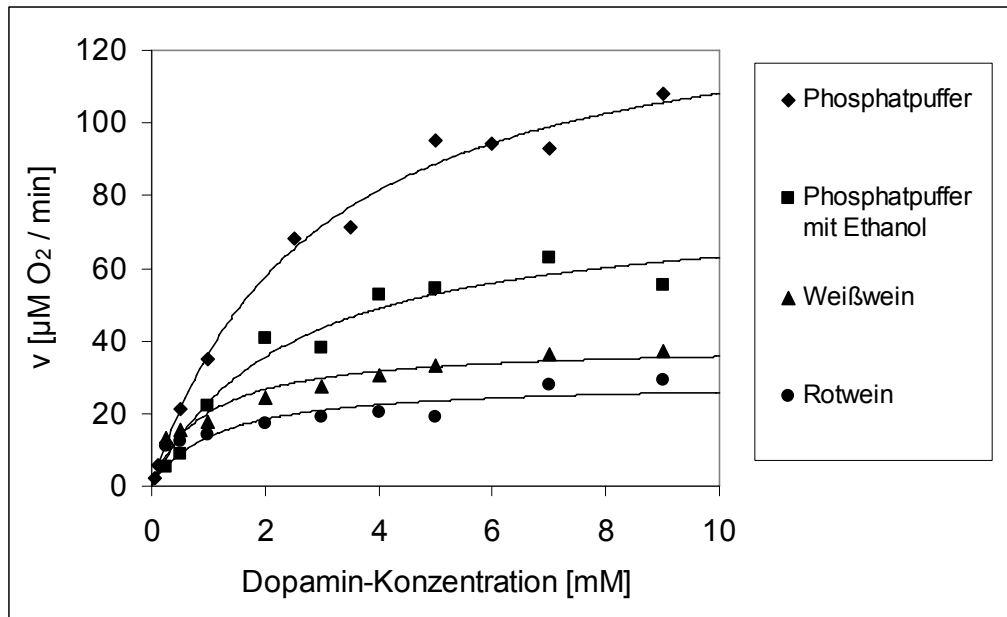


Abb. 3.51: Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase aus *A. bisporus* in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration (0,1-10 mM), gemessen in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, in Weißwein (Riesling), sowie in Rotwein (Spätburgunder) bei 25°C. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $3,6 \pm 0,36$ nM. Der Alkoholgehalt lag im ethanolhaltigem Phosphatpuffer, wie auch in den beiden Weinen bei 11,5 %Vol.

Medium	Puffer	Puffer mit Ethanol	Weißwein (Riesling)	Rotwein (Spätburgunder)
v_{\max} ($\mu\text{M O}_2 \text{ min}^{-1}$)	$138,4 \pm 7,1$	$78,1 \pm 7,9$	$39,0 \pm 2,5$	$28,9 \pm 3,4$
v_{\max} ($\mu\text{M Dopamin min}^{-1}$)	$276 \pm 14,2$	$156,2 \pm 15,8$	$78,0 \pm 5,0$	$37,8 \pm 6,8$
k_{cat} (s^{-1})	1281 ± 144	724 ± 104	361 ± 43	267 ± 41
K_M (mM)	$2,8 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,5$
	$\bar{R}^2 = 0,991$	$\bar{R}^2 = 0,949$	$\bar{R}^2 = 0,987$	$\bar{R}^2 = 0,689$

Tab. 3.17: Kinetik-Parameter der Tyrosinase-Reaktion, ermittelt aus der in Abb. 3.51 dargestellten Datenanpassung unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung.

Der v_{\max} -Wert für lag für den uninhibierten Dopamin-Umsatz bei $69,2 \pm 3,6 \mu\text{M min}^{-1}$ und entsprach somit einer k_{cat} von $1281 \pm 144 \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert lag deutlich oberhalb der k_{cat} , die photometrisch mittels Dopachrom-Assay bestimmt und mit $998 \pm 113 \text{ s}^{-1}$ angegeben wurde (siehe 3.4.3.2). Auch die Michaelis-Konstante wich mit $2,8 \pm 0,4 \text{ mM}$ stark von dem an jener Stelle ermittelten Wert von $1,4 \pm 0,2 \text{ mM}$ ab.

Während die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Ethanol stark abnahm, blieb die Michaelis-Konstante im Rahmen der Fehlergrenzen nahezu unverändert.

Bei der gleichzeitigen Gegenwart der nicht näher spezifizierten Weininhaltsstoffe wurde die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich stärker abgesenkt, der Wert für K_M wurde dabei jedoch unerwarteter Weise erniedrigt, was dafür spricht, dass keine rein reversible Inhibition der Tyrosinase durch diese Inhaltsstoffe vorlag. Deren Einfluss konnte somit nur qualitativ in Form der relativen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wiedergegeben werden.

Die recht hohe Abweichung der hier ermittelten Kinetik-Parameter der uninhibierten Reaktion von denen, die in Kapitel 3.4.3.2 für den Umsatz von Dopamin bestimmt wurden, ist auf die relative Ungenauigkeit der polarographischen Messmethode zurück zu führen, da diese deutlich weniger sensitiv ist, als photometrische Methoden. Somit war die Streuung der Messpunkte um die jeweiligen Regressionskurven vergleichsweise groß. Außerdem wurde bei der O₂-Verbrauchsmessung ein deutlich kleinerer Substrat-Konzentrationsbereich abgedeckt, weshalb die Auswertung ohne die Berücksichtigung einer Substrat-Inhibition durch Dopamin erfolgte.

Medium	Puffer	Puffer mit Ethanol	Weißwein (Riesling)	Rotwein (Spätburgunder)	Rotwein (Dornfelder)
Tyrosinase-Aktivität	100 ± 6,1 %	56,4 ± 6,4 %	28,2 ± 2,3 %	20,8 ± 2,6 %	17,3 ± 1,9 %
	-	100 ± 10,2 %	49,9 ± 6,0 %	36,9 ± 4,2 %	24,8 ± 3,5 %

Tab. 3.18: Aktivität der Tyrosinase aus *A. bisporus* gegenüber Dopamin in alkoholfreiem und alkohohaltigem Puffer, in Weißwein, sowie in zwei Rotweinen. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $3,6 \pm 0,36$ nM. Der Alkoholgehalt lag in Riesling und Spätburgunder bei 11,5 %Vol, in Dornfelder bei 13,5 %Vol. Die Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität in Dornfelder wurde in einer separaten Messreihe durchgeführt. Die Abweichungen der relativen Aktivitäten wurden aus den Fehlerwerten der zugrunde liegenden v_{max} -Werte bestimmt.

In weiteren Untersuchungen wurde der hemmende Einfluss von Weininhaltsstoffen auf die Tyrosinase in Abwesenheit von Ethanol gemessen. Hierfür wurde zum einen alkoholfreier Rotwein (Bordeaux), zum anderen der Inhalt von nahrungsergänzenden Rotweinkapseln eingesetzt. Bei dem alkoholfreien Rotwein handelte es sich um ein französisches Produkt aus kontrolliert biologischem Anbau, dem nach dem Entzug des Alkohols durch Vakuum-Destillation rektifiziertes Traubenmostkonzentrat, Kohlensäure und Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Die Rotweinkapseln (Alsiroyal GmbH, Greifenberg) beinhalteten pro Kapsel 100 mg Rotwein-Extrakt, was laut Hersteller 95 mg Polyphenole entsprach. Angaben zur genauen Zusammensetzung der enthaltenen Polyphenole lagen nicht vor.

Die Messungen der Tyrosinase-Aktivität erfolgten polarographisch bei 25 °C in Dreifachbestimmungen mit 10 mM Dopamin als Substrat. Das Reaktionsvolumen lag bei 1 ml. Auf eine konzentrationsabhängige Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde verzichtet. Der alkoholfreie Rotwein wurde auf pH 7,0 eingestellt und unverdünnt eingesetzt, die Messungen mit dem Rotweinkapsel-Inhalt erfolgten in Phosphatpuffer, dem 100 µl des flüssigen Kapsel-Inhalts zugegeben wurden. Dies entsprach etwa dem Inhalt einer Kapsel und ergab somit eine Polyphenol-Konzentration von 95 mg/ml. Als Kontrolle diente die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in reinem Phosphatpuffer. Die relative Aktivität der Tyrosinase in den geschilderten Ansätzen ist in Tab. 3.19 wiedergegeben.

Medium	Puffer	Rotweinkapsel-Inhalt	Rotwein, alkoholfrei
Tyrosinase-Aktivität	100 ± 2,9 %	53,8 ± 7,0 %	28,2 ± 6,0 %

Tab. 3.19: Aktivität der Tyrosinase aus *A. bisporus* gegenüber Dopamin in reinem Puffer, in Gegenwart von Rotweinkapsel-Inhaltsstoffen, sowie in alkoholfreiem Rotwein. Die Enzymkonzentration betrug bei allen Messungen $3,6 \pm 0,36$ nM. Die Abweichungen der relativen Aktivitäten wurden aus den Standardabweichungen von Mehrfachmessungen der Aktivität bestimmt.

Die deutliche Inhibition der Tyrosinase-Reaktion bestätigte den bereits in den Weinen beobachteten hemmenden Einfluss der polyphenolischen Weininhaltsstoffe auf die Aktivität des Enzyms. In Abb. 3.52 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammenfassend dargestellt.

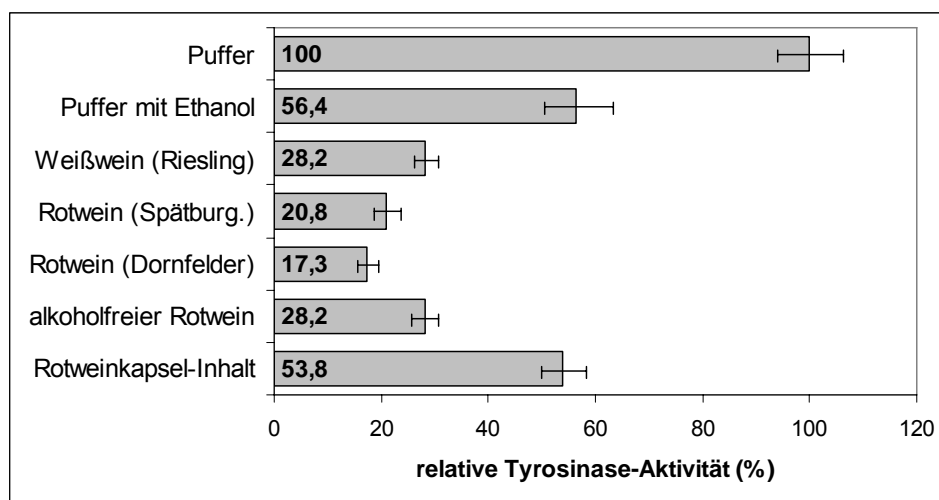


Abb. 3.52: Einfluss von Ethanol, Wein und extrahierten Weininhaltsstoffen auf die Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase aus *A. bisporus*.

Mit den durchgeführten Messungen konnte die hemmende Wirkung von Wein-Polyphenolen auf die Aktivität der Tyrosinase belegt werden. Um zu demonstrieren, dass dieser Effekt spezifisch für Tyrosinasen ist und nicht auch andere Oxidoreduktasen betrifft, wurden Kontrollmessungen mit dem Enzym Uricase (Urat-Oxidase, E.C. 1.7.3.3) durchgeführt. Die Uricase katalysiert im Purinstoffwechsel vieler wirbelloser Tiere und Säugetiere unter Verbrauch molekularen Sauerstoffs den Abbau von Harnsäure sowie harnsaurer Salze zu Allantoin und besitzt ein einkerniges Typ-2-Kupferzentrum [223]. Das hier verwendete Enzym aus der Leber von Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) lag als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 125 kDa vor [224].

Die Bestimmung der Uricase-Aktivität erfolgte polarographisch bei 25 °C und pH 8,5 mit 0,1-0,5 mM Harnsäure (2,6,8-Trihydroxypurin), wobei der Verbrauch von einem Mol Sauerstoff dem Umsatz von einem Mol Harnsäure entsprach. Die Messungen erfolgten analog zu den Ansätzen mit Tyrosinase zum einen in Rotwein (Spätburgunder), zum anderen in Tris-Puffer, sowie in Tris-Puffer mit 11,5 %Vol Ethanol. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 3.53 dargestellt, die aus der Datenanpassung bestimmten Kinetik-Parameter sind in Tab. 3.20 aufgeführt. Aus den jeweiligen Werten für v_{max} wurden die relativen Uricase-Aktivitäten in den verschiedenen Reaktionsmedien berechnet. Diese sind in Tab. 3.21 wieder gegeben.

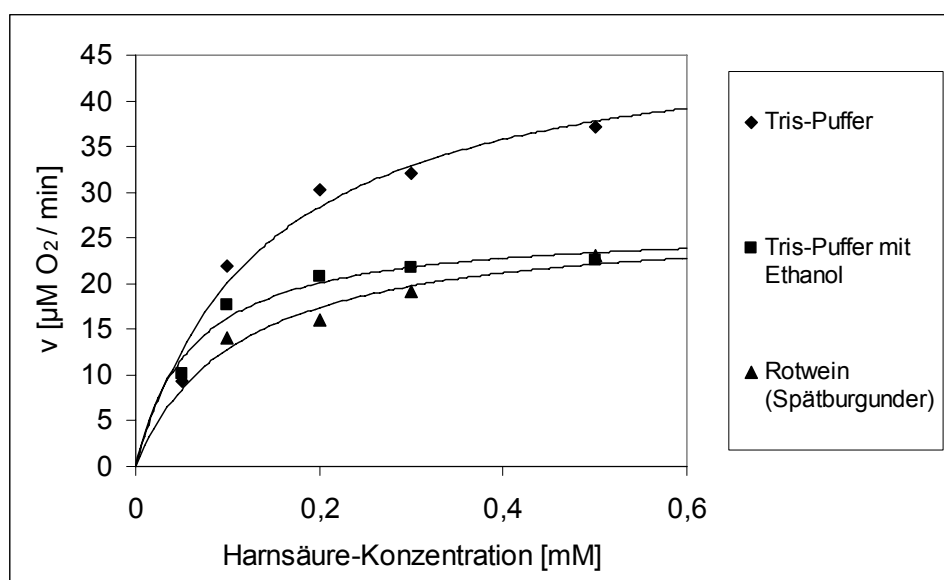


Abb. 3.53: Aktivität der Uricase aus *S. scrofa* in Abhängigkeit von der Harnsäure-Konzentration (0,1-0,5 mM), gemessen in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, sowie in Rotwein (Spätburgunder) bei 25°C. Die Enzymmenge betrug bei allen Messungen $0,3 \pm 0,03$ U. Der Alkoholgehalt lag im ethanolhaltigem Tris-Puffer, wie auch im Wein bei 11,5 %Vol.

Medium	Puffer	Puffer mit Ethanol	Rotwein (Spätburgunder)
v_{max} ($\mu\text{M Harnsäure min}^{-1}$)	$48,4 \pm 5,3$	$26,3 \pm 1,8$	$27,0 \pm 3,0$
K_M (mM)	$0,14 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$
	$\bar{R}^2 = 0,947$	$\bar{R}^2 = 0,923$	$\bar{R}^2 = 0,717$

Tab. 3.20: Kinetik-Parameter der Uricase-Reaktion, ermittelt aus der in Abb. 3.53 dargestellten Datenanpassung unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung.

Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Uricase-Aktivität in Wein nicht wesentlich stärker ausfiel als in Puffer, der den gleichen Ethanolgehalt aufwies, wie der Wein. Lediglich bei niedrigen Substrat-Konzentrationen konnte im Wein eine stärkere Inhibition beobachtet werden, als im ethanolhaltigen Tris-Puffer, der Wert für v_{max} war in beiden Fällen jedoch annähernd gleich.

Neben dem Einfluss von Ethanol und Rotwein wurde auch die Wirkung der Rotweinkapsel-Inhaltsstoffe auf die Aktivität der Uricase untersucht. Hierzu wurde in Dreifachbestimmungen die Reaktionsgeschwindigkeit der Uricase mit 1 mM Harnsäure in Gegenwart von 100 mg/ml Kapselinhalt bestimmt. Als Kontrolle diente die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in reinem Tris-Puffer. Die relative Aktivität der Uricase in den geschilderten Ansätzen ist in Tab. 3.21 wiedergegeben.

Medium	Puffer	Puffer mit Ethanol	Rotwein (Spätburgunder)	Rotweinkapsel- Inhalt
Uricase - Aktivität	$100 \pm 10,8 \%$	$54,3 \pm 6,9 \%$	$55,8 \pm 8,7 \%$	$\sim 100 \pm 13,8 \%$
	-	$100 \pm 6,7 \%$	$\sim 100 \pm 13,5 \%$	-

Tab. 3.21: Aktivität der Uricase aus *S. scrofa* gegenüber Harnsäure in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, in Rotwein, sowie in Gegenwart von Rotweinkapsel-Inhaltsstoffen. Die Enzymmenge betrug bei allen Messungen $0,3 \pm 0,03$ U. Die Bestimmung der Uricase-Aktivität mit Rotweinkapsel-Inhaltsstoffen wurde in einer separaten Messreihe durchgeführt. Die Abweichungen der relativen Aktivitäten wurden aus den Fehlerwerten der zugrunde liegenden v_{max} -Werte bzw. aus den Standardabweichungen von Mehrfachmessungen der Aktivität bei gleicher Substratkonzentration bestimmt.

Im Gegensatz zur Tyrosinase konnte bei der Uricase kein signifikanter Einfluss von Wein-Polyphenolen auf die Enzymaktivität festgestellt werden. Die Abnahme der Aktivität durch die Gegenwart von Ethanol fiel bei beiden Enzymen etwa gleich stark aus und kann in beiden Fällen vermutlich auf Dissoziation oder eine Teil-

Denaturierung zurückgeführt werden. Verblüffend ist an dieser Stelle, dass die Stabilität der beiden (tetrameren) Enzyme gegenüber der Beeinflussung durch Ethanol offenbar sehr ähnlich ist. In Abb. 3.54 sind die Ergebnisse der Messungen mit der Uricase noch einmal zusammenfassend dargestellt.

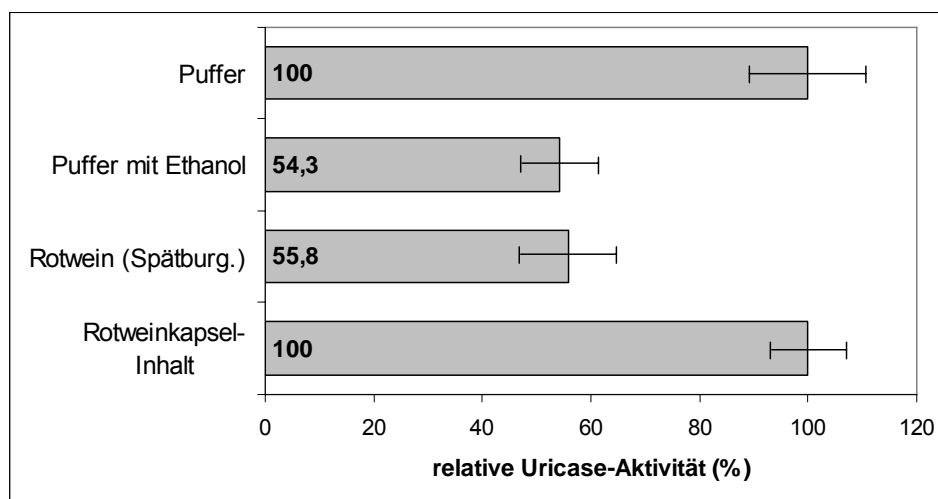


Abb. 3.54: Einfluss von Ethanol, Wein und extrahierten Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Uricase aus *S. scrofa*.

Abschließend bleib festzuhalten, dass Wein und vor allem die in ihm enthaltenen polyphenolischen Inhaltsstoffe die Aktivität der Tyrosinase spezifisch inhibieren.

Eine nähere Analyse der Wechselwirkung mit einzelnen, definierten polyphenolischen Komponenten, insbesondere aus hiesigen Weinen ist als Ausgangspunkt für fortführende Studien gedacht. Im Rahmen einer an diesem Institut fertig gestellten Diplomarbeit wurde bereits der Einfluss von Resveratrol und Quercetin, zwei bekannten polyphenolischen Verbindungen in Rot- und Weißweinen untersucht [225]. Der lokale Aspekt ist dabei zwar weitgehend unberücksichtigt geblieben, jedoch besteht weiterhin die Möglichkeit von der Forschungsanstalt Geisenheim hierfür Analyse-Daten und Probenmaterial zu beziehen.

3.5 Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen und SDS-aktiviertes Hämocyanin

Einer der vielen physiologischen Prozesse, in denen Phenoloxidasen involviert sind, ist das enzymatische Quervernetzen (*cross-linking*) von Proteinen. Wie eingangs beschrieben sind Phenoloxidasen bei Invertebraten an der Gerbung von Proteinen im Rahmen der Wundheilung und Sklerotisierung des Exoskeletts [85, 226], sowie bei der Abwehr von Pathogenen beteiligt [11, 227]. Inwieweit aktiviertes Hämocyanin Teile dieser Funktion übernehmen kann, ist Gegenstand aktueller Diskussionen.

Die Tyrosinase vermittelte Quervernetzung von Proteinen erfolgt durch Chinongerbung [133]. Hierbei werden entweder Tyrosin-Reste an Proteinoberflächen hydroxyliert und oxidiert, wodurch es zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen einzelnen Proteinmolekülen kommt, oder es werden niedermolekulare phenolische Verbindungen zu *o*-Dichinonen oxidiert, die als verbrückende Komponente zwischen zwei Proteinmoleküle eingebaut werden (Abb. 1.5).

Die nun im Folgenden dargestellten Experimente sollten zum einen Aufschluss über die Effizienz unterschiedlicher Tyrosinasen beim Quervernetzen verschiedener Proteine geben, zum anderen sollte untersucht werden, in wie weit SDS-aktiviertes Hämocyanin *in vitro* die Quervernetzung von Proteinen katalysieren kann.

3.5.1 Quervernetzen von Hämocyanin durch Tyrosinasen

24-meres Hämocyanin (Hc) aus der Hämolymphe der Vogelspinne *Eurypelma californicum* wurde 18 h bei Raumtemperatur in Anwesenheit von Tyrosinase aus anderen Organismen und phenolischen Substraten inkubiert.

Bei dieser Untersuchung wurde Hämocyanin in einer Konzentration von 0,75 mg/ml und einem Reaktionsvolumen von 300 µl eingesetzt. Diesem wurde in jeweils drei einzelnen Ansätzen Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* bzw. aus *Streptomyces antibioticus* zugegeben. Die hierbei verwendete Menge lag bei etwa 5 µg Enzym mit einer Diphenolase-Aktivität von 0,04 - 0,05 U. Einer der Reaktionsansätze enthielt 33 µM L-Tyrosin, ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 33 µM L-Tyrosin und L-Dopa, im dritten Ansatz wurde auf die Zugabe phenolischer Substrate verzichtet. In einem Kontrollansatz wurde reines Hämocyanin ohne Tyrosinasen oder Substrate inkubiert. Das Reaktionsmedium bestand aus 100 mM Tris-Puffer mit je 5 mM CaCl₂ und

MgCl₂ und einem pH-Wert von 7,8. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze einer denaturierenden SDS-PAGE unterzogen und die Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Zur weiteren Kontrolle wurde zusätzlich frisches, nicht inkubiertes Hämocyanin aufgetragen.

Auf den Gelen war deutlich zu erkennen, dass Hämocyanin in dissoziierten Untereinheiten mit Molekulargewichten um 70 kDa vorlag (Abb. 3.55). Im Fall des Hämocyanins aus *E. californicum* handelt es sich um sieben verschiedene Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 67 und 76 kDa [228]. In den Reaktionsansätzen, die Tyrosinase ohne Substrate enthielten, konnte im Fall der *Streptomyces*-Tyrosinase eine weitere Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa angefärbt werden. Diese Bande war auch in den Ansätzen mit phenolischen Substraten aufzufinden, in den Ansätzen mit *Agaricus*-Tyrosinase fehlte sie jedoch. Lediglich in den Ansätzen, die neben der *Agaricus*-Tyrosinase auch Substrat enthielten, konnte in diesem Molekulargewichtsbereich eine sehr schwache Färbung erkannt werden, die auf das Vorhandensein einer Bande schließen lassen könnte. Die Ursache hierfür könnte in der Größe und in der oligomeren Struktur der *Agaricus*-Tyrosinase liegen, wodurch die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums im Gegensatz zur *Streptomyces*-Tyrosinase eingeschränkt ist. Da von der *Agaricus*-Tyrosinase keinerlei Strukturinformationen vorliegen, ist dies jedoch rein spekulativ.

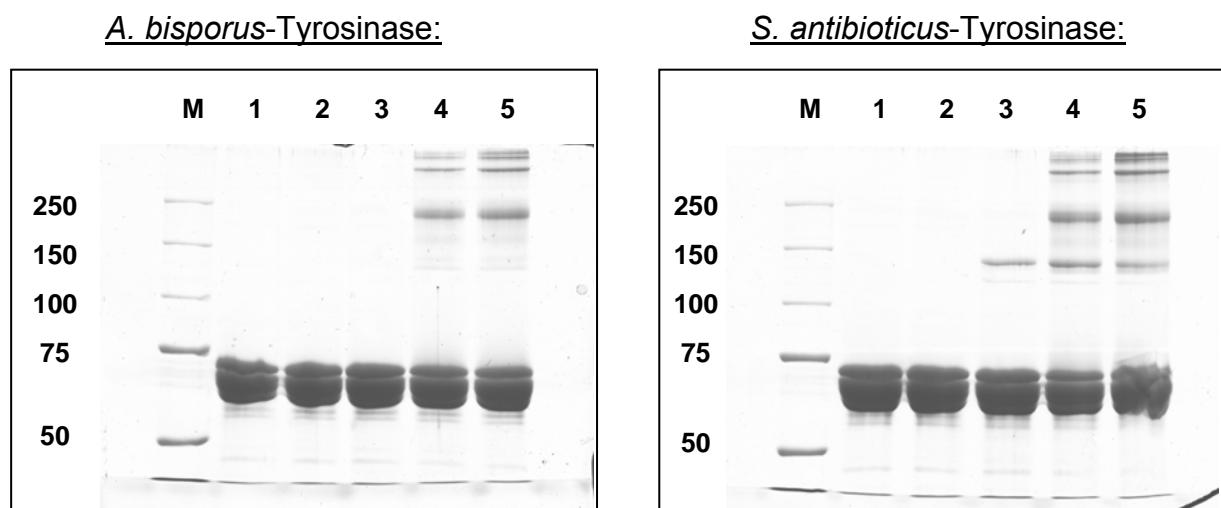


Abb. 3.55: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Hämocyanin (Hc) und Tyrosinasen. Auftragung in beiden Gelen:

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. **1:** Hc (frisch). **2:** Hc (inkubiert). **3:** Hc + Tyrosinase.

4: Hc + Tyrosinase + 33 µM L-Tyrosin. **5:** Hc + Tyrosinase + 33 µM L-Tyrosin + 33 µM L-Dopa.

Das Molekulargewicht von ca. 140 kDa legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der Bande um ein kovalent verbundenes Dimer zweier Hämocyanin-Untereinheiten handelt. Eine Analyse dieser Proteinbande mittels Massenspektrometrie ergab, dass es sich hierbei ausschließlich um die Untereinheiten b und c handelte (siehe Anhang). Diese beiden Untereinheiten des *Eurypelma*-Hämocyanins sind nach bisherigen Erkenntnissen die einzigen, die mittels SDS zu einer Phenoloxidase aktiviert werden können [24]. Bei den übrigen Untereinheiten (a, sowie d - g) ist dies jedoch nicht möglich. Dieser Umstand wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass b und c frühzeitig von den übrigen Hämocyanin-Untereinheiten divergierten und phylogenetisch den Phenoloxidasen am nächsten stehen [229]. Da die Hämocyanin-Untereinheiten in den beschriebenen Reaktionsansätzen aber lediglich das Substrat für das enzymatische Quervernetzen darstellten, ist dieses Ergebnis verblüffend.

In allen Ansätzen, die Tyrosinasen und phenolische Substrate enthielten, konnten weitere Proteinbanden angefärbt werden, die in der Größenordnung von Trimeren (ca. 210 kDa) und Tetrameren (ca. 280 kDa), sowie nicht näher differenzierten, höheren Aggregaten lagen. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei auf 90 min verkürzter Inkubationszeit, sowie nach 48 h Inkubation der Reaktionsansätze erzielt (nicht gezeigt). In wie weit es sich hierbei ebenfalls um Aggregate handelte, die sich ausschließlich aus den Untereinheiten b und c zusammensetzen, wurde an dieser Stelle nicht näher untersucht. Eine massenspektrometrische Analyse konnte nicht durchgeführt werden.

In Kontrollansätze, die neben Hämocyanin lediglich phenolische Substrate enthielten konnten keine Quervernetzungsprodukte nachgewiesen werden. Lediglich in Ansätzen mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen an L-Dopa zeigten sich im SDS-Gel Aggregate, die in der Größe den Produkten des enzymatischen Quervernetzungsprozess entsprachen (siehe Abb. 3.56, Spur 7). Dies wurde auf die autooxidative Tendenz des diphenolischen Substrates zurückgeführt, die bei moderater Substratkonzentration aber offensichtlich nur einen vergleichsweise geringen Effekt hervorrief (siehe Abb. 3.56, Spur 6). Somit konnte die Bildung der oben beschriebenen kovalent verknüpften Oligomere eindeutig auf die enzymatische Aktivität der Tyrosinasen zurückgeführt werden, was durch das Auftreten des Dimers im Ansatz ohne Substrat, zumindest beim Einsatz der *Streptomyces*-Tyrosinase aber bereits anzunehmen war.

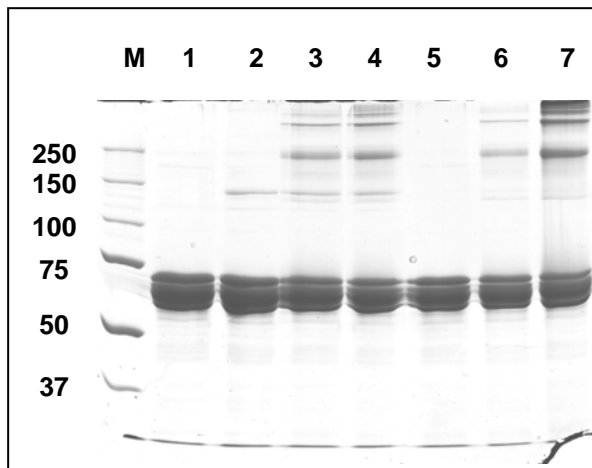


Abb. 3.56: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Hämocyanin (Hc) und *Streptomyces*-Tyrosinase. **M** (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.
 1: Hc (inkubiert).
 2: Hc + Tyrosinase.
 3: Hc + Tyrosinase + 33 μ M L-Tyrosin.
 4: Hc + Tyrosinase + 33 μ M L-Dopa.
 5: Hc + 33 μ M L-Tyrosin.
 6: Hc + 33 μ M L-Dopa.
 7: Hc + 300 μ M L-Dopa.

3.5.2 Quervernetzen von Albumin durch Tyrosinasen

Als Vergleichsprotein wurde Rinderserum-Albumin (BSA) in Anwesenheit von Tyrosinase und phenolischen Substraten ebenso wie das *Eurypelma*-Hämocyanin in den oben beschriebenen Reaktionsansätzen 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsbedingungen blieben hierbei unverändert. Mittels denaturierender Gelelektrophorese konnten anschließend jedoch in keiner Probe höhermolekulare Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 3.57).

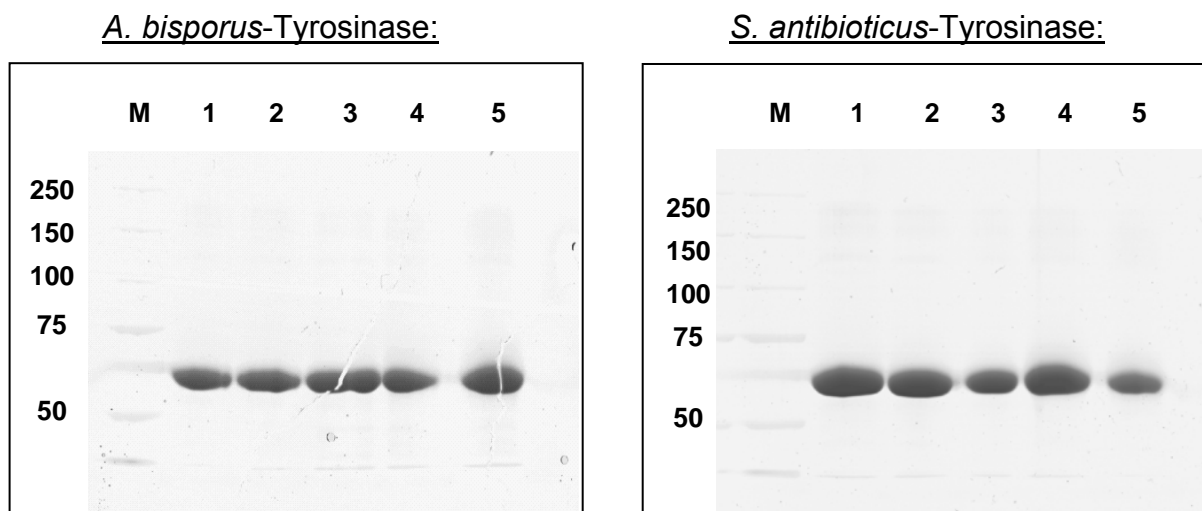


Abb. 3.57: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Rinderserum-Albumin (BSA) und Tyrosinasen. Auftragung in beiden Gelen:
M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben. **1:** BSA (frisch). **2:** BSA (inkubiert). **3:** BSA + Tyrosinase. **4:** BSA + Tyrosinase + 33 μ M L-Tyrosin. **5:** BSA + Tyrosinase + 33 μ M L-Tyrosin + 33 μ M L-Dopa

Erst durch eine drastische Erhöhung der Substratkonzentration in den Reaktionsansätzen konnte eine enzymatische Quervernetzung des BSA durch die *Streptomyces*-Tyrosinase erzielt werden (Abb. 3.58). Hierfür waren allerdings L-Dopa-Konzentrationen von 870 μM und mehr erforderlich, während bei der Quervernetzung von *Eurypelma*-Hämocyanin lediglich 33 μM eingesetzt wurden. Zudem konnten im Polyacrylamidgel keine diskreten Banden sichtbar gemacht werden. Vielmehr zeigten sich über den gesamten Laufbereich ein verschmiertes Signal und eine sehr starke Färbung am oberen Gelende.

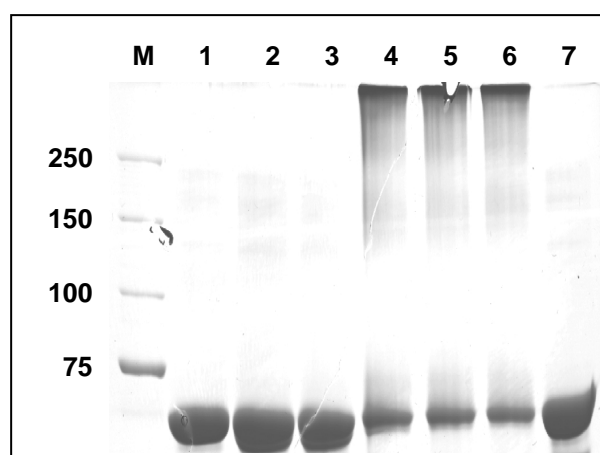


Abb. 3.58: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Rinderserum-Albumin (BSA) und *Streptomyces*-Tyrosinase.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: BSA (inkubiert).

2: BSA + Tyrosinase.

3: BSA + Tyrosinase + 450 μM L-Dopa.

4: BSA + Tyrosinase + 870 μM L-Dopa.

5: BSA + Tyrosinase + 1,25 mM L-Dopa.

6: BSA + Tyrosinase + 1,6 mM L-Dopa.

7: BSA (frisch)

Aus dem Ergebnis der denaturierenden Gelelektrophorese konnte geschlossen werden, dass das BSA durch die Tyrosinase zwar auch enzymatisch quervernetzt werden kann, hierfür allerdings eine sehr große Menge an quervernetzenden Agentien, also phenolisches Tyrosinase-Substrat erforderlich ist. Bedingt wird dieses unterschiedliche Verhalten vermutlich durch verschiedenartige Oberflächenbeschaffenheit der eingesetzten Proteine. Wie eingangs erwähnt, stellen neben Tyrosyl-Resten auch Seitenketten mit freien Amino-, Sulfhydryl- und Pyrrolidiningruppen (Arg, Asn, Gln, Lys, Cys, Pro) potentielle Angriffspunkte für das Tyrosinase-vermittelte Quervernetzen von Proteinen dar [133]. Im Falle des Hämocyanins aus *E. californicum* sind sämtliche genannte Aminosäuren außer Cystein auch auf der Oberfläche aller Untereinheiten lokalisiert. Dieser Befund ließ sich von der 3D-Struktur des modellierten 24-mers ableiten. Da von BSA jedoch keine Kristallstruktur vorliegt, kann über das Vorhandensein der für eine Quervernetzung notwendigen Seitenketten an der Oberfläche des BSA nur gemutmaßt werden; gegebenenfalls hindert in diesem Fall aber auch eine Glykosylierung die Tyrosinase an der Hydroxylierung und Oxidation der in Frage kommenden Seitenketten.

Da aber auch beim *Eurypelma*-Hämocyanin offensichtlich nicht alle Untereinheiten gleichermaßen quervernetzt werden, sondern nur jene, die selbst zu einer Phenoloxidase aktiviert werden können, bleibt zu vermuten, dass noch andere Bedingungen für ein enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen erfüllt sein müssen.

3.5.3 Quervernetzen von Hämocyanin durch Zugabe von SDS-aktiviertem Hämocyanin

Aufgrund der Tatsache, dass Hämocyanin durch Detergenzien wie SDS zu einer Phenoloxidase konvertiert werden kann, wurde in einer weiterführenden Versuchsreihe natives 24-meres Hämocyanin aus *E. californicum* mit auf diese Weise aktiviertem Hämocyanin der gleichen Spezies inkubiert. Hierzu wurde Hämocyanin in Tris-Puffer, pH 7,8 mit einer Konzentration von 6,3 mg/ml für 60 min in Gegenwart von 3,5 mM SDS bei Raumtemperatur inkubiert. Das so aktivierte Hämocyanin wurde anschließend in mehreren Ansätzen zu einer Lösung mit nativem Hämocyanin gegeben. Die Konzentration des nativen Hämocyanins lag wie bereits in den Reaktionsansätzen mit Tyrosinase bei 0,75 mg/ml, in einem Volumen von 300 µl. Die zugegebene Menge an aktiviertem Hämocyanin betrug in allen Ansätzen 63 µg. Drei der Ansätze enthielten zusätzlich L-Dopa als diphenolisches Substrat, wobei die eingesetzten Konzentrationen bei 15, 150 und 300 µM lagen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 18 h. Anschließend wurden die Reaktionsansätze einer denaturierenden SDS-PAGE unterzogen und die Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt. Als Kontrolle diente zum einen frisches Hämocyanin der gleichen Charge in der gleichen Konzentration, zum anderen Hämocyanin, das ohne aktiviertes Hämocyanin und L-Dopa unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurde, wie die oben beschriebenen Ansätze.

Das Resultat fiel sehr ähnlich aus, wie bei der Inkubation von Hämocyanin mit der Tyrosinase aus *A. bisporus*. In Abwesenheit von phenolischem Substrat fand keine nachweisbare Quervernetzung des Proteins statt. Bereits durch die Zugabe von geringen Mengen L-Dopa konnten jedoch Aggregate in den Größenordnungen von Di-, Tri- und vermutlich Tetrameren, sowie nicht definierten, größeren Oligomeren erzeugt werden.

Die Intensität dieser Banden nahm dabei erwartungsgemäß bei höherer L-Dopa-Konzentration zu, wobei der Unterschied zwischen 150 μM und 300 μM weit geringer ausfiel, als zwischen 15 μM und 150 μM . In allen Fällen blieben diese Banden jedoch als diskrete Signale erhalten.

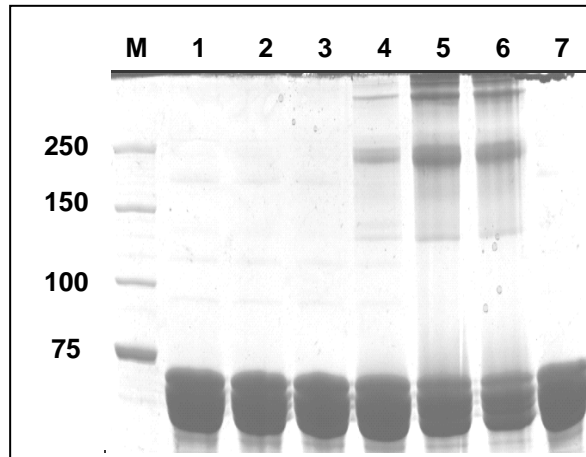


Abb. 3.59: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Hämocyanin (Hc) und SDS-aktiviertem Hämocyanin.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: Hc (inkubiert).

2: Hc + Hc,akt.

3: Hc + Hc,akt.

4: Hc + Hc,akt. + 15 μM L-Dopa.

5: Hc + Hc,akt. + 150 μM L-Dopa.

6: Hc + Hc,akt. + 300 μM L-Dopa.

7: Hc (frisch).

Obwohl der Anteil an autoreaktiv gebildeten Oligomeren nicht abgeschätzt wurde, konnte basierend auf den bisherigen Beobachtungen davon ausgegangen werden, dass die im Gel detektierten Aggregate durch die katalytische Einwirkung der aktivierten Hämocyanin-Moleküle hervorgerufen wurden. Diese Annahme konnte durch ein an anderer Stelle beschriebenes Kontrollexperiment bestätigt werden (siehe Abb. 3.60b).

3.5.4 Quervernetzen von Hämocyanin bei der SDS-Aktivierung

Da SDS-aktiviertes Hämocyanin aus *E. californicum* offenbar in der Lage ist, andere Hämocyanin-Moleküle aus dieser Spezies quer zu vernetzen, wurde im Folgenden untersucht, in wie weit die bloße Aktivierung durch SDS, ohne Vorinkubation bei Hämocyanin die Bildung von kovalenten Aggregaten hervorruft. Die Reaktionen erfolgten wie in den oben beschriebenen Ansätzen bei einer Hämocyanin-Konzentration von 0,75 mg/ml und einem Volumen von 300 μl bei Raumtemperatur für 18 h. Die Konzentration an SDS in den Ansätzen lag bei 2,3 bzw. 4,6 mM. Nach der Reaktion wurden die Ansätze einer denaturierenden SDS-PAGE unterzogen und die Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt (Abb. 3.60a).

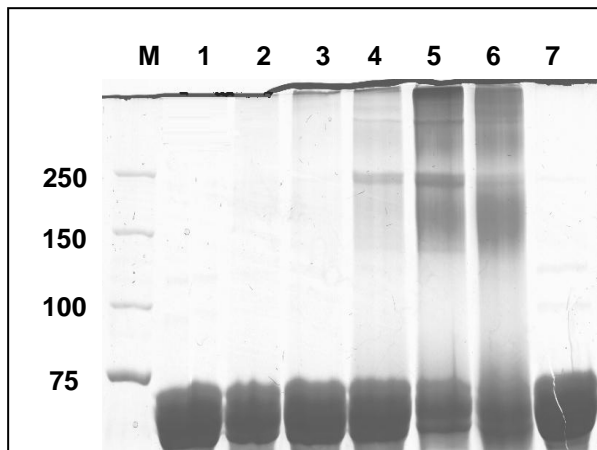


Abb. 3.60a: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Hämocyanin (Hc) nach Aktivierung mit SDS.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: Hc (inkubiert).

2: Hc + 2,3 mM SDS.

3: Hc + 4,6 mM SDS.

4: Hc + 2,3 mM SDS + 15 μ M L-Dopa.

5: Hc + 2,3 mM SDS + 150 μ M L-Dopa.

6: Hc + 2,3 mM SDS + 300 μ M L-Dopa.

7: Hc (frisch)

Auf den Gelen war zu erkennen, dass es bei den Ansätzen, die neben SDS auch L-Dopa enthielten zur Bildung von Aggregaten kam. Diese zeigten sich jedoch nicht als diskrete Banden, sondern ergaben vermutlich aufgrund der schädigenden Einflüsse durch das SDS ein breites Signal zwischen etwa 140 kDa und der Auftragungsstelle. Unterhalb von 250 kDa war allerdings eine undeutliche Bande zu, die auf ein verstärktes Auftreten von Trimeren aus Hämocyanin-Untereinheiten hindeutet, deren Molekulargewicht bei 200 - 230 kDa liegt. Bei den Ansätzen, denen kein diphenolisches Substrat zugesetzt wurde, konnte lediglich eine schwache, undeutliche Bande direkt unterhalb der Auftragungsstelle festgestellt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Inkubationszeit von 18 h auf 90 min reduziert, um die Reaktion in einer physiologisch relevanten Zeitspanne ablaufen zu lassen und um den schädigenden Einfluss durch das SDS gering zu halten. Durch einen zusätzlichen Kontroll-Ansatz mit Hämocyanin und L-Dopa ohne SDS wurde zudem die Auswirkung nicht-enzymatischer Prozesse hinsichtlich der Bildung von Oligomeren innerhalb dieses Reaktionszeitraums überprüft (Abb. 3.60b).

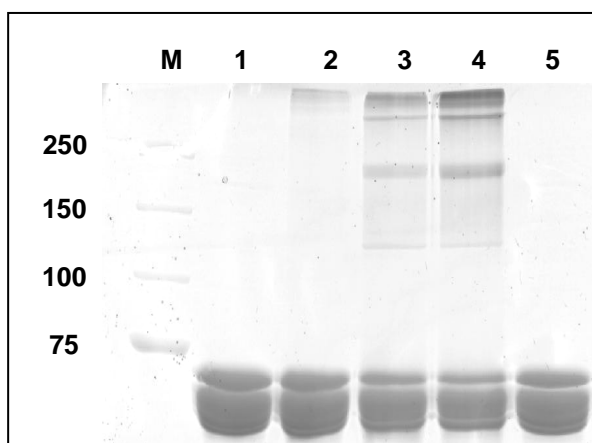


Abb. 3.60b: SDS-PAGE (7,5 % Polyacrylamid-Gel) der Reaktionsansätze mit Hämocyanin (Hc) nach Aktivierung mit SDS.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: Hc (inkubiert).

2: Hc + 3,4 mM SDS.

3: Hc + 3,4 mM SDS + 66 μ M L-Dopa.

4: Hc + 3,4 mM SDS + 150 μ M L-Dopa.

5: Hc + 66 μ M L-Dopa.

Nach der Auftragung auf das Gel konnten in den Inkubationsansätzen mit SDS und L-Dopa kovalent verknüpfte Aggregate von Hämocyanin-Untereinheiten in den bereits bekannten Größenordnungen festgestellt werden. Diese erschienen wie bereits in den Reaktionsansätzen mit Tyrosinasen als diskrete Banden mit Molekulargewichten von etwa 140, 210 und 280 kDa, sowie als höhermolekulare Aggregate. Letztere konnten auch in dem Reaktionsansatz ohne L-Dopa beobachtet werden, wobei die Intensität deutlich schwächer ausfiel, als in Gegenwart des Diphenols. In diesem Ansatz konnten auch keine potentiellen Di- bis Tetramere nachgewiesen werden.

Der Kontrollansatz, bei dem auf die Zugabe von SDS verzichtet wurde, konnte überhaupt keine Aggregation festgestellt werden. Somit konnte die Bildung der kovalenten Aggregate aus Hämocyanin-Untereinheiten in dieser und den vorangegangenen Untersuchungen eindeutig auf die katalytische Aktivität des SDS-aktivierten Hämocyanins zurückgeführt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Autooxidation der Diphenole offenbar erst bei einer längeren Inkubationszeit zur Bildung von Oligomeren beiträgt.

Die Proteinbanden mit den Molekulargewichten 140, 210 und 280 kDa wurden einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (siehe Anhang). Der Sequenzvergleich ergab hierbei einen etwa gleich starken Anteil aller sieben Polypeptidketten der Hämocyanin-Untereinheiten aus *E. californicum* in allen drei Banden. Eine eindeutige Dominanz der Untereinheiten b und c, wie bei der Quervernetzung von nativem Hämocyanin durch die Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* konnte nicht festgestellt werden. Möglicherweise führte die SDS-Behandlung nicht nur zu einer Aktivierung des Hämocyanins, sondern im Laufe der Inkubation auch zu einer vermehrten Dissoziation der 24-mere durch Wechselwirkung mit den strukturerhaltenden, bivalenten Kationen des Puffers. Somit wären für eine Quervernetzung deutlich mehr Angriffspunkte gegeben, wodurch diese wesentlich unspezifischer stattfand, als am intakten, 24-meren Hämocyanin.

3.5.5 Proteinextraktion aus der Kutikula von *Eurypelma californicum*

Der Nachweis einer quasi autokatalytischen Quervernetzung von Hämocyanin nach dessen Aktivierung zur Phenoloxidase, legt die Vermutung nahe, dass Hämocyanin, wenn auch nicht initial, an Sklerotisationsprozessen innerhalb der Kutikula beteiligt

sein könnte. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurde eine Proteinextraktion aus der Kutikula von *Eurypelma californicum* durchgeführt und anschließend versucht, mittels immunochemischer Detektion das Vorhandensein von Hämocyanin nachzuweisen.

3.5.5.1 Extraktion der Proteine

Die Extraktion von Proteinen aus der Kutikula von *E. californicum* erfolgte durch Inkubation äußerst gründlich gewaschener und fein zermörserter Exuvien in Ringerlösung oder in Acetat-Puffer. Die Proteinextraktion mit Ringerlösung wurde bereits 1994 von Paul *et al.* [230] mit Exuvien, sowie mit frischer Kutikula von *E. californicum* durchgeführt. Ashida und Brey verwendeten 1995 zur Extraktion der Prophenoloxidasen-Kaskade aus der Seidenraupe *Bombyx mori* Acetatpuffer [124]. Während Paul *et al.* auf die Zugabe von Protease-Inhibitoren vollständig verzichteten, setzten Ashida und Brey sowohl 5 mM EDTA (Metallo-Proteasen-Inhibitor), als auch 0,33 mM APMSF (Serin-Proteasen-Inhibitor) ein.

Nach diversen Variationen des Extraktions-Puffers wurde für diesen Schritt eine Ringerlösung mit 0,2 mM PMSF gewählt. Die Inkubation von pulverisierten Exuvien in Acetat-Puffer führte zwar ebenfalls zur Auslösung von Proteinen aus der chitinösen Matrix, jedoch konnten im SDS-Gel lediglich geringe Mengen mit Molekulargewichten unterhalb von 20 kDa nachgewiesen werden. Die Ringerlösung hingegen enthielt nach der Extraktion Proteine mit Molekulargewichten über den gesamten Auftrennungsbereich, also von unter 15 kDa bis über 250 kDa. Beide Extraktionsverfahren lieferten schon nach 2 h Inkubationszeit genau so viel Protein, wie nach 24 h (Abb. 3.62).

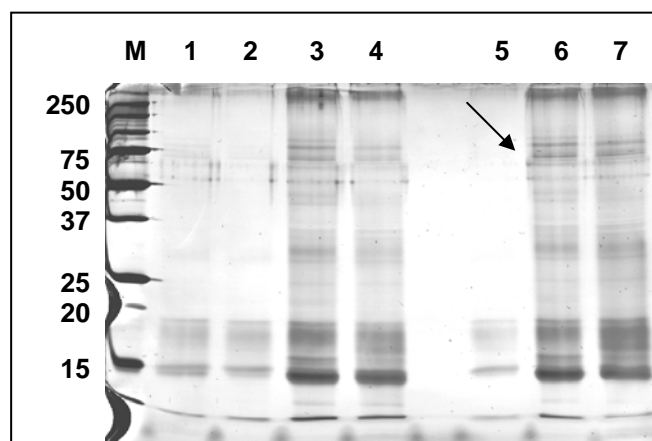


Abb. 3.61: SDS-PAGE (12,5 % Polyacrylamid-Gel) der extrahierten Proteine aus Exuvien von *Eurypelma californicum* nach Silber-Färbung.

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Biorad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

1: Acetat-Extrakt nach 2 h.

2 & 5: Acetat-Extrakt nach 24 h.

3 & 6: Ringer-Extrakt nach 2 h.

4 & 7: Ringer-Extrakt nach 24 h.

Der Pfeil markiert den Größenbereich der Hämocyanin-Untereinheiten.

3.5.5.2 Immunochemische Detektion von Hämocyanin

Da die Identität der extrahierten Proteine und Protein-Fragmente aus den Exuvien von *E. californicum* zunächst unklar blieb, wurde das Vorhandensein von Hämocyanin immunochemisch überprüft. Hierzu wurden die Proteine nach einer SDS-PAGE mittels Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen dissoziiertes Hämocyanin inkubiert. Der Nachweis einer Wechselwirkung dieser Primär-Antikörper mit dem auf der Membran fixierten Protein erfolgte durch eine Farbreaktion mit einem Enzym-gekoppelten Sekundär-Antikörper.

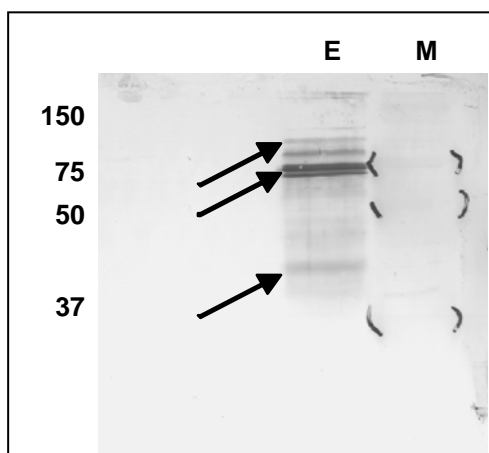


Abb. 3.62: Western Blot der extrahierten Proteine aus Exuvien von *Eurypelma californicum*.

E: Ringer-Extrakt (konzentriert) nach 48 h. Die Pfeile markieren die detektierten Hämocyanin-Banden

M (Marker): Precision Plus Protein Standard (Bio-rad, München). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angegeben.

Auf dem Blot konnten neben einem starken Signal bei etwa 70 kDa weitere Banden bei etwa 40 - 45 kDa und bei 75 - 90 kDa detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass neben intakten Hämocyanin-Untereinheiten auch Fragmente dieses Proteins in der Kutikula vorhanden sind. Höhere Aggregate, die auf das Vorliegen kovalent verknüpfter Oligomere hindeuten konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Frage ob, und wenn ja, in wie weit aktiviertes Hämocyanin *in vivo* an einer Quervernetzung von Proteinen in der Kutikula beteiligt sein könnte stellt einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende Studien dar.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beinhalten neben dem angestrebten Protokoll zur Aufreinigung der nativen Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* weitere Aspekte der strukturellen Eigenschaften und katalytischen Funktion dieses Enzyms.

4.1 Anreicherung und Reinigung der nativen Tyrosinase aus *S. antibioticus*

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Anreicherung sehr großer Mengen reiner Tyrosinase für weiterführende, spektroskopische Untersuchungen des genauen Ablaufs der Monophenolhydroxylase-Reaktion. Als Quelle für dieses Enzym diente das Bodenbakterium *S. antibioticus*, das sowohl im Labormaßstab, als auch im halotechnischen Maßstab kultiviert wurde.

4.1.1 Wahl des Kulturmediums und Festlegung der idealen Kultivierungsbedingungen für *S. antibioticus*

Für die spätere Reinigung der Tyrosinase musste ein Flüssigmedium gefunden werden, das nicht nur einen hohen Zellertrag gewährleistete, sondern auch die Sekretion des Enzyms aus den Zellen förderte und seine einfache Isolierung aus dem Kulturmedium ermöglichte. Da bereits eine Reihe von Rezepturen für eine erfolgreiche Kultivierung von Streptomyceten, auch hinsichtlich der anschließenden Isolierung von Tyrosinasen beschrieben war, wurden einige dieser Medien bezüglich ihrer Effizienz untersucht.

In ihrer Zusammensetzung waren die getesteten Medien grundsätzlich sehr ähnlich und enthielten neben einigen definierten Aminosäuren lediglich Mineralsalze, sowie eine zusätzliche C-Quelle in Form von Glucose (CDM) bzw. Glycerin (AGMIT-, AGMI- und GM-Medium) [159-161]. Die Sekretion des Enzyms aus den Zellen in das Medium konnte in allen Fällen demonstriert werden. Für die Präparation der Tyrosinase erwies sich das GM-Medium jedoch als am besten geeignet. Dieses bestand neben Glycerin, Glutamat und L-Methionin lediglich aus einigen Mineralien, einschließlich Kupfersulfat. Neben dem für die Tyrosinase unerlässlichen Kupfer in Form von Kupfersulfat diente L-Methionin zur spezifischen Induktion der Tyrosinase-Expression [159]. Der Mechanismus dieser Induktion ist bisher nicht aufgeklärt wor-

den, jedoch deuten Inhibitionsexperimente mit unterschiedlichen Antibiotika darauf hin, dass sowohl transkriptionelle, als auch translationelle Prozesse während der Induktion für die Proteinsynthese erforderlich sind [159, 231]. Somit wird durch L-Methionin nicht nur die *de novo* Synthese der Tyrosinase verstärkt, sondern auch die *de novo* Transkription der entsprechenden mRNA.

Auch durch die Zugabe anderer L-Aminosäuren wie L-Isoleucin konnte in der Vergangenheit eine Induktion der Tyrosinase-Synthese in Streptomyceten nachgewiesen werden [232]. Im Falle der *S. antibioticus*-Tyrosinase erwies sich dies aber als unnötig. Ebenso konnte zur Produktion des Enzyms auf L-Arginin als zusätzliche N-Quelle verzichtet werden. Die Verwendung von L-Tyrosin als Medienbestandteil ermöglichte zwar bereits nach kurzer Kultivierungszeit den Nachweis einer Tyrosinase-Aktivität, die Aufreinigung des Enzyms wurde durch die rasch fortschreitende Melaninbildung im Kulturansatz jedoch stark erschwert.

Somit bleibt festzuhalten, dass die Verwendung des GM-Mediums mit seiner sparsamen Zusammensetzung eine ideale Grundlage zur Produktion der nativen Tyrosinase aus *S. antibioticus* darstellt.

Das gewählte Kultivierungsmedium ermöglichte zwar eine Induktion der Tyrosinase-Synthese und somit eine hohe Ausbeute, eine Überexpression, wie sie durch molekularbiologische Techniken erzielt werden kann, erfolgte auf diese Weise jedoch nicht. Um dieses Manko zu kompensieren konnte aber das Kulturvolumen und damit die Probenmenge gegenüber dem üblichen Labormaßstab deutlich vergrößert werden. Zu diesem Zweck wurde *S. antibioticus* in einem Fermenter im halb-technischen Maßstab mit einem Volumen von 50 l kultiviert. Bei einem pH-Wert um 7,0 und Temperaturen von 20 - 30 °C konnte in einem solchen Ansatz bereits nach 48 - 72 h mit der Reinigung des Zielproteins begonnen werden.

4.1.2 Reinigung der Tyrosinase aus dem Kulturüberstand

Nach dem Abtrennen der Zellen wurden die Proteine im Kulturüberstand mittels Ammoniumsulfat ausgefällt und für die weitere Reinigung abzentrifugiert. Trotz des Verzichts auf potentielle Tyrosinase-Substrate im Medium kam es im Laufe der Kultivierung aufgrund der Stoffwechselleistung der Streptomyceten stets zu einer Pigmentbildung. Diese Pigmente fanden sich als Verunreinigungen auch im proteinhalti-

gen Präzipitat der Ammoniumsulfat-Fällung, weshalb die Entfernung der Pigmente aus den Proben das vorrangige Problem bei der weiteren Aufarbeitung darstellte.

Der Versuch die (kationische) Tyrosinase mittels Kationen-Austausch von den Pigmenten und den übrigen Proteinen zu trennen, scheiterte trotz anfänglicher Erfolge an der viel zu geringen Ausbeute. Aus diesem Grund wurde die Präparation des Zielproteins in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt. Durch Anionen-Austausch wurden zunächst die (anionischen) Pigmente entfernt. Die nun pigmentfreien Proben wurden anschließend mittels Größenausschluss-Chromatographie fraktioniert. Da neben der Tyrosinase nur sehr wenige, nicht näher charakterisierte Fremdproteine im Kulturüberstand vorhanden waren, konnten diese sehr leicht von der Tyrosinase getrennt werden, wodurch letztere mit hoher Reinheit isoliert werden konnte.

Auf diesem Weg konnte eine aktive Tyrosinase in einer Konzentration von bis zu 37 µg/ml (1,2 µM) gewonnen werden. Durch mehrfaches Wiederholen des letzten Präparationsschritts, der SEC kann die Ausbeute aus einem Kulturansatz noch leicht um das bis zu 25-fache vergrößert werden. So kann das Enzym theoretisch mit einer Konzentration von nahezu 1 mg/ml (30 µM) angereichert werden.

Insgesamt konnte ein zufrieden stellendes Protokoll für die Reinigung der nativen Tyrosinase aus *S. antibioticus* formuliert werden. Vorausgesetzt, dass ein verhältnismäßig großes Kulturvolumen zur Verfügung steht, ermöglicht es die Anreicherung des Zielproteins in großen Mengen. Gemessen an der Ausgangsaktivität im Kulturüberstand fällt die Ausbeute mit etwa 2 % jedoch auffallend gering aus. Der größte Verlust trat offensichtlich schon bei der Ammoniumsulfat-Fällung zu Beginn der Präparation auf, weshalb zu überlegen ist, diesen Schritt zu modifizieren oder erst nach der Depigmentierung mittels Anionen-Austausch durchzuführen. Eine fraktionierte Fällung stellt hierbei die nächstliegende Abwandlung dar, da die Verwendung von Ammoniumsulfat hinsichtlich der Stabilität des Enzyms grundsätzlich geeignet ist. Die Aufkonzentrierung der Proteine mittels Gefriertrocknung anstelle einer Fällung war aufgrund des großen Probenvolumens nicht durchführbar. Die Methode hatte sich im Labor-Maßstab zwar bewährt, jedoch bestand nicht die Möglichkeit dies mit einem mehr als 10mal so großen Ansatz effektiv umzusetzen. Sollten die technischen Voraussetzungen gegeben sein, wäre die Gefriertrocknung einer Fällung aber in jedem Fall vorzuziehen.

Bei den übrigen Präparationsschritten, Anionen-Austausch und SEC fielen die Verluste an Enzymaktivität während der Reinigung weit weniger stark aus, letzter ließ sich sogar nahezu verlustfrei durchführen.

Die Frage, ob die Depigmentierung mittels Anionen-Austausch vor oder nach dem Aufkonzentrieren der Proteine sinnvoller ist, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Der eingetretene Verlust von etwa 40 - 50 % der Ausgangsaktivität ist bei diesem Verfahren aber bereits auch von anderen Autoren berichtet worden, und zwar sowohl vor [191], als auch nach der Konzentrierung des Kulturüberstands [97, 99], scheint also ohnehin unabwendbar zu sein.

4.2 Rekombinante Überexpression der Tyrosinase aus *S. antibioticus*

Zur Gewinnung großer Mengen eines bestimmten Proteins kann oft auch der molekularbiologische Weg beschritten werden. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis über die molekulare Struktur und die Regulation des Zielgens.

4.2.1 Wahl des Expressionssystems

Für das Tyrosinase-Gen aus *S. antibioticus* sind bereits etablierte Verfahren zur homologen [191] und heterologen Überexpression [91] beschrieben worden. Der von Katz *et al.* [91] generierte Plasmid-Vektor pIJ702 ist zudem kommerziell erhältlich und stand somit für eigene Versuchsansätze zur Verfügung. In diesem Plasmid ist das *mel*-Operon aus *S. antibioticus* mit den Strukturgenen für die Tyrosinase und das Hilfsprotein auf eine Weise inseriert, durch die es in umgekehrter Richtung abgelesen wird, wie das stromaufwärts lokalisierte Thiostrepton-Resistenz-Gen (Abb. 2.2). Aufgrund der Positionen der für die Insertion des *mel*-Operons gewählten BclI-Schnittstellen existieren jedoch fünf weitere Orientierungsmöglichkeiten für das Operon nach der Ligation. Da eine der BclI-Schnittstellen jedoch in einer Region liegt, die essentiell für die Replikation des Plasmids ist, führen nur drei dieser Möglichkeiten zu funktionellen Vektoren. So kann das *mel*-Operon nicht nur stromabwärts, sondern auch stromaufwärts von der Thiostrepton-Resistenz eingebaut werden, die Leserichtung kann dabei jeweils im Uhrzeigersinn und gegen den Uhrzeigersinn liegen. Die drei zusätzlichen Plasmid-Vektoren (pIJ701, pIJ703 und pIJ704) stellen somit Varia-

tionen von pIJ702 dar und haben sich zur Überexpression der Tyrosinase als zum Teil deutlich effektiver erwiesen [91, 191].

Da im Rahmen dieser Arbeit leider keine Möglichkeit bestand pIJ702 zu modifizieren, um die Lokalisation oder die Leserichtung des *mel*-Operons zu verändern, musste ausschließlich auf diesen Vektor zurückgegriffen werden. Als Wirt für die Expression des Tyrosinase-Gens diente in Anlehnung an Katz *et al.* [91] der nahe verwandte Organismus *S. lividans*.

Nach erfolgreicher Transformation fielen die Resultate bezüglich der Ausbeute an Tyrosinase jedoch sehr enttäuschend aus, so dass auf diesem Weg keine nennenswerte Anreicherung des Enzyms erzielt werden konnte. Die fehlenden Möglichkeiten, das verwendete Plasmid zu verändern, erlaubten an dieser Stelle keine Variationen des Expressionssystems, weshalb das Vorhaben auch nicht weiter verfolgt wurde. Hinsichtlich einer Anreicherung der Tyrosinase aus *S. antibioticus* war die rekombinante Expression aber auch nicht erforderlich, da die Isolierung des nativen Enzyms aus einem großvolumigen Kulturansatz bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte (siehe oben). Die auf diese Weise erreichte Ausbeute von maximal 30 µM Tyrosinase mit einer spezifischen Aktivität von 730 U/mg lag etwa in der gleichen Größenordnung wie jene, die von Bubacco *et al.* für die homologe, rekombinante Überexpression der Tyrosinase unter Zuhilfenahme des Plasmid-Vektors pIJ703 beschrieben wurde [191]. In diesem Plasmid ist die Leserichtung der insertierten Gene die Gleiche wie in pIJ702, jedoch befindet sich das *mel*-Operon hier stromaufwärts vom Thiostrepton-Resistenz-Gen. Mit diesem System konnte aus 4 l Kulturmedium eine 50 µM Tyrosinase-Lösung präpariert werden, deren spezifische Aktivität mit 1000 ± 50 U/mg angegeben wurde. Hierbei handelte es sich um ein quasi natives Enzym, da die Überexpression des Zielproteins in seinem Ursprungsorganismus (*S. antibioticus*) erfolgte.

Vor wenigen Jahren wurde eine Methode publiziert, mit der die Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* in *E. coli* rekombinant hergestellt werden kann [37]. Hierbei konnten aus 1,25 l Kultur 12 mg Tyrosinase isoliert werden, deren spezifische Aktivität bei 1100 U/mg lag. Dieses Verfahren wurde von Matoba *et al.* [36] genutzt, um das Enzym zu kristallisieren und seine Struktur aufzuklären, in der hier vorliegenden Arbeit konnte es aber wegen mangelnder Ressourcen nicht angewandt werden.

Zwar ist die Isolation einer rekombinanten Tyrosinase mit dem in dieser Arbeit verwendeten Expressionssystem offensichtlich nicht möglich, jedoch kann in weiterfüh-

renden Arbeiten die Umsetzung dieses Vorhabens mit einem modifizierten System angestrebt werden. Durch die Umklonierung des *mel*-Operons könnte beispielsweise versucht werden, das Plasmid pIJ703 aus dem vorliegenden Vektor pIJ702 selbst herzustellen. Aufgrund der von Bubacco *et al.* erzielten Erfolge scheint die anschließende Verwendung von *S. antibioticus* als homologen Wirt für die Überexpression sinnvoll zu sein. Die hierfür erforderlichen, finanziellen und technischen Mittel standen bisher allerdings noch nicht zur Verfügung.

4.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit der Etablierung eines Systems zur rekombinanten Expression der Tyrosinase wäre die Grundlage geschaffen, ortsgerechte Mutationen zu erzeugen und so die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Enzymaktivität zu untersuchen.

Auf diesem Gebiet wurden in der Vergangenheit an der Tyrosinase aus *S. glaucescens* bereits einige Versuche durchgeführt. Neben der Identifizierung der kupferligandierenden Histidine [172, 233] wurden die beiden Positionen Asn-191 und Asp-209 wegen ihrer Beteiligung an der Ausbildung von H-Brücken als essentiell für die Enzymaktivität beschrieben [172, 197]. Wie in Kapitel 3.3 jedoch bereits geschildert wurde, stellen bei der Tyrosinase aus *S. antibioticus* die Aminosäuren Gly-204 und Ile-42 die interessantesten Positionen für eine gerichtete Mutagenese dar (Abb. 3.36). Durch ihre Lage am Zugang zum aktiven Zentrum würde ein Austausch einer dieser Aminosäuren gegen ein Phenylalanin eine Situation hervorrufen, die strukturell der Catecholoxidase ähnlich wäre. Somit könnte durch eine vergleichende Aktivitätsbestimmung von Mutante und Wildtyp-Enzym geklärt werden, ob ein räumlich auf diese Weise beschränkter Zugang zum aktiven Zentrum die Fähigkeit zur Hydroxylierung von Monophenolen beeinträchtigt. Bei einer Bestätigung könnte gefolgert werden, dass das Phenylalanin, das bei der *I. batatas*-Catecholoxidase die Position 261 einnimmt, durch Abschirmung des Cu_A -Atoms eine Monophenolase-Reaktion verhindert. Damit könnte erklärt werden, weshalb Tyrosinasen und Catecholoxidasen trotz des gleichartigen aktiven Zentrums über unterschiedliche katalytische Fähigkeiten verfügen. Des Weiteren ließe ein solcher experimenteller Befund den Schluss zu, dass die Bindung von monophenolischem Substrat an das Cu_A -Atom erfolgen muss.

Die Frage, ob die Substratbindung an Cu_A oder Cu_B erfolgt, wird in den folgenden Kapiteln weiter erörtert, wobei das Augenmerk auf den strukturellen Eigenschaften des aktiven Zentrums (4.3), sowie einem hypothetischen Reaktionsmechanismus (4.4) liegt.

4.3 Die 3-dimensionale Struktur der Tyrosinase aus *Streptomyces spec.*

Die räumliche Struktur von Tyrosinasen war bis vor kurzem unbekannt, weshalb in der Vergangenheit über ihren Reaktionsmechanismus nur anhand von synthetischen, anorganischen Modellkomplexen spekuliert werden konnte. Gegen Ende der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die erste Kristallstruktur einer Tyrosinase publiziert [36]. Da es sich hierbei um das Enzym aus einer *Streptomyces*-Spezies handelte, wurde die eingangs formulierte Annahme bestätigt, dass Bakterien dieser Gattung als Quelle für das Enzym außerordentlich gut geeignet sind.

Das in Kapitel 3.3 dargestellte Homologie-Modell der Tyrosinase aus *S. antibioticus* (Abb. 3.31) wurde etwa ein Jahr vor Veröffentlichung der Kristallstruktur der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* generiert. Die beiden Enzyme besitzen die gleiche Anzahl an Aminosäuren und verfügen über eine Sequenzidentität von über 80 % (Abb. 4.1).

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
S.ant : MIVRKNQASLTAEKRRFVAALLELKRTGRYDAFVITTEMAFLLGDTDNGERTGHRSPSFLPWRRRFLLEFERALQSVSDASVALPYWDWSA : 90
S.cas : MIVRKNQATLTAEKRRFVAALVLELKRSGRYDEFVRTTEMEFLLMSDITSGERTGHRSPSFLPWRRRFLLDFFQALQSVSDSSVTLPYWDWSA : 90

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
S.ant : DRSTRSSLWAPDFLGGTGRSRDGGQVMDGPFFAASAGNWPINVRVDSRTFLRRALGACVSELPTRAEVDSVLAMATYDMAPWNSGSDGFRNH : 180
S.cas : DRTVRSLSLWAPDFLGGTGRSTDGRVMDGPFFAASTGNWPINVRVDSRTYLRRLSGLGSSVAELPTRAEVESVLATISAYDLPPYNSASEGFRNH : 180

      *      200      *      220      *      240      *      260      *
S.ant : LEGWRGVNLENRVHVWVGGQMATVSPNDPVFWLHAYIDKLWAEWQRRHPSSPYLPGGGTPNVVDLNETMKPWNDITPAALLDHTRHYYT : 270
S.cas : LEGWRGVNLENRVHVWVGGQMATVSPNDPVFWLHAYVYDKLWAEWQRRHPDSAYVPTGGTPTDVVVDLNETMKPWNTVTRPADLLDHTAYYT : 270

S.ant : FDV : 273
S.cas : FDA : 273

```

Abb. 4.1: Sequenz-Alignment der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* (*S.ant*) und *S. castaneoglobisporus* (*S.cas*). Die kupferligandierenden Histidine sind blau, Isoleucin 42 und Glycin 204 sind orange unterlegt. Die Sequenzidentität liegt bei 82 %, die Sequenzhomologie bei 91 %.

Das Homologie-Modell und die Kristallstruktur der beiden *Streptomyces*-Tyrosinasen weisen über weite Strukturbereiche und vor allem im aktiven Zentrum sehr große

Übereinstimmungen auf (Abb. 3.33 und 3.34), obwohl die als Vorlagestruktur für das Modell gewählte Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *I. batatas* lediglich über eine Sequenzidentität von 26 % mit der Tyrosinase aus *S. antibioticus* verfügte. Die Tatsache, dass zumindest die zentralen Bereiche der Typ-3-Kupferproteine stark konserviert sind, sowie die große Ähnlichkeit der Tyrosinasen innerhalb der Gattung *Streptomyces* führen zu dem Schluss, dass die modellierte Struktur der *S. antibioticus*-Tyrosinase im Bereich um das aktive Zentrum den tatsächlichen Verhältnissen sehr nahe kommt.

Hinsichtlich der Geometrie des aktiven Zentrums ergeben sich hieraus interessante Einblicke. Die Analyse der Atomabstände führte bei der Modell- und der Kristallstruktur zu sehr ähnlichen Werten, wobei in beiden Fällen die *met*-Form des Enzyms betrachtet wurde. In der *met*-Form sind beide Cu(II)-Atome über einen (*met I*) oder zwei (*met II*) Hydroxid-Liganden verbrückt. Bei der hier betrachteten *met II*-Form sind die Cu-Atome jeweils tetragonal-pyramidal koordiniert, wobei die beiden verbrückenden OH-Liganden, sowie zwei Histidine-Reste in den äquatorialen Positionen liegen und ein Histidin-Rest die axiale Position besetzt (Abb. 4.2), die Koordinationszahl des in der äquatorialen Ebenen liegenden Cu-Atoms ist somit 5.

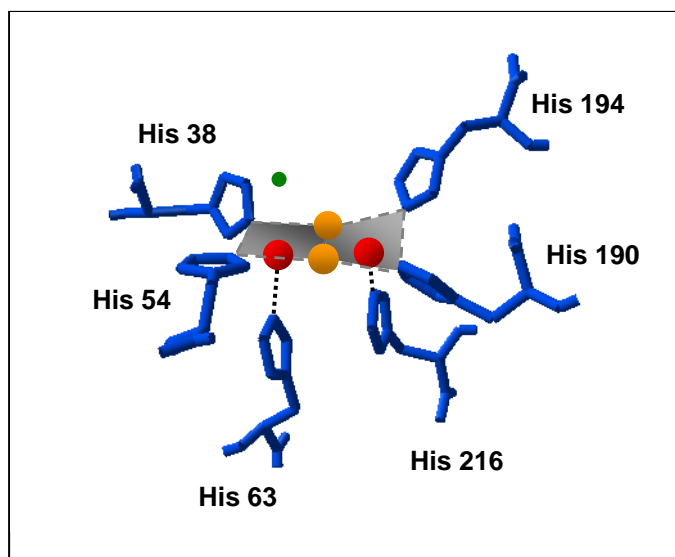


Abb. 4.2: Das aktive Zentrum der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase in der *met II*-Form.

Die Histidin-Reste His-38 und His-54 (Cu_A) bzw. His-190 und His-194 (Cu_B), sowie die beiden Hydroxid-Liganden (orange Kugeln) bilden die äquatorialen Positionen, die Histidin-Reste His-63 (Cu_A) und His-216 (Cu_B) bilden die axialen Positionen der tetragonal-pyramidalen Koordination beider Cu-Atome (rote Kugeln).

Die äquatorialen Ebenen sind durch graue Flächen dargestellt, die axiale Koordination durch gepunktete Linien. Der grüne Punkt symbolisiert die *trans*-Position von His-63. Erläuterungen im Text.

Anhand der Bindungsabstände zu den Cu-Atomen konnten in der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase His-63 und His-216 als axiale Liganden identifiziert werden, während His-38 und His-54, sowie His-190 und His-194 äquatorial orientiert sind [6]. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Darstellungen von Matoba *et al.*, in denen die axialen Positionen His-54 und His-190 zugewiesen werden [36].

In der *met I*-Form liegen diese beiden Histidine tatsächlich an apikalen Positionen, jedoch sind die Cu-Atome in dieser Oxidationsform tetraedrisch koordiniert. Dabei bilden zwei Histidin-Reste sowie ein verbrückender OH-Ligand die Basis und ein Histidin-Rest die Spitze eines leicht gestreckten Tetraeders, in dessen Zentrum das Cu-Atom mit der Koordinationszahl 4 liegt. Bei der *met II*-Form, die hinsichtlich der Cu-Koordination und der Atomabstände der reaktiven *oxy*-Form sehr ähnlich ist, kann anhand der Bindungslängen der drei $N_{\epsilon}(\text{His})\text{-Cu}_A$ -Abstände eindeutig His-63 die axiale Position zugeordnet werden. Beim Cu_B -Atom sind die Unterschiede in den Atomabständen zwar weniger stark, jedoch kann hier His-216 als axialer Ligand identifiziert werden, da die $N_{\epsilon}(\text{His}216)\text{-Cu}_B$ -Bindung sowohl in der *met II*-, als auch in der *oxy*-Form die längste der drei N-Cu-Bindungen ist [6]. Bei dem Homologie-Modell der *S. antibioticus*-Tyrosinase konnten diese Verhältnismäßigkeiten nur für Cu_A gefunden werden (Tab. 3.9), jedoch ist hierbei auch der Einfluss der Vorlagestruktur zu berücksichtigen, der eine Analyse auf der Grundlage von Unterschieden in den Atomabständen im Sub-Angströmbereich nur bedingt ermöglicht. Deshalb wird bei der späteren Betrachtung des Reaktionsmechanismus die kristallographisch gelöste Struktur der *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase herangezogen.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Zuordnung ist, dass die *trans*-Position von His-63 im Gegensatz zu der *trans*-Position von His-54 von der Proteinoberfläche aus frei zugänglich ist und somit eine Substratbindung an Cu_A möglich bleibt. Da die *trans*-Position von His-216 ebenfalls frei zugänglich ist, kann die Bindung von Substrat prinzipiell aber auch an Cu_B erfolgen. Das ebenfalls Cu_B -ligandierende His-194 könnte jedoch durch hydrophobe Wechselwirkung die Stellung des Phenylrings eines Substratmoleküls beeinflussen und so wiederum die Substratbindung an Cu_A begünstigen. Gestützt wird diese Annahme durch die Kristallstruktur des binären Komplexes aus Tyrosinase und dem assoziierten Hilfsproteins ORF378 [6, 36]. Dort ragt eine Tyrosin-Seitenkette (Tyr-98) vom ORF378 in die Substratbindungstasche der Tyrosinase, wobei die Orientierung dieser Seitenkette durch eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem His-194 beeinflusst wird. Eine Oxidation dieses Tyrosins wird durch die Fixierung am ORF378 und dem daraus resultierenden Abstand zum aktiven Zentrum verhindert. Wie bereits geschildert wurde, finden sich vergleichbare Anordnungen auch im Hämocyanin von *L. polyphemus* und der Catecholoxidase aus *I. batatas* (Abb. 4.3). Bei ersterem ragt ein Phenylalanin (Phe-49) in die Substratbindungstasche und wird durch das Cu_B -ligandierende His-328 stabilisiert [24], bei der

Catecholoxidase kann aus der Stellung des Inhibitors Phenylthioharnstoff (PTU) abgeleitet werden, dass der Phenylring von potentiellm Substrat ebenso wie der Phenylring des PTU mit dem Cu_B-ligandierenden His-244 interagiert [6, 35, 43, 44]. Im Falle der Catecholoxidase würde dadurch aber die Bindung von diphenolischem Substrat an Cu_B begünstigt. Die Tatsache, dass ein Phenylalanin (Phe-261) in der Catecholoxidase den Zugang zu Cu_A blockiert, während dieser bei der *Streptomyces*-Tyrosinase frei bleibt, untermauert diese These und wurde bereits als eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Katalyseaktivität von Tyrosinasen und Catecholoxidasen diskutiert (siehe Kapitel 3.3 und 4.2.2).

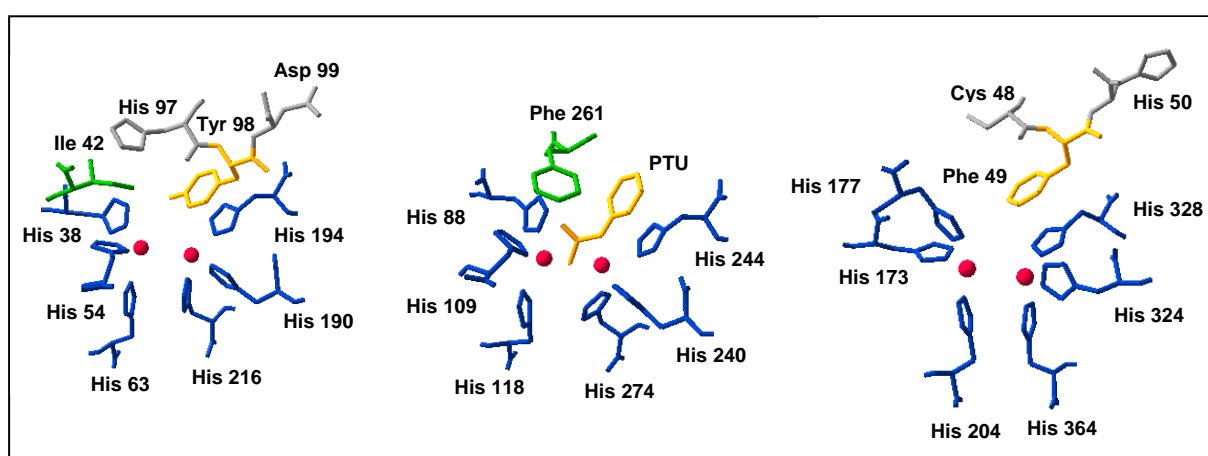


Abb.4.3: Die aktiven Zentren der Tyrosinase aus *S. castaneoglobisporus* (A), der Catecholoxidase aus *I. batatas* (B) und des Hämocyanins aus *L. polyphemus* (C). Neben den Kupferatomen (rot) und den kupferligandierenden Histidinen (blau) ist bei der Tyrosinase das Ile-42 (grün) dargestellt, welches ein strukturelles Äquivalent des Phe-261 in der Catecholoxidase ist. Das Tyr-98 (gelb), sowie die unmittelbar benachbarten Aminosäurereste His-97 und Asp-99 (grau) stammen vom Hilfsprotein ORF378. Bei der Catecholoxidase ist außer dem Phe-261 (grün), welches Cu_A (links) verdeckt der Inhibitor PTU (gelb) dargestellt. Beim Hämocyanin stammen das Phe-49 (gelb) und seine benachbarten Aminosäurereste Cys-48 und His-50 (grau) aus Domäne I, während das Kupferzentrum in Domäne II lokalisiert ist.

Anhand der gewonnenen Kenntnisse über die Struktur der Tyrosinase und den bereits vorhandenen Informationen über die Struktur der Catecholoxidase bzw. deren Wechselwirkung mit einem substratanalogen Inhibitor kann die Frage nach der Substratbindungsstelle bei der Tyrosinase noch immer nicht abschließend geklärt werden. Da einige der oben diskutierten Punkte auf eine Substratbindung an das Cu_A-Atom spricht, wird im folgenden Kapitel ein hypothetischer Reaktionsmechanismus vorgestellt, der diesen Hinweisen Rechnung trägt und eine mechanistische Erklärung der Monophenolhydroxylierung bietet.

4.4 Der Reaktionsmechanismus der Tyrosinase

Die Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring eines Monophenols in *ortho*-Position (Monophenolase-Reaktion) stellt den chemisch anspruchsvollsten Schritt der Tyrosinase-Aktivität dar und ist mit der Zwei-Elektronen-Oxidation des entstehenden *o*-Diphenols zum korrespondierenden *o*-Dichinon (Diphenolase-Reaktion) gekoppelt. Die im vorangegangenen Kapitel erörterten, strukturellen Eigenschaften der Tyrosinase, insbesondere im Bereich des aktiven Zentrums legen ein Reaktionsschema nahe, das in Abb. 4.4 wiedergegeben ist und dem eingangs dargestellten Reaktionsmechanismus von Tepper *et al.* [51] in den wesentlichen Punkten entspricht (Abb. 1.3).

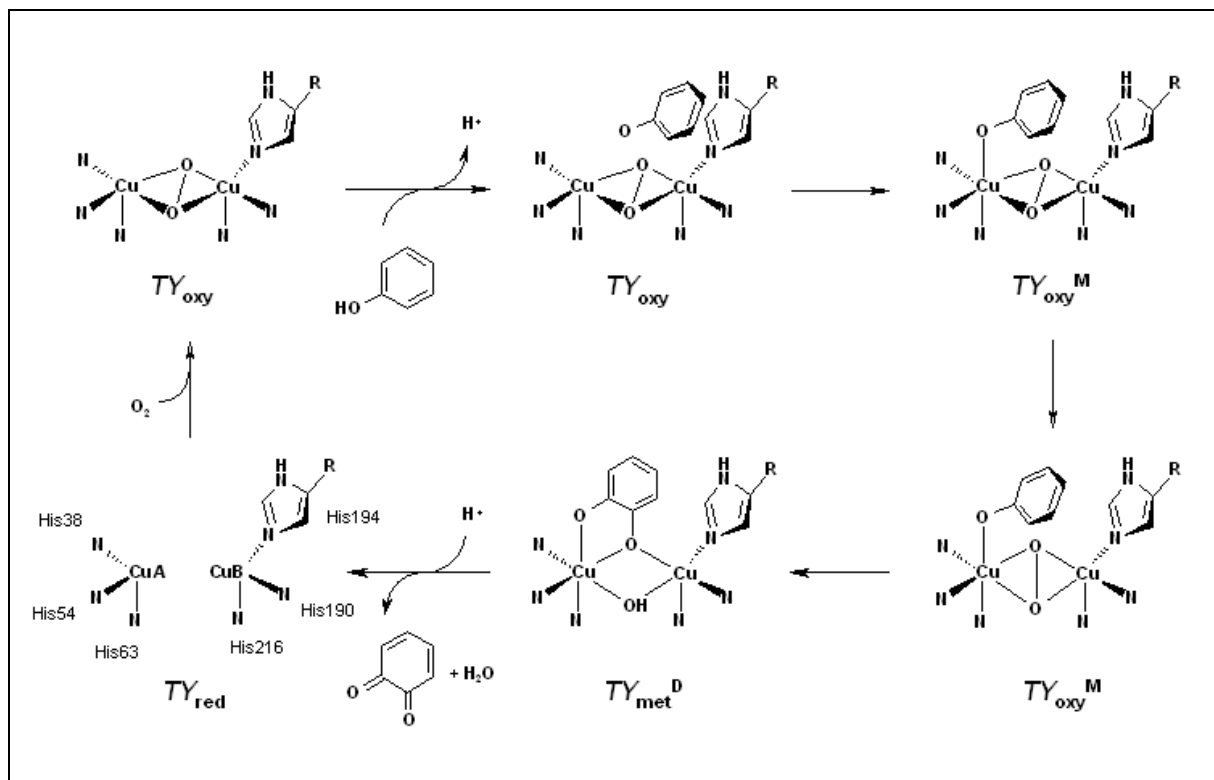


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Hydroxylierung und der direkt nachfolgenden Oxidation von Monophenolen durch die Tyrosinase in Anlehnung an Decker *et al.* [6]. Erläuterungen im Text.

Während Tepper *et al.* aufgrund fehlender, struktureller Informationen über die Tyrosinase, die Substratbindung in Analogie zur Catecholoxidase an Cu_B annahmen, wird in dem hier vorgeschlagenen Schema die Wechselwirkung von phenolischem Substrat mit dem Imidazolring des His-194 mit einbezogen, weshalb die Substratbindung an Cu_A vielfach wahrscheinlicher ist. Ein Monophenol wird somit nach der Annäherung an das oxygenierte Cu-Zentrum zunächst durch die hydrophobe Wechselwir-

kung orientiert, wodurch die C-O-Bindung des Monophenols auf das Cu_A-Atom gerichtet ist. Das O-Atom koordiniert nach einer Verschiebung des Substrats Cu_A in *trans*-Position zu His-63, während die O-O-Achse des Peroxidliganden in Richtung des Phenylrings vom Substrat rotiert. Da das Substratmolekül etwas um die C-O-Achse rotieren kann, wird auf diese Weise eine räumliche Nähe der *ortho*-Position des Phenylrings zum Peroxidliganden geschaffen, was eine elektrophile, aromatische Substitution (S_E) durch das Peroxid ermöglicht. Der elektrophile Charakter der *side-on* koordinierten Peroxogruppe, der durch eine starke Ladungsdonierung in die Cu(II)-Zentren erklärt wird [234, 235], führt dabei gleichzeitig zu einer *o*-Hydroxylierung des Substratmoleküls und einer Spaltung der O-O-Bindung des Peroxids. Das nun bidentat gebundene *o*-Diphenol wird anschließend direkt zum *o*-Dichinon oxidiert und gemeinsam mit einem Molekül Wasser freigesetzt, wodurch die *deoxy*-Form des Cu-Zentrums regeneriert wird.

Der von Matoba *et al.* vorgeschlagene Reaktionsmechanismus [36] geht wie bei Tepper *et al.* von einer Bindung des Monophenols an Cu_B aus, fordert dann aber eine bidentate Bindung des Diphenolintermediats an beide Cu-Atome. Dass die hierfür erforderliche Lösung der N-Cu_A-Bindung von His-54 aufgrund der tatsächlich vorhandenen, sterischen Flexibilität dieser Seitenkette möglich ist, muss aber auf der Grundlage bisheriger Erkenntnisse über die Chemie von Typ-3-Kupferproteinen bezweifelt werden. Die bidentate Bindung des Intermediats an beide Cu-Atome wurde zwar in der Vergangenheit mehrfach in Betracht gezogen, eine reversible Ablösung eines der ligandierenden Histidine wurde in diesem Zusammenhang jedoch kontrovers diskutiert [2, 47, 50, 55, 57, 237, 238].

Ausgehend von dem oben dargestellten Mechanismus der Monophenolase-Reaktion kann auch für die Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase ein Reaktionsmechanismus formuliert werden, bei dem diphenolisches Substrat auf ähnliche Weise orientiert wird, wie es für monophenolisches Substrat postuliert wurde (Abb. 4.5). Dadurch wird die C-O-Bindung einer der beiden OH-Gruppen des Diphenols auf das Cu_A-Atom ausgerichtet, während die andere OH-Gruppe auf das *side-on* koordinierte Peroxid bzw. den Hydroxid-Liganden der *met I*-Form zuweist. Im Gegensatz zu der Monophenolase-Reaktion kann die Zwei-Elektronen-Oxidation von Diphenolen nicht nur durch die *oxy*-Form der Tyrosinase katalysiert werden, sondern auch durch deren *met I*-Form [6, 8, 35, 50-52, 237]. In beiden Fällen führt die Oxidation des Substrats

zur Bildung von H_2O , wodurch die *oxy*-Form des Enzyms nach der Reaktion in die *met I*-Form überführt wird, die *met I*-Form wiederum nach der Reaktion mit einem zweiten Substratmolekül zur *deoxy*-Form reduziert wird. Diese kann dann erneut molekularen Sauerstoff aufnehmen, um die reaktive *oxy*-Form zu regenerieren.

Die Bindung von Monophenolen an die *met I*-Form führt zur Bildung des vorne beschriebenen *dead end* Komplexes [50, 51], der für die Lag-Phase beim Umsatz dieser Substrate verantwortlich gemacht wird [48, 61, 62]. Inwieweit die *met II*-Form physiologisch relevant ist und ob diese gegebenenfalls im Reaktionszyklus der Mono- oder Diphenolase-Aktivität zwischengeschaltet ist, kann wegen fehlender, experimenteller Befunde nicht festgelegt werden.

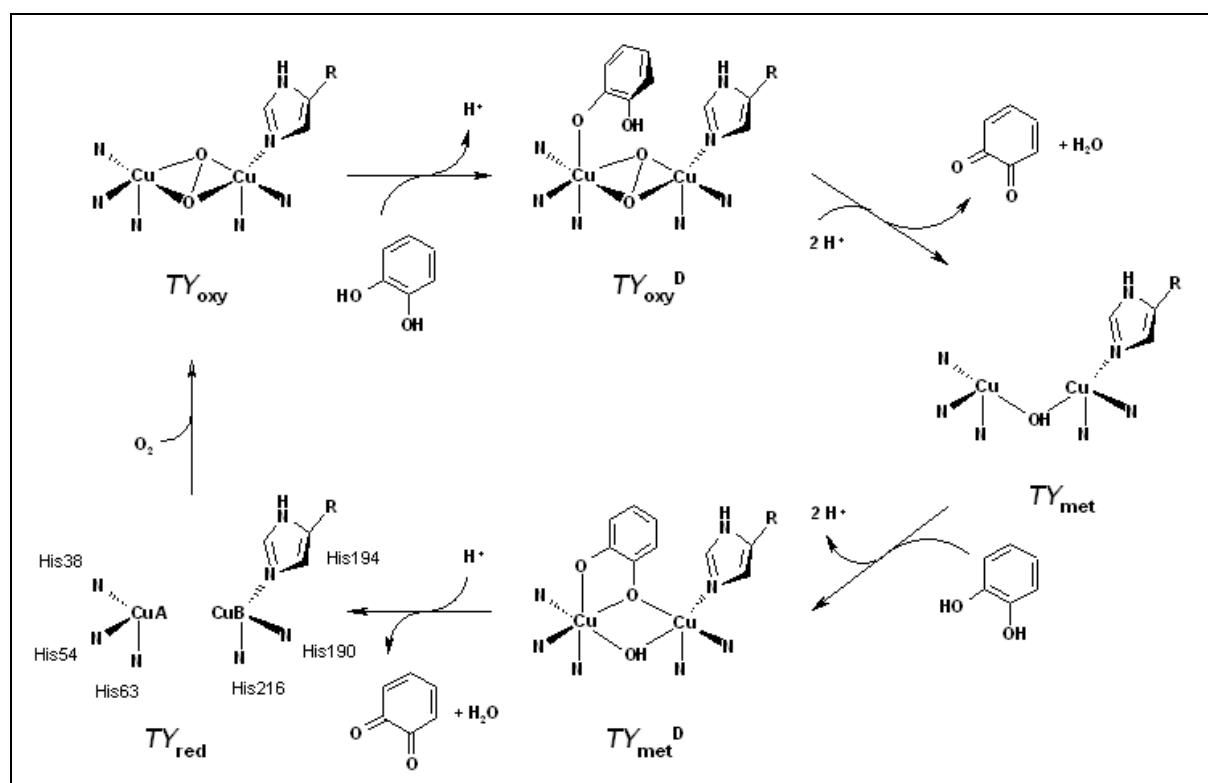


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Oxidation von Diphenolen durch die Tyrosinase. Die Katalyse der Reaktion durch die Catecholoxidase verläuft prinzipiell auf die gleiche Weise, wobei die Substratbindung jedoch an Cu_B und nicht an Cu_A erfolgt [238]. Erläuterungen im Text.

Abgesehen von der Substratbindungsstelle ist das beschriebene Schema weitgehend identisch mit dem von Tepper *et al.* [51] vorgestellten Mechanismus der Diphenolase-Reaktion (Abb. 1.3). Das hier vorgeschlagene Modell lässt zudem theoretisch auch die Bindung von Diphenol an Cu_B zu, wenn man davon ausgeht, dass die mechanistisch weniger anspruchsvolle Oxidationsreaktion keine Vororientierung des Substratmoleküls erfordert. Aus demselben Grund ist die Zuordnung von Cu_A und

Cu_B auch bei Tepper *et al.* prinzipiell austauschbar. Es ist sogar denkbar, dass die Diphenoloxidation bei der Tyrosinase an beiden Cu-Atomen gleichermaßen möglich ist. Die Möglichkeit, dass die Substratbindung an Cu_B für diese Reaktion zwingend erforderlich ist, kann jedoch bislang nicht ausgeschlossen werden. Die in der Kristallstruktur erkennbaren, sterischen Verhältnisse am aktiven Zentrum und allem voran die Rolle von His-194 legen die beschriebene hydrophobe Wechselwirkung mit Substratmolekülen und die dadurch hervorgerufene Bindung an Cu_A jedoch nahe und würden eine zusätzliche Abgrenzung von Tyrosinasen zu Catecholoxidasen schaffen.

4.5 Die Reaktionskinetik der Tyrosinase

Die oben dargestellten, enzymatischen Reaktionen können mit einer Vielzahl verschiedener mono- und diphenolischer Verbindungen erfolgen, wobei häufig nicht das namensgebende L-Tyrosin und dessen korrespondierendes Diphenol L-Dopa unter physiologischen Bedingungen die bevorzugten Substrate sind. Die Effizienz dieses Umsatzes hängt dabei sowohl von der Struktur des Substratmoleküls, als auch von der betrachteten Tyrosinase ab.

4.5.1 Unterschiede in der Reaktionskinetik der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus*

Die in den Kapiteln 3.4.3 und 3.4.4 dargestellten Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Reaktionskinetiken der Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* gegenüber jeweils zwei, exemplarisch gewählten, mono- und diphenolischen Substraten. Des Weiteren wurde an dieser Stelle der Einfluss zweier Inhibitoren auf die Diphenolase-Aktivität der beiden Enzyme betrachtet. Bei einem dieser Inhibitoren (L-Mimosin) handelt es sich um eine substratanaloge Verbindung, der andere (Homocystein) trat ähnlich wie PTU in der *I. batatas*-Catecholoxidase mit einer freien Schwefelgruppe in Wechselwirkung mit dem zweikernigen Kupferzentrum des Enzyms [35, 217].

Bei der Betrachtung der Umsatzkinetiken der beiden untersuchten Tyrosinasen sind folgende Punkte festzuhalten:

- Die Substratspezifität der Tyrosinasen hinsichtlich L-Tyrosin / L-Dopa und deren decarboxylierte Derivate Tyramin / Dopamin verhält sich offenbar entgegengesetzt. Während die *A. bisporus*-Tyrosinase erstere mit höherer Effizienz umsetzt, als letztere, katalysiert die *S. antibioticus*-Tyrosinase den Umsatz von L-Tyrosin(-Methylester) und L-Dopa schneller, als den Umsatz von Tyramin und Dopamin (Tab. 3.10).
- Eine Substratinhibition beim Umsatz von Tyramin und Dopamin konnte nur bei der *A. bisporus*-Tyrosinase festgestellt werden. Im Falle der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurde selbst weit jenseits der physiologischen Substratkonzentration noch eine anhaltende Sättigung beobachtet.
- Die reversible Inhibition durch Homocystein hat wie die reversible Inhibition durch L-Mimosin kompetitiven Charakter. Sowohl mit Homocystein, als auch mit L-Mimosin war die Hemmung der Enzymaktivität bei der *A. bisporus*-Tyrosinase stärker ausgeprägt, als bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase (Tab. 3.13 und 3.16).

Die Ursachen dieser Unterschiede im Reaktionsverhalten sind vermutlich auf verschiedenartige, strukturelle Eigenschaften der beiden Tyrosinasen zurück zu führen. Das bakterielle Enzym aus *S. antibioticus* liegt allem Anschein nach in seiner aktiven Form als Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa vor (siehe Kapitel 3.2), während das Enzym aus dem Pilz *A. bisporus* ein Heterotetramer bildet, in dem jeweils zwei identische Peptidketten mit Molekulargewichten von ca. 43 kDa ein reaktives, zweikerniges Kupferzentrum enthalten [3, 198]. Da die 3-dimensionale Struktur der *A. bisporus*-Tyrosinase allerdings bislang nicht aufgeklärt werden konnte, ist ein detaillierter Vergleich beider Enzyme auf dieser Ebene nicht möglich. Bezüglich der Substratinhibition kann lediglich vermutet werden, dass die *A. bisporus*-Tyrosinase über mindestens eine zusätzliche, periphere Substratbindungsstelle verfügt [206, 239]. Die Anbindung von Substrat an diese Stelle könnte zu einer Konformationsänderung des Enzyms führen, wodurch dessen katalytische Aktivität gedrosselt wird. Ob diese zweite Bindungsstelle an der katalytisch aktiven, schweren Untereinheit oder der kupferfreien, leichten Untereinheit lokalisiert ist und ob möglicherweise mehrere solcher Bindungsstellen in die Regulation involviert sind, ist aber völlig unklar.

Für die meisten der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, kinetischen Enzym-Parameter der *S. antibioticus*-Tyrosinase existieren bisher keine Vergleichswerte. Durch die bereits in Kapitel 3.4 diskutierten Ergebnisse und einen Vergleich mit den Werten für die *A. bisporus*-Tyrosinase, deren Gültigkeit anhand von Literaturwerten abgesichert wurde, können die Enzym-Parameter der *S. antibioticus*-Tyrosinase aber als verlässlich angesehen werden.

Das bei der *A. bisporus*-Tyrosinase beobachtete Phänomen der Substratinhibition durch Tyramin und Dopamin ist bislang in der Literatur ebenfalls nicht beschrieben worden und stellt im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung dieses Enzyms in seiner aktiven, tetrameren Form einen interessanten Ausgangspunkt für weiter Studien an komplex organisierten Tyrosinasen dar.

4.5.2 Einfluss von Weinhaltstoffen auf die Aktivität der Tyrosinase aus *A. bisporus*

Wein beinhaltet neben Alkohol, organischen Säuren und einigen anderen Inhaltsstoffen, wie Kohlenhydraten, Proteinen und Vitaminen auch eine breite Palette an phenolischen und polyphenolischen Verbindungen. Der Gehalt dieser sekundären Pflanzenstoffe variiert je nach Rebsorte und Verarbeitungsprozess, wobei Rotweine in aller Regel ein deutlich höheres Maß aufweisen, als Rosé und Weißweine [221].

Gehalt und Zusammensetzung der Polyphenole im Wein kann sich im Verlauf der Weinherstellung (Vinifikation) verändern. Zum einen können einige Polyphenole bei ausreichendem Oxidationsdruck während der Reifung spontan zu Tanninen polymerisieren, zum anderen können Polyphenoloxidasen, wie die weineigene Tyrosinase oder exogene Enzyme, wie beispielsweise die Laccase aus *Botrytis cinerea* (Edelfäulepilz) die Polyphenole oxidieren und deren Polymerisation begünstigen [240, 241].

Je nach Mostbehandlung können Weiß- und Roséweine nach Abschluss der alkoholischen Gärung noch eine Tyrosinase-Aktivität aufweisen, die ihnen eine mehr oder weniger hohe Oxidationsempfindlichkeit verleiht. Diese Aktivitäten werden jedoch beim ersten Abstich durch Schwefelung oder Schönung völlig eliminiert. Rotweine zeigen in keinem Fall Tyrosinase-Aktivität, wofür die hemmende Wirkung von Tanninen und deren Eigenschaft, Proteine zu binden, verantwortlich gemacht wird [242-244].

Manche der im Wein enthaltenen Polyphenole können als Substrate von Tyrosinasen umgesetzt werden, andere wiederum sind potentielle Inhibitoren dieses Enzyms [245-248].

Mit den in Kapitel 3.4.5 dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Inhaltsstoffe des Weins in ihrer Gesamtheit eine stark hemmende Wirkung auf die Tyrosinase-Aktivität ausüben, die Aktivität anderer Enzyme aber offensichtlich nicht beeinflussen. Aufgrund der fehlenden technischen Möglichkeiten zur Isolation einzelner Verbindungen aus den Weinen konnte die Inhibition der Tyrosinase jedoch hier nicht im Detail analysiert werden. Die zusätzlich durchgeführte Untersuchung des Einflusses von Rotweineextrakt, der sich laut Hersteller zu 95 % aus Polyphenolen zusammensetzte, bestätigte aber, dass die Hemmung der Tyrosinase-Aktivität im Wein auf diese Substanzklasse zurückzuführen ist. Der oxidative Umsatz von Polyphenolen durch die Tyrosinase beschränkt sich somit offensichtlich auf einige wenige dieser Verbindungen. Im Falle des Flavonols Quercetin ist ein solcher Umsatz beschrieben worden, jedoch fungiert dieses nicht nur als Substrat für die Tyrosinase, sondern kann deren Aktivität auch inhibieren [247-250]. Entscheidend dafür, ob Quercetin oxidiert wird oder die Enzymaktivität hemmt, ist dabei vermutlich die Orientierung des Moleküls bei der Bindung an das Enzym. Eine Wechselwirkung des diphenolischen Rings (Ring B in Abb. 4.6) mit dem aktiven Zentrum führt zu einem katalytischen Umsatz, die Bindung mit dem Pyronring (Ring A in Abb. 4.6) führt zu einer reversiblen Blockade des aktiven Zentrums [249].

Das Stilben Resveratrol unterliegt ebenfalls zunächst einem oxidativen Umsatz durch die Tyrosinase, das gebildete 2,4-Dihydroxyresveratrol inhibiert die Enzymaktivität anschließend jedoch sehr stark. Somit ist diese Verbindung als ein „Selbstmord-Substrat“ der Tyrosinase zu betrachten [245]. Das ebenfalls als sekundärer Pflanzenstoff vorkommende Oxyresveratrol ist hingegen als starker nicht-kompetitiver Inhibitor beschrieben worden [251]. Die glykosidische Form des Resveratrols, das sogenannte Piceid, wird von der Tyrosinase nicht umgesetzt, weshalb in Gegenwart dieser Substanz die Aktivität des Enzyms auch nicht beeinflusst wird [252].

Die Beeinflussung der Tyrosinase-Aktivität durch Quercetin und Resveratrol wurde in einer an diesem Institut fertig gestellten Diplomarbeit untersucht, wobei die oben geschilderten Sachverhalte weitgehend bestätigt werden konnten [225]. Da die Messungen in dieser Arbeit ebenso, wie die in Kapitel 3.4.5 dargestellten Messungen zu

einem Zeitpunkt erfolgten, zu dem die gereinigte Tyrosinase aus *S. antibioticus* noch nicht zur Verfügung stand, wurde auch an dieser Stelle ausschließlich die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus *A. bisporus* eingesetzt.

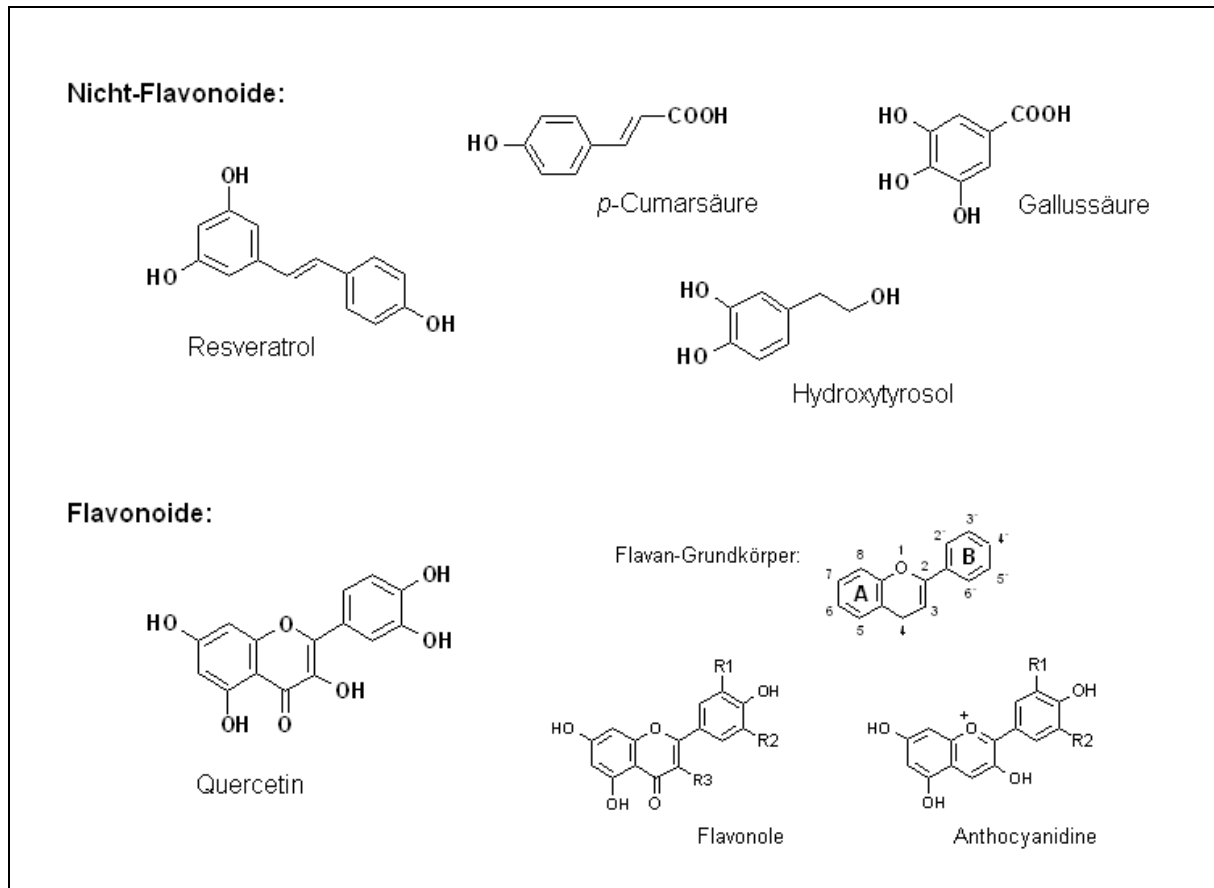


Abb. 4.6: Beispiele für phenolische und polyphenolische Verbindungen im Wein, die potentielle Substrate und / oder Inhibitoren der Tyrosinase darstellen. Resveratrol liegt sowohl frei, als auch in der glykosylierten Form, dem Piceid vor. Die Hydroxyzimtsäure *p*-Cumarsäure liegt überwiegend frei und nicht-glykosyliert vor, die Gallussäure bindet häufig glykosidisch an D-Glucose und bildet so eine von vielen Grundstrukturen für Tannin. Hydroxytyrosol wird erst während der Vinifikation durch Desaminierung und Hydroxylierung aus L-Tyrosin gebildet. Die Beteiligung der Tyrosinase bei diesem Prozess ist nicht belegt [240]. Anthocyanidine und Flavonole kommen in der Weintraube meist als Glykoside vor und polymerisieren zu den kondensierten Tanninen.

Hinsichtlich der gesundheitsrelevanten Effekte der im Wein enthaltenen Polyphenole ist die Beeinflussung der Tyrosinase jedoch kein wesentlicher Aspekt, weshalb eine Fortführung der Untersuchungen nicht sinnvoll erscheint. Die Wechselwirkung von Quercetin und Resveratrol mit der Tyrosinase ist zudem bereits mehrfach und ausführlich beschrieben worden und liefert keine tiefergehenden Erkenntnisse hinsichtlich ihrer Bedeutung für physiologische Prozesse [245-252].

Eine interessante Zielsetzung ergibt sich aus den antioxidativen [218-220] und anti-karzinogenen Eigenschaften der Polyphenole [221, 253, 254], sowie ihrer protekti-

ven Wirkung gegenüber koronaren Herzerkrankungen durch eine Beeinflussung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase [255-257]. Letzteres wird derzeit am Institut für Pharmakologie der Johannes Gutenberg-Universität (AG Förstermann) intensiv untersucht.

4.6 Enzymatisches Quervernetzen von Proteinen durch Tyrosinasen und aktiviertes Hämocyanin

Neben der Oxidation niedermolekularer, phenolischer und polyphenolischer Verbindungen können Tyrosinasen auch die oxidative Quervernetzung von Proteinmolekülen katalysieren (Abb. 1.5). Die in den Kapiteln 3.5.1 und 3.5.2 geschilderten Experimente zeigen, dass dieser Prozess je nach Ursprung des Enzyms mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen kann. Auch das Sauerstoff-Transportprotein Hämocyanin aus der Hämolymphe der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, das unter anderem mittels SDS zu einer Phenoloxidase aktiviert werden kann, ist im Stande, diese Quervernetzung *in vitro* durchzuführen (Kapitel 3.5.3 und 3.5.4). Dieser Befund, sowie der erfolgreiche Nachweis von Hämocyanin in der Kutikula von *E. californicum* (Kapitel 3.5.5), weisen darauf hin, dass die autokatalytische Quervernetzung von Hämocyanin unter Anwesenheit katalytischer Mengen phenolischer Verbindungen einen möglichen Mechanismus für die Sklerotisierung der Arthropoden-Kutikula darstellt.

4.6.1 Unterschiedliche Effizienz beim Einsatz verschiedener Tyrosinasen

24-meres Hämocyanin aus der Hämolymphe von *E. californicum*, sowie monomeres Rinderserum-Albumin (BSA) wurden zum einen mit der Tyrosinase aus *S. antibioticus*, zum anderen mit der Tyrosinase aus *A. bisporus* inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass beide Tyrosinasen eine kovalente Verknüpfung von Hämocyanin-Untereinheiten hervorriefen, BSA jedoch nicht ohne weiteres quervernetzt werden konnte. Erst in Gegenwart sehr großer Mengen vernetzender Agenzien, also phenolischer Tyrosinase-Substrate, konnte auch beim BSA die Bildung von oligomeren Aggregaten erreicht werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die eingeschränkte Zugänglichkeit potentieller Angriffspunkte für ein enzymatisches Quervernetzen auf der Oberfläche dieses Proteins. Da hierfür aber eine ganze Reihe von Seitenketten in Frage kommt (Tyr, Arg, Asn, Gln, Lys, Cys und Pro), kann nicht ausgeschlossen

werden, dass eine ausgedehnte Glykosylierung eine Quervernetzung von BSA durch Tyrosinasen behindert. Da von BSA keine Strukturdaten vorliegen, kann hierüber jedoch nur spekuliert werden.

Bei der Vernetzung von Hämocyanin-Untereinheiten ergaben sich gewisse Unterschiede im Reaktionsverhalten der beiden Tyrosinasen (Abb. 3.55). Während das Enzym aus *S. antibioticus* auch in Abwesenheit phenolischer Substrate die Bildung kovalent verknüpfter Dimere hervorrief, war das Enzym aus *A. bisporus* zwingend auf die Anwesenheit quervernetzender Agenzien angewiesen. Die *A. bisporus*-Tyrosinase erzeugte unter diesen Bedingungen, wie auch die *S. antibioticus*-Tyrosinase, diskrete Aggregate in der Größenordnung von Tri- und Tetrameren, sowie von höheren Oligomeren. Bei der *S. antibioticus*-Tyrosinase waren stets noch zusätzliche Dimere nachweisbar, die in den Ansätzen mit der *A. bisporus*-Tyrosinase jedoch fehlten.

Die Ursache für diese Unterschiede könnte, wie es auch schon bei der Reaktionskinetik vermutet wurde, in der verschiedenartigen Struktur der beiden Enzyme liegen. Es ist denkbar, dass erst die freie Zugänglichkeit des aktiven Zentrums der *S. antibioticus*-Tyrosinase eine Bindung des Enzyms an das zu vernetzende Protein gewährt, was bei der *A. bisporus*-Tyrosinase unter Umständen nicht möglich ist. Der Zugang zum aktiven Zentrum könnte dort soweit limitiert sein, dass nur frei diffundierendes Substrat umgesetzt werden kann, Seitenketten von Proteinoberflächen jedoch aufgrund sterischer Behinderung nicht weit genug in das aktive Zentrum hinein reichen. Somit wäre die *S. antibioticus*-Tyrosinase in der Lage, in Frage kommende Seitenketten ebenso umzusetzen, wie freie Substratmoleküle, die *A. bisporus*-Tyrosinase hingegen wäre möglicherweise zu ersterem gar nicht fähig. Endgültige Klarheit kann auch hier allerdings erst ein struktureller Vergleich der beiden Tyrosinasen erbringen. Wegen fehlender Kenntnisse über die Struktur der *A. bisporus*-Tyrosinase ist dies bislang jedoch nicht möglich.

Eine massenspektrometrische Analyse der durch die *S. antibioticus*-Tyrosinase ohne vernetzende Agenzien erzeugten Dimer-Bande ergab, dass es sich dabei fast ausschließlich um die Untereinheiten b und c des Hämocyanins handelte. Diese beiden Untereinheiten stehen phylogenetisch den Phenoloxidasen näher als die übrigen und sind offenbar die einzigen, die durch SDS aktiviert werden können [24, 229]. Dass nun ausgerechnet die Untereinheiten b und c durch die Tyrosinase bevorzugt verknüpft werden, ist erstaunlich. Einen möglichen Hinweis auf die Ursache liefert die

Betrachtung der Struktur des 24-meren Hämocyanins (Abb. 4.7). In diesem Oligomer liegen die genannten Untereinheiten in direkter Nachbarschaft zueinander und bilden die Grenzflächen der hexameren Substrukturen, was dafür spricht, dass die Wechselwirkung zwischen diesen Untereinheiten besonders stark ist. Bestätigt wird diese Annahme durch die Ergebnisse nativer Gelelektrophoresen und Immunelektrophoresen, in denen stets ein nicht-kovalent verknüpftes Heterodimer aus b und c nachgewiesen werden konnte [24, 25]. Da aber alle übrigen Untereinheiten ebenfalls in enger räumlicher Nähe zueinander liegen und in der nativen Form als Oligomer assoziiert sind, in den Dimeren aber nur in weit geringerem Maß detektiert werden konnten, bleibt der tatsächliche Grund für die Präferenz der Tyrosinase gegenüber den zentral lokalisierten Untereinheiten b und c weiter unklar.

Eine Beantwortung dieser Frage erfordert intensive weiterführende Studien an isolierten Untereinheiten, wobei sowohl deren Oberflächenbeschaffenheit, als auch die Kinetik der Vernetzungsreaktion berücksichtigt werden sollte.

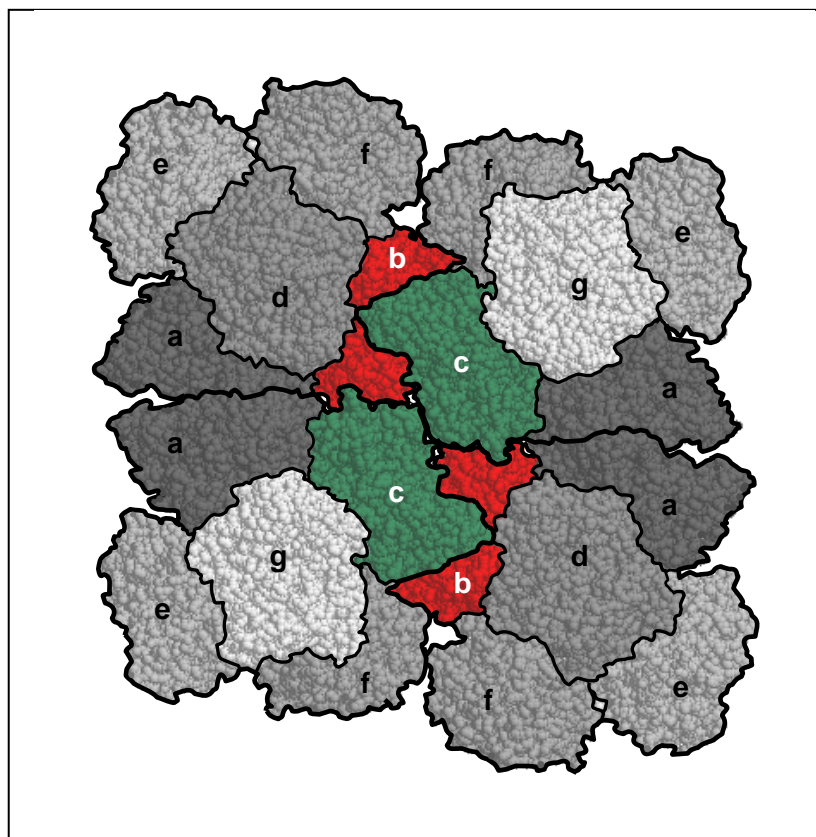


Abb. 4.7: 24-meres Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* in der oxy-Form. Das Oligomer setzt sich aus vier Hexameren zusammen, die wiederum aus den Untereinheiten a, b und d-g bzw. a, c und d-g gebildet werden. Die Untereinheiten b und c, die mittels geeigneter Effektoren zur Phenoloxidase aktiviert werden können, sind rot bzw. grün eingefärbt. Die Verschiebung der beiden 2 x 6-mere entlang der senkrechten Achse wird durch die Oxygenierung hervorgerufen und ist auf die hoch kooperative Bindung des Sauerstoffs an die 24 einzelnen Kupferzentren zurückzuführen.

4.6.2 Die Aktivierung von Hämocyanin zur Polyphenoloxidase

Die Aktivierung von Hämocyanin zur Phenoloxidase kann *in vitro* leicht durch die Zugabe anionischer Detergenzien, wie SDS erfolgen und wird vermutlich durch eine Konformationsänderung des Proteins hervorgerufen [25, 26]. Die resultierende Enzymaktivität der Untereinheiten b und c im *Eurypelma*-Hämocyanin ist unabhängig von der Quartärstruktur, zu einer Dissoziation oder Denaturierung des nativen 24-mers kommt es in Gegenwart von SDS nicht [24, 25]. Stattdessen wird offenbar die N-terminale Domäne soweit vom aktiven Zentrum wegbewegt, dass Substratmoleküle ungehindert an den Cu_2O_2 -Komplex gelangen können [24-26, 43, 44].

Ein vergleichbares Resultat konnte bei der Aktivierung durch limitierte Proteolyse mit Trypsin und Chymotrypsin erreicht werden, bei der ein N-terminales Fragment mit einer Länge von 70-120 Aminosäuren abgespalten wurde [24]. Innerhalb dieses N-terminalen Bereichs befindet sich, wie auch beim Hämocyanin aus *L. polyphemus* an Position 49 ein Phenylalanin, dem bereits eine Platzhalterfunktion für phenolisches Substrat im Bereich des aktiven Zentrums zugeordnet wurde (Abb. 4.3).

Der Mechanismus der SDS-vermittelten Aktivierung von Hämocyanin ist bislang noch nicht im Detail aufgeklärt worden, jedoch konnte gezeigt werden, dass eine katalytische Aktivität erst im Bereich der Kritischen Micellaren Konzentration (CMC) von SDS nachweisbar ist, also oberhalb der Konzentration, bei der SDS beginnt Micellen zu bilden [258]. Daher wird derzeit eine Wechselwirkung dieser Micellen mit dem Protein angenommen, durch die eine Konformationsänderung verursacht wird. Hierbei wird vermutlich durch eine Verdrehung der N-terminalen Domäne das Phe-49 aus dem Bereich des aktiven Zentrums entfernt und externen Substraten der Zugang ermöglicht.

Ein alternativer Mechanismus wurde in Zusammenhang mit der Aktivierung einer latenten Polyphenoloxidase aus der Helmbohne *Dolichos lablab* vorgeschlagen [259]. Hierbei dringen frei SDS-Moleküle in die äußeren Bereiche der Proteinmatrix, was zu einer partiellen Auffaltung führt und den Zugang für Substratmoleküle in das intakte, aktive Zentrum ermöglicht. Die dadurch zwangsläufig hervorgerufene Größenzunahme des Proteins konnte aber im Falle des Hämocyanins nicht beobachtet werden [258]. Jedoch führen bei vielen latenten Polyphenoloxidasen aus Pflanzen schon submicellare Konzentrationen von SDS zu einer Aktivierung, was in der Vergangenheit mit einer Konformationsänderung durch Teil-Denaturierung erklärt wurde [27, 28,

154, 155, 260]. Möglicherweise tritt die denaturierende Wirkung freier SDS-Moleküle hier als zusätzlicher Effekt auf, wohingegen für das *Eurypelma*-Hämocyanin eine sehr hohe Stabilität gegenüber dem Detergenz belegt ist [258].

Die biologische Relevanz der SDS-vermittelten Aktivierung ist nicht unumstritten, ein denkbare physiologisches Äquivalent stellen Fettsäuren und Lipide dar, die tatsächliche wirksame Verbindung ist aber bislang unbekannt. Bekannte Effektoren für die Konversion von Hämocyanin zur Phenoloxidase *in vivo* sind bakterielle und pilzliche Zellwandbestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS) und Glucan [126, 261]. Für die resultierende Phenoloxidase-Aktivität wird eine Beteiligung an unspezifischen Abwehrreaktionen im Rahmen der primären Immunantwort diskutiert [11, 12, 124, 158, 227]. Diese beinhalten Melaninbildung, Zelladhäsion und die Encystierung eindringender Keime. Zudem werden bei der Aktivierung häufig auch Peptidfragmente vom C-Terminus des Hämocyanins abgespalten, die als antimikrobielle Peptide in der Hämolymphe wirksam sind [156, 261].

4.6.3 Die Rolle des Hämocyanins bei der Quervernetzung von Proteinen während der Häutung und Wundheilung bei Arthropoden

Die Umwandlung des O₂-Transportproteins Hämocyanin in eine aktive Phenoloxidase ermöglicht nicht nur eine Beteiligung an der primären Immunantwort, sondern spielt vermutlich auch bei der Quervernetzung von Proteinen im Rahmen der Wundheilung und Sklerotisierung des Exoskeletts eine wesentliche Rolle [85, 157, 226].

Mit den in den Kapiteln 3.5.3 bis 3.5.5 dargestellten Experimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass 24-meres Hämocyanin nach SDS-vermittelter Aktivierung in der Lage ist, andere Hämocyanin-Moleküle *in vitro* miteinander quervernetzen. Zum anderen konnte durch Extraktion der Proteine aus der Kutikula von *E. californicum* das Vorhandensein von Hämocyanin in der chitinösen Matrix nachgewiesen werden. Hierbei wurden neben einzelnen Untereinheiten auch kleinere Hämocyanin-Fragmente im Bereich von 40 - 45 kDa immunochemisch detektiert. Der Nachweis von Hämocyanin-Untereinheiten und Hämocyanin-Fragmenten mit einer Größe von 14 - 20 kDa in der Kutikula des gleichen Organismus wurde auf ähnliche Weise bereits in einer früheren Arbeit durchgeführt, Signale von höhermolekularen Aggregaten, die einen Hinweis auf die Quervernetzung des Hämocyanins liefern, wurden dort jedoch nicht beschrieben [230].

Die *in vitro*-Quervernetzung von Hämocyanin nach der Aktivierung erbrachte ähnliche Resultate, wie die Quervernetzung durch Tyrosinasen (Abb. 3.59, 3.60a und b). Zudem wurde gezeigt, dass die Inkubation einer Hämocyanin-Lösung mit dem Aktivator SDS zu nahezu dem gleichen Ergebnis führt, wie die Zugabe von vorher separat aktiviertem Hämocyanin. Die massenspektrometrische Analyse der so erzeugten Di-, Tri- und Tetramere ergab, dass in diesen Fraktionen alle sieben Untereinheiten des Hämocyanins mit etwa gleich großen Anteilen vorlagen. Das Reaktionsverhalten des aktivierten 24-meren Hämocyanins unterscheidet sich somit offensichtlich in bestimmten Punkten von dem der Tyrosinase, was möglicherweise mit der Zugänglichkeit von potentiellen Angriffspunkten auf der Proteinoberfläche zusammen hängt.

Die Fähigkeit zu einer quasi selbstvermittelten Chinongerbung und der Nachweis möglicher Vernetzungsprodukte im Integument, legen die Vermutung nahe, dass Hämocyanin bei Sklerotisierungsprozessen nach Verwundungen oder der Häutung beteiligt sein könnte [153, 157]. Die enzymatische Aktivität bei der Quervernetzung während der Sklerotisierung wird zwar in erster Linie Phenoloxidasen und Laccasen zugeschrieben [262, 263], jedoch kann eine zusätzliche Beteiligung von Hämocyanin nicht ausgeschlossen werden. Für den Mechanismus der Aktivierung wurde in diesem Zusammenhang eine proteolytische Prozessierung des Hämocyanins vorgeschlagen, über den Transport von Hämocyanin aus der Hämolymphe in die Kutikula liegen bisher allerdings keine Erkenntnisse vor.

Eine weitere Funktion des Hämocyanins innerhalb der Kutikula könnte in der Freisetzung antimikrobieller Peptide liegen, die einen zusätzlichen Schutz vor eindringenden Mikroorganismen darstellen und so die Rolle der Kutikula als physikalische Barriere um einen immunologischen Aspekt erweitern [157].

Für die Aufklärung der oben geschilderten Sachverhalte und ein Verständnis der Rolle des Hämocyanins während der Sklerotisierung und Pathogenabwehr werden zukünftig eine Reihe weiterer Untersuchungen notwendig sein. Anhand der in der vorliegenden Arbeit geschilderten Ergebnisse kann aber gefolgert werden, dass Hämocyanin in der Kutikula von *E. californicum* vorhanden ist und theoretisch in der Lage ist, sich hierfür durch selbstvermittelte Chinongerbung, ohne die Beteiligung weiterer Enzyme in die Chitin fibrillen einzubetten.

5. Zusammenfassung

Tyrosinasen (E.C. 1.14.18.1) sind nahezu ubiquitär verbreitete kupferhaltige Enzyme und sind essentiell für die Pigmentierung durch Melanin. Bei Pflanzen und vielen Invertebraten sind sie auch ein wichtiger Bestandteil der Wundheilung und der primären Immunantwort. Tyrosinasen besitzen ein Typ-3-Kupferzentrum, an dem die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen und deren Oxidation zu den korrespondierenden *o*-Dichinonen katalysiert wird. Die reaktionsfähigen Chinone polymerisieren dann in vorwiegend nicht-enzymatischen Schritten weiter zu makromolekularem Melanin. Der komplizierte chemische Mechanismus der *o*-Hydroxylierung von Monophenolen am aktiven Zentrum der Tyrosinase ist bisher allerdings nicht endgültig aufgeklärt.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht für weiterführende Studien der Monophenolase-Reaktion von Tyrosinasen ein etabliertes System zur Verfügung, um das Zielprotein aus dem Bakterium *Streptomyces antibioticus* in großen Mengen und mit hoher Reinheit zu isolieren. Mit der Möglichkeit zur rekombinanten Überexpression könnten neben spektroskopischen und kristallographischen Methoden dabei auch molekularbiologische Techniken, wie beispielsweise ortsgerichtete Mutagenese zum Einsatz kommen. Die hierfür in Frage kommenden Positionen konnten anhand eines rechnerisch erstellten Modells der *S. antibioticus*-Tyrosinase identifiziert und durch die später publizierte Kristallstruktur der homologen *S. castaneoglobisporus*-Tyrosinase bestätigt werden. Diese beiden 3D-Strukturen erlaubten durch einen Vergleich mit den Kristallstrukturen anderer bekannter Typ-3-Kupferproteine (Catecholoxidase und Hämocyanin) die Formulierung eines hypothetischen Reaktionsmechanismus für die Monophenolase- und die Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase.

Die beiden Reaktionen der *S. antibioticus*-Tyrosinase wurden zudem kinetisch analysiert und auf diesem Weg die Aktivität des Enzyms mit jener der sehr gut charakterisierten Tyrosinase aus dem Pilz *Agaricus bisporus* verglichen. Hierbei wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifität und Inhibierbarkeit beider Tyrosinasen festgestellt, die auf deren verschiedenartige Proteinstruktur zurückgeführt wurden. Auch konnte gezeigt werden, dass einige sekundäre Pflanzenstoffe, die vor allem in Wein zu finden sind und in ihrer chemischen Struktur den Tyrosinasesubstraten ähnlich sind, die Aktivität dieses Enzyms maßgeblich beeinflussen.

Mit den Tyrosinasen aus *S. antibioticus* und *A. bisporus* wurde auch deren Fähigkeit zum enzymatischen Quervernetzen von Proteinen untersucht. Wie schon bei der kinetischen Betrachtung des Substratumsatzes konnten dabei deutliche Unterschiede im Reaktionsverhalten der beiden Enzyme festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das O₂-Transportprotein Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (das auch zu der Familie der Typ-3-Kupferproteine gehört) nach dessen chemischer Aktivierung zur Phenoloxidase, ebenfalls zur enzymatischen Quervernetzung von Proteinen befähigt ist. Die Tatsache, dass diese Quervernetzung das Hämocyanin selbst betrifft, sowie der erfolgreiche Nachweis von Hämocyanin in der Kutikula des genannten Organismus, legen die Vermutung nahe, dass die physiologische Funktion von Hämocyanin im Rahmen der Sklerotisierung des Exoskeletts in einer aktiven und passiven Beteiligung an Gerbungsprozessen im Integument besteht.

6. Literatur

- [1] Mason HS (1956): Structures and functions of phenolase complex. *Nature* **177**, 79-81
- [2] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996): Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* **96**, 2563-2606
- [3] van Gelder CW, Flurkey WH, Wichers HJ (1997): Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323
- [4] Solomon EI, Baldwin MJ, Lowery MD (1992): Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem Rev* **92**, 521-542
- [5] Mason HS, Fowlks WL, Peterson E (1955): Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc* **77**, 2914-2915
- [6] Decker H, Schweikardt T, Tuczec F (2006): The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew Chem Int ed* **45**, 4546-4550
- [7] Eicken C, Gerdemann C, Krebs B (2001) In: Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (eds) *Handbook of Metalloproteins*. Wiley, Chichester, pp 1319-1329
- [8] Siegbahn PEM (2004): The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem* **9**, 577-590
- [9] Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E (2002): Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzym Inhib Med Chem* **17**, 207-218
- [10] Marusek CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK (2006): Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J Inorg Biochem* **100**, 108-123
- [11] Sugumaran M (2002): Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res* **15**, 2-9
- [12] Adachi K, Wakamatsu K, Ito S, Miyamoto N, Kokubo T, Nishioka T, Hirata T (2005): An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Res* **19**, 214-219
- [13] Claus H (2003): Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* **179**, 145-150
- [14] Dean JFD, Eriksson KEL (1994): Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* **48**, 21-33

- [15] van Holde KE, Miller KI (1995): Hemocyanins. *Adv Protein Chem* **47**, 1-81
- [16] van Holde KE, Miller KI, Decker H (2001): Hemocyanins and invertebrate evolution. *J Biol Chem* **276**, 15563-15566
- [17] Beltramini M, Salvato B, Santamaria M, Lerch K (1990): The reaction of CN⁻ with the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active site. *Biochim Biophys Acta* **1040**, 365-372
- [18] Decker H (2006) In: King RB (ed) *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol 2. Wiley, New York, pp 1159-1173
- [19] Sohngen SM, Stahlmann A, Harris JR, Muller SA, Engel A, Markl J (1997): Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Eur J Biochem* **248**, 602-614
- [20] Harris JR, Markl J (2000): Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of a potent marine immunoactivator. A review. *Eur Urol* **37**, 24-33
- [21] Zlateva T, Di Muro P, Salvato B, Beltramini M (1996): The *o*-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett* **384**, 251-254
- [22] Salvato B, Santamaria M, Beltramini M, Alzuet G, Casella L (1998): The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: *o*-diphenoloxidase activity. *Biochemistry* **37**, 14065-14077
- [23] Siddiqui NI, Akosung RF, Gielens C (2006): Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochem Biophys Res Comm* **348**, 1138-1144
- [24] Decker H, Rimke T (1998): Tarantula hemocyanin shows Phenoloxidase activity. *J Biol Chem* **273**, 25889-25892
- [25] Decker H, Ryan M, Jaenicke E, Terwilliger N (2001): SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J Biol Chem* **276**, 17796-17799
- [26] Jaenicke E, Decker H (2004): Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron* **35**, 89-90
- [27] Moore B, Flurky W (1990): Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J Biol Chem* **265**, 4982-4988
- [28] Espin J, Wichers H (1999): Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J Agric Food Chem* **47**, 3518-3525

- [29] Gaykema WPJ, Hol WG, Vereijken JM, Soeter NM, Bak HJ, Beintema JJ (1984): 3,2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Nature* **309**, 23-29
- [30] Volbeda A, Hol WG (1989): Crystal structure of hexameric hemocyanin from *Panulirus interruptus* at 3,2 Å resolution. *J Mol Biol* **209**, 249-279
- [31] Hazes B, Magnus KA, Bonaventura C, Bonaventura J, Deuter Z, Kalk KH, Hol WG (1993): Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin in 2,18 Å resolution: clues for a mechanism of allosteric regulation. *Protein Sci* **2**, 597-619
- [32] Magnus KA, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol WG (1994): Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins Struct Funct Genet* **19**, 302-309
- [33] Cuff ME, Miller KI, van Holde KE, Hendrickson WA (1998): Crystal structure of a functional unit from octopus hemocyanin. *J Mol Biol* **278**, 855-870
- [34] Perbrandt M, Guthöhrlein EW, Rypniewski W, Idakieva K, Stoeva S, Voelter W, Genov N, Betzel C (2003): The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* **42**, 6341-6346
- [35] Klabunde T, Eicken C, Sacchettini JC, Krebs B (1998): Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol* **5**, 1084-1090
- [36] Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M (2006): Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem* **281**, 8981-8990
- [37] Kohashi PY, Kumagai T, Matoba Y, Yamamoto A, Maruyama M, Sugiyama M (2004): An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Protein Expr Purif* **34**, 202-207
- [38] Himmelwright RS, Eickmann NC, LuBien CD, Solomon EI, Lerch K (1980): Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J Am Chem Soc* **102**, 7339-7344
- [39] Kitajima N, Fujisawa K, Moro-oka Y (1989): $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-Peroxo}$ binuclear copper complex $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$. *J Am Chem Soc* **111**, 8975-8976
- [40] Kitajima N, Moro-oka Y (1994): Copper-dioxygen complexes. Inorganic and bioinorganic perspectives. *Chem Rev* **94**, 737-757

- [41] Rompel A, Fischer H, Meiwes D, Büldt-Karentzopoulos, Dillinger R, Tuczec F, Witzel H, Krebs B (1999): Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J Biol Inorg Chem* **4**, 56-63
- [42] Gerdemann C, Eicken C, Galla HJ, Krebs B (2002): Comparative modelling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *J Inorg Biochem* **89**, 155-158
- [43] Decker H, Dillinger R, Tuczec F (2000): How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology. *Angew Chem Int ed* **39**, 1591-1595
- [44] Decker H, Tuczec F (2000): Tyrosinase / catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *TIBS* **25**, 392-397
- [45] Jaenicke E, Decker H (2004): Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *ChemBioChem* **5**, 163-169
- [46] Vanneste WH, Zuberbühler A (1974) In: Nayaishi O (ed) *Molecular mechanism of oxygen activation*. Academic Press, New York, pp 371-402
- [47] Wilcox DE, Porras AG, Hwang YT, Lerch K, Winkler ME, Solomon EI (1985): Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J Am Chem Soc* **107**, 4015-4027
- [48] Cabanes J, Garcia-Canovas F, Lozano JA, Garcia-Carmona F (1987): A kinetic study of melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim Biophys Acta* **923**, 187-195
- [49] Naish-Byfield S, Riley PA (1992): Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem J* **288**, 63-67
- [50] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F (1995): Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1247**, 1-11
- [51] Tepper AW, Bubacco L, Canters GW (2005): Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue *p*-nitrophenol studied by NMR. *J Am Chem Soc* **127**, 567-575
- [52] van Gastel M, Bubacco L, Groenen EJJ, Vijgenboom E, Canters GW (2000): EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Lett* **474**, 228-232
- [53] Tepper AW, Bubacco L, Canters GW (2002): Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *J Biol Chem* **277**, 30436-30444

- [54] Bubacco L, van Gastel M, Groenen EJJ, Vijgenboom E, Canters GW (2003): Spectroscopic characterization of the electronic changes in the active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase upon binding of transition state analogue inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 7381-7389
- [55] Solomon EI, Lowery MD (1993): Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* **259**, 1575-1581
- [56] Metz M, Solomon EI (2001): Dioxygen binding to deoxyhemocyanin: electronic structure and mechanism of the spin-forbidden two-electron reduction of O₂. *J Am Chem Soc* **123**, 4938-4950
- [57] Mirica LM, Rudd DJ, Vance MA, Solomon EI, Hodgson KO, Hedman B, Stack TDP (2006): μ - η^2 : η^2 -Peroxodicopper(II) complex with a secondary diamine ligand: a functional model for tyrosinase. *J Am Chem Soc* **128**, 2654-2665
- [58] Battaini G, Monzani E, Perotti A, Para C, Casella L, Santagostini L, Gullotti M, Dillinger R, Nather C, Tuczek F (2003): A double arene hydroxylation mediated by dicopper(II)-hydroperoxide species. *J Am Chem Soc* **125**, 4185-4198
- [59] Mason HS, Spencer E, Yamazaki I (1961): Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase-catalyzed catechol oxidation. *Biochim Biophys Res Commun* **4**, 236-238
- [60] Korytowski W, Sarna T, Kalyanaraman B, Sealy RC (1987): Tyrosinase-catalyzed oxidation of dopa and related catechol(amine)s: a kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilization and spin label oximetry. *Biochim Biophys Acta* **924**, 383-392
- [61] Lerner A, Fitzpatrick TB, Calkins E & Summerson WH (1949) Mammalian tyrosinase: Preparation and properties. *J Biol Chem* **178**, 185-195
- [62] Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, Riley PA, Smit NPM (1997): Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J Biol Chem* **272**, 26226-26235
- [63] Jolley RL, Evans LH, Makino N, Mason HS (1974): Oxytyrosinase. *J Biol Chem* **249**, 335-345
- [64] Tepper AW (2005): Structure and mechanism of the type-3 copper protein tyrosinase. Dissertation. Universität Leiden (Niederlande)
- [65] Valero E, Varon R, Garcia-Carmona F (1988): Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *J Food Sci* **53**, 1482-1485

- [66] Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F, Lozano JA (1981): Hysteresis on mushroom tyrosinase: lag period of cresolase activity. *Phytochemistry* **20**, 1215-1217
- [67] Duckworth HW, Coleman JE (1970): Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem* **245**, 1613-1625
- [68] Ros JR, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Carnovas F (1993): Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem J* **295**, 309-312
- [69] Ros JR, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Carnovas F (1993): Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim Biophys Acta* **1163**, 303-308
- [70] Hernandez-Romero D, Sanchez-Amat A, Solano F (2006): A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase / dopa oxidase ratio. Role of the seventh histidine and accessibility to the active site. *FEBS J* **273**, 257-270
- [71] Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ (1995): Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to phaeomelanogenesis. *J Cell Sci* **108**, 2301-2309
- [72] Seo SY, Sharma VK, Sharma N (2003): Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J Agric Food Chem* **51**, 2837-2853
- [73] Raper HS (1928): The aerobic oxidases. *Physiol Rev* **8**, 245-282
- [74] Mason HS (1948): The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J Biol Chem* **172**, 83-99
- [75] Graham DG, Jeffs PW (1977): The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J Biol Chem* **252**, 5729-5734
- [76] Land EJ, Ito S, Wakamatsu K, Riley PA (2003): Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. *Pigment Cell Res* **16**, 487-493
- [77] Garcia-Canova F, Garcia-Carmona F, Sanchez JV, Iborra JL, Lozano JA (1982): The role of the pH in the melanin biosynthesis pathway. *J Biol Chem* **257**, 8738-8744
- [78] Rodriguez-Lopez JN, Banon-Arno M, Martinez-Ortiz F, Tudela J, Acosta M, Varon R, Garcia-Canovas F (1992): Catalytic oxidation of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine by tyrosinase: identification and evolution of intermediates. *Biochim Biophys Acta* **1160**, 221-228
- [79] Aroca P, Garcia-Borron JC, Solano F, Lozano JA (1990): Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim Biophys Acta* **1035**, 266-275

- [80] Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ (1992): A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPACHrome tautomerase. *EMBO J* **11**, 519-522
- [81] Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Uraben K, Hearing VJ, Lozano JA, Garcia-Borrón JC (1994): A New Enzymatic Function in the Melanogenic Pathway The 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). *J Biol Chem* **269**, 17993-18001
- [82] Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borrón JC, Hearing VJ (1994): Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* **13**, 5818-5825
- [83] Sugumaran M (1991): Molecular mechanisms of mammalian melanogenesis: comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett* **293**, 4-10
- [84] Sugumaran M, Semensi V (1991): Quinone methide as a new intermediate in eumelanin biosynthesis. *J Biol Chem* **266**, 6073-6078
- [85] Sugumaran M (1998): Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv Insect Physiol* **27**, 229-334
- [86] Ozeki H, Ito S, Wakamatsu K, Ishiguro I (1997): Chemical characterization of phaeomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. *Biochim Biophys Acta* **1336**, 539-548
- [87] Land EJ, Riley PA (2000): Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and phaeomelanin pathways. *Pigment Cell Res* **13**, 273-277
- [88] Jara JR, Aroca P, Solano F, Martínez JH, Lozano JA (1988): The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine and glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. *Biochim Biophys Acta* **967**, 296-303
- [89] Ito S (2003): The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res* **16**, 230-236
- [90] Protá G (2000): Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res* **13**, 283-293
- [91] Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA (1983): Cloning and expression of tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* **129**, 2703-2714

- [92] Claus H, Decker H (2006): Bacterial tyrosinases. *Syst Appl Microbiol* **29**, 3-14
- [93] Kutzner HJ (1968): Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyces. *Landwirtsch Forsch* **21**, 48-61
- [94] Küster E (1976): Chromogenicity of Actinomycetes. In: Arai T (ed) *Actinomycetes - the boundary microorganisms*. Toppan Comp, Ltd, Tokyo-Singapore, pp 43-54
- [95] Claus H, Kutzner HJ (1985): Untersuchungen über die Tyrosinase von Streptomyces. *Landwirtsch Forsch* **38**, 8-54
- [96] Nambudiri AMD, Bhat JV (1972): Conversion of *p*-cumarate into caffeate by *Streptomyces nigrifaciens*. *Biochem J* **130**, 425-433
- [97] Lerch K, Ettliger L (1972): Purification of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Europ J Biochem* **31**, 427-437
- [98] Bernan V, Filpula D, Herber W, Bibb M, Katz E (1985): The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene* **37**, 101-110
- [99] Philipp S, Held T, Kutzner HJ (1990): Purification and characterization of the tyrosinase from *Streptomyces michiganiensis* DSM 40015. *J Basic Microbiol* **31**, 293-300
- [100] Kawamoto S, Nakamura M, Yashima S (1993): Cloning, sequence and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces lavendulae* MA406 A-1. *J Ferm Bioeng* **76**, 345-355
- [101] Lee YH, Chen BF, Wu SY, Leu WM, Lin JJ, Chen CW, LO SC (1988): A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase in *Streptomyces*. *Gene* **65**, 71-81
- [102] Chen LY, Leu WM, Wang KT, Lee YH (1992): Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its *trans*-activator MelC1. *J Biol Chem* **267**, 20100-20107
- [103] Pugsley AP (1993): The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **57**, 50-108
- [104] Fekkes P, Driessen AJM (1999): Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 161-173
- [105] Berks BC (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**, 393-404

- [106] Santini CL, Ize B, Chanal A, Muller M, Giordano G, Wu LF (1998): A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J* **17**, 101-112
- [107] Schaerlaekens K, Scherkova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J, van Mellaert L (2001): Twin-Arginin translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bact* **183**, 6727-6732
- [108] Schaerlaekens K, van Mellaert L, Lammertyn E, Geukens N, Anne J (2004): The importance of the Tat-dependent protein secretory pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in *tat* deletion mutants and genome analysis. *Microbiology* **150**, 21-31
- [109] Leu WM, Chen LY, Liaw LL, Lee YH (1992): Secretion of the *Streptomyces* tyrosinase is mediated through its trans-activator protein, MelC1. *J Biol Chem* **267**, 20106-20113
- [110] Tsai TY, Lee YH (1998): Roles of copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces* tyrosinase. *J Biol Chem* **273**, 19243-19250
- [111] Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G, Okon Y (2002): Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 119-125
- [112] Sanchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, Garcia-Borron JC, Solano F (2001): Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* **1547**, 104-116
- [113] Ruan L, Huang Y, Zhang G, Yu D, Ping S (2002): Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol* **34**, 244-248
- [114] Ruan R, Yu Z, Fang B, He W, Wang Y, Shen P (2004): Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst Appl Microbiol* **27**, 286-289
- [115] Kuznetsov VD, Filippova SN, Rybakova AM (1984): Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. *Mikrobiologija* **53**, 251-256
- [116] Bell AA, Wheeler MH (1986): Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev Phytopathol* **24**, 411-451
- [117] Butler MJ, Day AW (1998): Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* **44**, 1115-1136
- [118] Nosanchuk JD, Casadevall A (2003): The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* **5**, 203-223

- [119] Halaouli S, Asther M, Sigoillot JC, Hamdi M, Lomascolo A (2006): Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J Appl Microbiol* **100**, 219-232
- [120] Vaughn KC, Lax AR, Duke SO (1988): Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol Plant* **72**, 659-665
- [121] Mayer AM, Harel E (1979): Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **18**, 193-215
- [122] Cohn J, Sessa G, Martin GB (2001): Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**, 55-62
- [123] Lai-Fook J (1966): The repair of wounds in the integument of insects. *J Insect Physiol* **12**, 195-226
- [124] Ashida M, Brey PT (1995): Role of the integument in insect defense: prophenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10698-10702
- [125] Jiang H, Wang Y, Kanost MR (1998): Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manuca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12220-12225
- [126] Söderhäll K, Cerenius L (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-28
- [127] Peter MG (1993): Die molekulare Architektur des Exoskeletts von Insekten. *Chemie in unserer Zeit* **27**, 189-197
- [128] Anderson SO, Peter MG, Roepstorff P (1996): Cuticular sclerotization in insects. *Comp Biochem Physiol* **113**, 689-705
- [129] Sturm RA, Teasdale RD, Box NF (2001): Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* **277**, 49-62
- [130] Kushimoto T, Valencia JC, Costin GE, Toyofuku K, Watabe H, Yasumoto K, Rouzaud F, Vieira WD, Hearing VJ (2003): The melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res* **16**, 237-244
- [131] Priestly GC (1993): *Molecular aspects of dermatology*. Wiley, Chichester
- [132] Hurell RF, Finot PA, Cuq JL (1982): Protein-polyphenol reactions. 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Br J Nutr* **47**, 191-211
- [133] Thalman CR, Lötzbeyer T (2002): Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *Eur Food Res Technol* **214**, 276-281

- [134] Halaouli S, Asther M, Kruus K, Guo L, Hamdi M, Sigoillot JC, Asther M, Lomascolo A (2005): Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J Appl Microbiol* **98**, 332-343
- [135] Marko-Varga JG, Emneus J, Gorton L, Ruzgas T (1995): Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends Anal Chem* **14**, 319-328
- [136] Atlow ST, Bonadonna-Aparo L, Klibanov AM (1984): Dephenolization of industrial waste waters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol Bioeng* **26**, 599-603
- [137] Carvalho GMJ, Alves TLM, Freire DMG (2000): L-Dopa production by immobilized tyrosinase. *Appl Biochem Biotechnol* **84**, 791-800
- [138] Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ (1995): Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 8125-8129
- [139] Clarkson KS, Sturdge JC, Molyneux AJ (2001): The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB-45 and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol* **54**, 196-200
- [140] Boyle JL, Haupt HM, Stern JB, Mulhaupt HAB (2002): Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 816-822
- [141] Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y, Zigelman R, Gilbrud B, Yechezkel G, Youinou P, Fishman P (1996): Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin Exp Immunol* **105**, 84-88
- [142] Pierpoint WS (1971) In: *Rept Rothamsted Exp St for 1970, part 2*. Formation and behavior of o-quinones in some processes of agricultural importance. Harpenden, pp 199-218
- [143] Matheis G, Whitaker JR (1984): Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J Food Biochem* **8**, 137-162
- [144] Leatham GF, King V, Stahmann MA (1980): In vitro protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathol* **70**, 1134-140
- [145] Folk JE, Finlayson JS (1977): The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem* **31**, 2-133
- [146] Matheis G, Whitaker JR (1987): Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *J Food Biochem* **11**, 309-327

- [147] Faergemand M, Otte J, Qvist KB (1997): Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca²⁺-independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. *Food Hydrocoll* **11**, 19-25
- [148] Faergemand M, Otte J, Qvist KB (1998): Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *J Agric Food Chem* **46**, 1326-1333
- [149] Waite JH (1990): The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp Biochem Physiol B* **97** (1),19-29
- [150] Burzio LA, Waite JH (2000): Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides. *Biochemistry* **39**, 11147-11153
- [151] Tonegawa H, Kuboe Y, Amaike M, Nishida A, Ohkawa K, Yamamoto H (2003): Synthesis of enzymatically crosslinkable peptide-poly(L-lysine) conjugate and creation of bio-inspired hybrid fibers. *Macromol Biosci* **4**, 503-511
- [152] Andersen SO, Jacobsen JP, Bojesen G, Roepstorff P (1992): Phenoloxidase catalyzed coupling of catechols. Identification of novel coupling products. *Biochim Biophys Acta* **1118**, 134-138
- [153] Nagai T, Osaki T, Kawabata S (2001): Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **276**, 27166-27170
- [154] Robb D, Mapson L, Swain T (1964): Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature* **201**, 503-504
- [155] Swain T, Mapson L, Robb D (1966): Activation of *Vicia faba* (L.) Tyrosinase as affected by denaturing agents. *Phytochemistry* **5**, 469-482
- [156] Decker H, Jaenicke E (2004): Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev Comp Immunol* **28** (7-8), 673-687
- [157] Adachi K, Endo H, Watanabe T, Nishioka T, Hirata T (2005): Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Res* **18**, 136-143
- [158] Nagai T, Kawabata S (2000): A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem* **275**, 29264-29267
- [159] Katz E, Betancourt A (1988): Induction of tyrosinase by L-methionine in *Streptomyces antibioticus*. *Can J Microbiol* **34**, 1297-1303
- [160] Suter MA (1978): Isolierung und Charakterisierung von Melaninnegativen Mutanten aus *Streptomyces glaucescens*. Dissertation. ETH Zürich (Schweiz)

- [161] Claus H (1983): Untersuchungen über die Tyrosinasen bei Melaninbildenden Streptomyceten. Dissertation. TH Darmstadt
- [162] Krassilnikov NA (1965) In: *Biologiya Otdel'nykh Grupp Aktinomitsetov.* (Kras-silnikov NA, ed.), Moskava: Akad Nauk SSSR, pp 74-123
- [163] Pridham TG (1970): New names and new combinations in the order Actinomyce-tales Buchanan 1917. *Bull US Dep Agriculture* **1424**, 1-55
- [164] Thompson CJ, Ward, JM, Hopwood DA (1982): Physical analysis of antibi-otic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene* **20**, 51-62
- [165] Kieser T, Hopwood DA, Wright HM, Thompson CJ (1982): pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and devel-opment of DNA cloning vectors. *Mol Gen Genet* **185**, 223-238
- [166] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H (1985): Genetic manipulation of *Strep-tomyces* - a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK
- [167] Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of mi-crogram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- [168] Read S, Northcote D (1981): Minimization of variation in the response to dif-ferent proteins of the Coomassie blue G binding-assay for protein. *Anal Bio-chem* **116**, 53-64
- [169] Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interfer-ence in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369-374
- [170] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall AJ (1951): Protein measure-ment with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 267-275
- [171] Legler G, Muller-Platz CM, Mentges-Hettkamp M, Pflieger G, Julich E (1985): On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal Biochem* **150**, 278-287
- [172] Jackman MP, Hajnal A, Lerch K (1991): Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochem J* **274**, 707-713
- [173] See Y, Jackowski G (1989): Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Electrophoresis. In: *Protein Structure - A Practical Approach* (Creighton T, ed.), IRL Press, Oxford, pp 1-22
- [174] Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

- [175] Blum H, Beier H, Gross H (1987): Improved Silverstaining of plant proteins, RNA and DNA. *Electrophoresis* **8**, 93-99
- [176] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354
- [177] Khyse-Anderson J (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**, 203-209
- [178] Awdeh ZL, Williamson AR, Askonas BA (1968): Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature* **219**, 66-67
- [179] Wellner D, Hayes MB (1973): Isoelectric focusing in polyacrylamide gels *Ann NY Acad Sci* **209**, 34-43
- [180] Garfin DE (1990): Isoelectric focusing. In: *Methods in Enzymology* Vol. 182 (Deutscher MP, ed.), Academic Press Inc., pp 459-477
- [181] Egen NB, Thorman W, Twitty GE, Bier M (1984): A new preparative scale focusing apparatus. *Electrophoresis* **83**, 547
- [182] Pifferi P, Baldassari L (1973): A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorns Hydrazon. *Anal Biochem* **52**, 325-335
- [183] Winder AJ, Harris H (1991): New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur J Biochem* **198**, 317-326
- [184] Rodriguez-Lopez JN, Escribano J, Garcia-Canovas F (1993): A continuous spectrophotometric method for the determination of Monophenolase activity of tyrosinase using 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal Biochem* **216**, 205-212
- [185] Jaenicke E (2002): Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen. Dissertation. Universität Mainz
- [186] Clark J (1992): Electrochemical assays: the oxygen electrode. In: *Enzyme Assays - A Practical Approach* (Eisenthal R and Dansen M, eds.), IRL Press, Oxford, pp 181-190
- [187] Rodriguez-Lopez JN, Ros-Martinez JR, Varon R, Garcia-Canovas F (1992): Calibration of a Clark-type oxygen electrode by tyrosinase-catalyzed oxidation of 4-*tert*-butylcatechol. *Anal Biochem* **202**, 356-360
- [188] Sali A (1995): Modelling mutations and homologues proteins. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 437-451

- [189] Chothia C, Lesk AM (1986) The relation between divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* **5**, 823-826
- [190] Sali A, Blundell TL (1993): Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**, 779-815
- [191] Bubacco L, Vijgenboom E, Gobin C, Tepper AWJW, Salgado J, Canters GW (2000): Kinetic and paramagnetic NMR investigations of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *J Mol Catal* **8**, 27-35
- [192] Canovas FG, Tudela J, Madrid CM, Varon R, Carmona FG, Lozano JA (1987): Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochim Biophys Acta* **912**, 417-423
- [193] Burzio LA, Waite JH (2001): Reactivity of peptidyl-tyrosine to hydroxylation and cross-linking. *Prot Sci* **10**, 735-740
- [194] Vriend G, Sander C (1991): Detection of common three-dimensional substructures in proteins. *Proteins* **11**, 52-58
- [195] Siegbahn PE (2003): A comparison of the thermodynamics of O[bond]O cleavage for dicopper complexes in enzymes and synthetic systems. *J Biol Inorg Chem* **8**, 577-585
- [196] Decker H, Schweikardt T, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tuzcek F (2007): Similar activation process and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene (submitted)*
- [197] Jackman MP, Huber M, Hajnal A, Lerch K (1992): Stabilization of the oxy form of tyrosinase by a single conservative amino acid substitution. *Biochem J* **282**, 915-918
- [198] Strothkamp KG, Jolley RL, Mason HS (1976): The quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Comm* **70**, 519-524
- [199] Wichers HJ, Gerritsen YAM, Chapelon CGJ (1996): Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* **43**, 333-337
- [200] Sugumaran M (2000): Oxidation chemistry of 1,2-dehydro-N-acetyldopamines: direct evidence for the formation of 1,2-dehydro-N-acetyldopamine quinone. *Arch Biochem Biophys* **378**, 404-410
- [201] Munoz JL, Garcia-Molina F, Varon R, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Tudela J (2006): Calculating molar absorptivities for quinones: application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal Biochem* **351**, 128-138
- [202] Michaelis L, Menten ML (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **49**, 333-369

- [203] Briggs GE, Haldane JBS (1925): A note on the kinematics of enzyme action. *Biochem J* **19**, 338-339
- [204] Espin JC, Varon R, Fenoll LG, Gilabert MA, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, Garcia-Canovas F (2000): Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur J Biochem* **267**, 1270-1279
- [205] Rodriguez-Lopez JN, Ros JR, Varon R, Garcia-Canovas F (1993): Oxygen Michaelis constant for tyrosinase. *Biochem J* **293**, 859-866
- [206] Haldane JBS (1930): *Enzymes*, p 84, Longmans, Green, New York
- [207] Rodriguez-Lopez JN, Fenoll LG, Garcia-Ruiz PA, Varon R, Tudela J, Thornley RNF, Garcia-Canovas F (2000): Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry* **39**, 10497-10506
- [208] Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Varon R, Garcia-Ruiz PA, Garcia-Canovas F, Tudela J (2002): Kinetic characterization of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-tyrosine methylester/L-dopa methylester. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1594-1607
- [209] Brack A, Hellmann N (2007): Enzymatic properties of tyrosinase from the crustacean *Palinurus elephas*. *To be submitted*
- [210] Renz J (1936): Ueber das Mimosin. *Z Physiol Chem* **244**, 153-158
- [211] Mostad A, Romming C, Rosenqvist E (1973): The structure of L-mimosine, an L-DOPA analogue. *Acta Chem Scand* **27**, 164-176
- [212] Hashiguchi H, Takahashi H (1977): Inhibition of two copper-containing enzymes, tyrosinase and dopamine- β -hydroxylase, by L-mimosine. *Mol Pharmacol* **13**, 362-367
- [213] Segel IH (1935): *Enzyme kinetics*, pp 100-109, Wiley, New York.
- [214] Golicnik M, Stojan J (2004): Slow-binding inhibition. *Biochem Mol Biol Educ* **32**, 228-235
- [215] Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG (1995): A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *J Am Med Assoc* **274**, 1049-1057
- [216] Wu LL, Wu JT (2002): Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* **322**, 21-28
- [217] Reish O, Townsend DW, Berry SA, Tsai MT, King RA (1995): Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocysteinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* **57**, 127-132

- [218] Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993): Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454-457
- [219] Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C (1998): Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agric Food Chem* **46**, 361-367
- [220] Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A (1998): Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidative capacity in humans. *J Nutr* **128**, 1003-1007
- [221] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* **11**, 287-313
- [222] Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W, Virador VM (2001): Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase and growth of melanoma cells. *J Agric Food Chem* **49**, 1620-1624
- [223] Wu X, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT (1989): Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9412-9416
- [224] Pitts O, Priest D, Fish W (1974): Uricase: subunit composition and resistance to denaturants. *Biochemistry* **13**, 888-892
- [225] Tzioumaki N (2005): Wirkung von Weininhaltsstoffen auf Tyrosinasen. Diplomarbeit. Universität Mainz.
- [226] Sugumaran M, Hennigan B, O'Brian J (1987): Tyrosinase catalyzed protein polymerization as an in vitro model for sclerotization of insect cuticle. *Arch Insect Biochem Physiol* **6**, 9-25
- [227] Marmaras VJ, Charalambidis ND, Zervas CG (1996): Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch Insect Biochem Physiol* **31**, 119-33
- [228] Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B (1980): Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **361**, 649-660
- [229] Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T (2000): Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. *J Biol Chem* **275**, 39339-39344
- [230] Paul RJ, Bergner B, Pfeffer-Seidl A, Decker H, Efinger R, Storz H (1994): Gas transport in the hemolymph of arachnids. I: Oxygen transport and the physiological role of hemocyanin. *J Exp Biol* **188**, 25-46

- [231] Ikeda K, Masujima T, Sugiyama M (1996): Effects of methionine and Cu^{2+} on the expression of tyrosinase activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*. *J Biochem (Tokyo)* **120**, 1141-1145
- [232] Kocher HP (1976): Tyrosinase bei *Streptomyces glaucescens*. Regulation der Enzymsynthese. Ausscheidung des Enzyms. Dissertation. ETH Zürich
- [233] Huber M, Lerch K (1988): Identification of two histidines as copper ligands in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochem* **27**, 5610-5615
- [234] Solomon EI, Tuzcek F, Root DE, Brown CA (1994): Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes. *Chem Rev* **94**, 827-856
- [235] Ross PK, Solomon EI (1991): An electronic structural comparison of copper-peroxid complexes of relevance to hemocyanin and tyrosinase active sites. *J Am Chem Soc* **113**, 3246-3259
- [236] Solomon EI, Chen P, Metz M, Lee SK, Palmer AE (2001): Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew Chem Int ed* **40**, 4570-4590
- [237] Siegbahn PE (2003): The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem* **8**, 567-576
- [238] Eicken C, Krebs B, Sacchettini JC (1999): Catechol oxidase – structure and activity. *Curr Op Struct Biol* **9**, 677-683
- [239] Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL (1999): Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* **38**, 122-133
- [240] Pour Nikfardjam MS (2001): Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung. Dissertation. Universität Giessen.
- [241] Burns J, Gardner PT, Matthews D, Duthie GG, Lean MEJ, Crozier A (2001): Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J Agric Food Chem* **49**, 5797-5808
- [242] Dubernet M, Ribereau-Gayon P (1973): Presence and significance of grape tyrosinase in musts and wines. *Connaiss Vigne Vin (Talence)* **7**, 283-302
- [243] Singleton VL (1987): Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Am J Enol Vitic* **38**, 69-77
- [244] Schneider V (1998): Must hyperoxidation: a review. *Am J Enol Vitic* **49**, 65-73

- [245] Bernard P, Berthon JY (2000): Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. *Int J Cos Sci* **22**, 219-226
- [246] Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y (2002): Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. *J Biol Chem* **277**, 16340-16344
- [247] Jimenez M, Garcia-Carmona F (1999): Oxidation of the flavonol quercetin by polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* **47**, 56-60
- [248] Chen QX, Kubo I (2002): Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J Agric Food Chem* **50**, 4108-4112
- [249] Fenoll LG, Garcia-Ruiz PA, Varon R, Garcia-Canovas F (2003): Kinetic study of the oxidation of quercetin by mushroom tyrosinase. *J Agric Food Chem* **51**, 7781-7787
- [250] Kubo I, Nihei KI, Shimizu K (2004): Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorg Med Chem* **12**, 5343-5347
- [251] Shin HN, Ryu SY, Choi EJ (1998): Oxyresveratrol as a potent inhibitor on dopa oxydase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 801-803
- [252] Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z (2003): Glycosylation of resveratrol protects it from enzymatic oxidation. *Biochem J* **374**, 157-163
- [253] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Metha RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220
- [254] Yi W, Fischer J, Akoh CC (2005): Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J Agric Food Chem* **53**, 8804-8812
- [255] Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U (2002): Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxid synthase. *Circulation* **106**, 1652-1658
- [256] Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U (2003): Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxid synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* **41**, 471-478
- [257] Wallerath T, Li H, Godtel-Armbrust U, Schwarz PM, Förstermann U (2005): A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric oxide* **12**, 97-104

- [258] Meester C., persönliche Mitteilung
- [259] Kanade SR, Paul B, Rao AGA, Gowda LR (2006): The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochem J* **395**, 551-562
- [260] Robinson SP, Dry IB (1992): Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-Kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol* **99**, 317-323
- [261] Lee SY, Lee BL, Söderhäll K (2003): Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* **278**, 7927-7933
- [262] Andersen SO (1991): Sclerotisation. In: Binnington K, Retnakaran A (eds) *Physiology of the insect epidermis*. CSIRO, Australien, pp 123-140
- [263] Barrett FM (1991): Phenoloxidase and the integument. In: Binnington K, Retnakaran A (eds) *Physiology of the insect epidermis*. CSIRO, Australien, pp 195-212
- [264] Aboshanab K M, Schmidt-Beissner H, Wehmeier UF, Welzel K, Vente A, Piepersberg W (2005): Comparison of the gene clusters for the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics gentamicin (*Micromonospora echinospora* DSM 43036), fortimicin (*Micromonospora olivasterospora* DSM 43868), kanamycin (*Streptomyces kanamyceticus* DSM 40500) and istamycin (*Streptomyces tenjimariensis* ATCC 31603). Unveröffentlicht

7. Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Abb.	Abbildung
APMSF	<i>p</i> -Amidinophenylmethylsulfonylfourid
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
CM	Carboxymethyl
CMC	Kritische Micellare Konzentration
CO	Catecholoxidase
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure
Dopa	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MSMS	Elektrospray Ionisation - Medical Services Management Software
ESR	Elektronenspinresonanz
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)
Gl.	Gleichung
GSP	General secretory pathway
Hc	Hämocyanin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
k _{cat}	Wechselzahl
K _I	Inhibitions-Konstante
K _M	Michaelis-Konstante
LDL	Low density Lipoprotein

LPS	Lipopolysaccharid
λ	Wellenlänge
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
<i>mel</i>	Melanin-Gen
<i>melC1</i>	Strukturgen des Hilfsproteins
<i>melC2</i>	Strukturgen der Tyrosinase
MelC1	Hilfsproteins ORF378
MelC2	Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>
μ PLC	Micro Parallel Liquid Chromatography
n. b.	Nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Kernmagnetische Resonanz
<i>o</i> -	<i>ortho</i> -
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
<i>p</i> -	<i>para</i> -
p. a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PO	Phenoloxidase
PPO	Polyphenoloxidase
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
PTU	Phenylthiourea
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-Tof	Quadrupole Time of flight
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
SecB	Signalerkennungs-Protein
SecYEG	Sekretions-Apparat
SH2	Src-homology 2
<i>spec.</i>	Spezies
Src	Sarcoma (producing protein)
SRP	Signal recognition particle
Tab.	Tabelle
Tat	Twin-arginin translocation
TBS	Tris buffered saline

TBST	TBS Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonsäure
Topa	2,4,5-Trihydroxyphenylalanin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tyrosinase-related protein
<i>tsr</i>	Thiostrepton-Resistenz-Gen
TY	Tyrosinase
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vis	Visuell
v_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume

Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Arginin	Arg	R
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Reaktionen der Tyrosinase und der Catecholoxidase	2
Abb. 1.2:	Röntgenkristallstruktur der Tyrosinase aus <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	4
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Tyrosinase	8
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung der Melanin-Biosynthese	11
Abb. 1.5:	Prinzip des enzymatischen Quervernetzens von Proteinen durch Tyrosinasen	18
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der direkten Quervernetzungsprodukte der Tyrosinase	19
Abb. 2.1:	Pilotfermenter mit Rühraufsatz und Steuereinheit	32
Abb. 2.2:	Plasmid-Vektor pIJ702 mit dem <i>mel</i> -Gen aus <i>Streptomyces antibioticus</i>	34
Abb. 2.3:	Reaktionsschema des Dopachrom-Assays	55
Abb. 2.4:	Reaktionsschema des MBTH-Assays	57
Abb. 2.5a:	Schematische Darstellung der Messapparatur für O ₂ -Verbrauchsmessungen	58
Abb. 2.5b:	Aufbau der Messzelle mit Clark-Elektrode und Reaktionsgefäß	58
Abb. 3.1:	Nachweis der Melanin-Biosynthese bei <i>S. antibioticus</i> durch Wachstum auf tyrosin haltigem Medium	62
Abb. 3.2:	Wachstum von <i>S. antibioticus</i> in AGMIT-Medium bei 30 °C und 180 Upm	64
Abb. 3.3:	Denaturierende SDS-PAGE der Kulturüberstände von <i>S. antibioticus</i> nach 3 Ta- gen Wachstum in CDM- bzw. AGMIT-Medium	64
Abb. 3.4:	Wachstum von <i>S. antibioticus</i> in GM-Medium bei 30 °C und 180 Upm	65
Abb. 3.5:	Denaturierende SDS-PAGE der Proben des Überstandes einer in GM-Medium gewachsenen <i>S. antibioticus</i> -Kultur	68
Abb. 3.6:	Analytische IEF des aufkonzentrierten Kulturfiltrats nach Kultivierung von <i>S. anti- bioticus</i> in GM-Medium	70
Abb. 3.7:	Denaturierende SDS-PAGE der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i> nach Kationen- Austausch mittels Vivapur Maxi S Austauscher-Säule	73
Abb. 3.8:	Absorptionsspektrum des Eluats nach Kationen-Austausch mittels einer Austau- scher-Säule	73
Abb. 3.9:	Denaturierende SDS-PAGE der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i> nach Kationen- Austausch mittels Servacell P23 im <i>batch</i> -Verfahren	75
Abb. 3.10:	Absorptionsspektrum des Eluats nach Kationen-Austausch im <i>batch</i> -Verfahren ...	75
Abb. 3.11:	Denaturierende SDS-PAGE der Proben des Kulturfiltrates zu verschiedenen Zeit- punkten der Kultivierung und nach Ammoniumsulfat-Fällung	78
Abb. 3.12:	Absorptionsspektrum des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Kationen-Austausch mit Servacell P23	79
Abb. 3.13:	Denaturierende SDS-PAGE von Proben nach Kationen-Austausch im <i>batch</i> - Verfahren	81
Abb. 3.14:	Denaturierende SDS-PAGE des Ammoniumsulfat-Präzipitats vor und nach Anio- nen-Austausch mit Servacell DEAE52	83
Abb. 3.15:	Absorptionsspektrum des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen-Austausch mit Servacell DEAE52	83
Abb. 3.16:	Elutionsprofil einer SEC des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen- Austausch	84
Abb. 3.17:	Nachweis der Diphenolase-Aktivität in den eluierten Fraktionen der SEC	85
Abb. 3.18:	Diphenolase-Aktivität der eluierten Fraktionen 40 - 52	86
Abb. 3.19:	Denaturierende SDS-PAGE der SEC-Fraktionen 45, 46, 61, 64 und 80	87
Abb. 3.20:	Absorptionsspektrum der SEC-Fraktionen 46 und 80	87
Abb. 3.21:	Absorptionsspektrum der gereinigten Tyrosinase	88

Abb. 3.22:	Elutionsprofil einer SEC des Ammoniumsulfat-Präzipitats nach Anionen-Austausch	89
Abb. 3.23:	Absorptionsspektrum der SEC-Fraktion 32 und des Konzentrats der tyrosinasehaltigen SEC-Fraktionen 29 - 37	90
Abb. 3.24:	Wachstum von <i>S. lividans</i> nach Transformation, <i>S. antibioticus</i> , sowie nicht-transformierten <i>S. lividans</i>	93
Abb. 3.25:	Denaturierende SDS-PAGE der Zell-Lysate ohne und mit PMSF	94
Abb. 3.26:	SDS-PAGE und analytische IEF der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	96
Abb. 3.27:	Western Blot der Tyrosinase auf eine PDVF-Membran nach denaturierender Gelelektrophorese	96
Abb. 3.28:	Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Tyrosinase aus <i>S. antibioticus</i>	97
Abb. 3.29:	Sequenz-Alignment der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase und der <i>I. batatas</i> -Catecholoxidase	99
Abb. 3.30:	Manuell modifiziertes Sequenz-Alignment der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase und der <i>I. batatas</i> -Catecholoxidase	99
Abb. 3.31:	Stereoabbildung des Homologie-Modells der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase	100
Abb. 3.32a:	Homologie-Modell der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase und Röntgenstruktur der <i>I. batatas</i> -Catecholoxidase	101
Abb. 3.32b:	Homologie-Modell der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase und Röntgenstruktur der <i>S. castaneoglobisporus</i> -Tyrosinase	101
Abb. 3.33:	Struktur-Alignment des Homologie-Modells der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase mit der Vorlagestruktur der <i>I. batatas</i> -Catecholoxidase, sowie mit der Kristallstruktur der <i>S. castaneoglobisporus</i> -Tyrosinase	102
Abb. 3.34:	Überlagerung der aktiven Zentren der <i>I. batatas</i> -Catecholoxidase, der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase und der <i>S. castaneoglobisporus</i> -Tyrosinase	103
Abb. 3.35:	Blick in das aktive Zentrum der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> , <i>S. castaneoglobisporus</i> und der Catecholoxidase aus <i>I. batatas</i>	105
Abb. 3.36:	Modellstruktur der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase mit den für Mutagenese-Experimente vorgeschlagenen Aminosäuren	107
Abb. 3.37:	SDS-PAGE der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>A. bisporus</i> und native PAGE der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i>	109
Abb. 3.38:	Die verwendeten mono- und diphenolischen Substrate der Tyrosinase	110
Abb. 3.39:	Produktspektren der mono- und diphenolischen Substrate beim Umsatz durch die <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase	111
Abb. 3.40:	Differenzspektren der Produkte aus dem Umsatz der mono- und diphenolischen Substrate	112
Abb. 3.41:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der L-Dopa-Konzentration	116
Abb. 3.42:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Dopamin-Konzentration	118
Abb. 3.43:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Tyramin-Konzentration	120
Abb. 3.44:	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der L-Tyrosin-Methylester-Konzentration	122
Abb. 3.45:	Strukturformel von L-Mimosin	124
Abb. 3.46a:	Inhibition der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase durch L-Mimosin	125
Abb. 3.46b:	Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase für L-Mimosin aus der Einzel-Anpassung der Messreihen	125
Abb. 3.47a:	Inhibition der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase durch L-Mimosin	127
Abb. 3.47b:	Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase für L-Mimosin	127
Abb. 3.48:	Strukturformeln von L-Homocystein und L-Cystein	129
Abb. 3.49a:	Inhibition der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase durch DL-Homocystein	130

Abb. 3.49b:	Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase für DL-Homocystein	130
Abb. 3.50a:	Inhibition der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase durch DL-Homocystein	131
Abb. 3.50b:	Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase für DL-Homocystein	132
Abb. 3.51:	Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i> in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration, gemessen in alkoholfreiem und alkoholphaltigem Puffer, in Weißwein (Riesling), sowie in Rotwein (Spätburgunder)	135
Abb. 3.52:	Einfluss von Ethanol, Wein und extrahierten Weininhaltsstoffen auf die Diphenolase-Aktivität der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i>	137
Abb. 3.53:	Aktivität der Uricase aus <i>S. scrofa</i> in Abhängigkeit von der Harnsäure-Konzentration, gemessen in alkoholfreiem und alkoholphaltigem Puffer, sowie in Rotwein (Spätburgunder)	138
Abb. 3.54:	Einfluss von Ethanol, Wein und extrahierten Weininhaltsstoffen auf die Aktivität der Uricase aus <i>S. scrofa</i>	140
Abb. 3.55:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Hämocyanin und Tyrosinasen	142
Abb. 3.56:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Hämocyanin und <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase	144
Abb. 3.57:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Rinderserum-Albumin und Tyrosinasen	144
Abb. 3.58:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Rinderserum-Albumin und <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase	145
Abb. 3.59:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Hämocyanin und SDS-aktiviertem Hämocyanin	147
Abb. 3.60a:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Hämocyanin nach Aktivierung mit SDS	148
Abb. 3.60b:	SDS-PAGE der Reaktionsansätze mit Hämocyanin nach Aktivierung mit SDS	148
Abb. 3.61:	SDS-PAGE der extrahierten Proteine aus Exuvien von <i>Eurypelma californicum</i> ...	150
Abb. 3.62:	Western Blot der extrahierten Proteine aus Exuvien von <i>Eurypelma californicum</i> ..	151
Abb. 4.1:	Sequenz-Alignment der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>S. castaneoglobisporus</i>	158
Abb. 4.2:	Das aktive Zentrum der <i>S. castaneoglobisporus</i> -Tyrosinase in der <i>met II</i> -Form	159
Abb. 4.3:	Die aktiven Zentren der Tyrosinase aus <i>S. castaneoglobisporus</i> , der Catecholoxidase aus <i>I. batatas</i> und des Hämocyanins aus <i>L. polyphemus</i>	161
Abb. 4.4:	Schematische Darstellung der Hydroxylierung und der direkt nachfolgenden Oxidation von Monophenolen durch die Tyrosinase	162
Abb. 4.5:	Schematische Darstellung der Oxidation von Diphenolen durch die Tyrosinase	164
Abb. 4.6:	Beispiele für phenolische und polyphenolische Verbindungen im Wein	169
Abb. 4.7:	24-meres Hämocyanin aus <i>Eurypelma californicum</i> in der <i>oxy</i> -Form	172

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt während der Aufarbeitung des Überstands einer in GM-Medium gewachsenen <i>S. antibioticus</i> -Kultur	67
Tab. 3.2:	Tyrosinase-Aktivität in den aufkonzentrierten Überständen von sechs verschiedenen <i>S. antibioticus</i> -Kulturansätzen	69
Tab. 3.3:	Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt nach Kationen-Austausch mittels Vivapur Maxi S Säule	72
Tab. 3.4:	Proteingehalt und Tyrosinase-Aktivität nach Kationen-Austausch mit Servacell P23	74
Tab. 3.5:	Tyrosinase-Aktivität und Proteingehalt während der Kultivierung von <i>S. antibioticus</i> im Fermenter und im dialysierten Präzipitat der Ammoniumsulfat-Fällung	77
Tab. 3.6:	Tyrosinase-Aktivität im Ammoniumsulfat-Präzipitat des Kulturfiltrates vor und nach Anionen-Austausch mit Servacell DEAE52	82
Tab. 3.7:	Diphenolase-Aktivität und Proteingehalt der SEC-Fraktionen 29 - 37	89
Tab. 3.8:	Diphenolase-Aktivität und Proteingehalt während der Reinigung der Tyrosinase aus dem Kulturfiltrat von <i>S. antibioticus</i>	91
Tab. 3.9:	Kern-Kern-Abstände der Cu-Atome zu den N _ε -Atomen der ligandierenden Histidine, sowie der Cu-Atome zueinander	104
Tab. 3.10:	Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>A. bisporus</i> für die untersuchten mono- und diphenolischen Substrate	122
Tab. 3.11:	Die Enzymparameter der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase für die Inhibition durch L-Mimosin	126
Tab. 3.12:	Die Enzymparameter der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase für die Inhibition durch L-Mimosin	128
Tab. 3.13:	Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>A. bisporus</i> für den uninhibierten und den durch Mimosin inhibierten Umsatz von L-Dopa	128
Tab. 3.14:	Enzymparameter der <i>S. antibioticus</i> -Tyrosinase für die Inhibition durch DL-Homocystein	131
Tab. 3.15:	Enzymparameter der <i>A. bisporus</i> -Tyrosinase für die Inhibition durch DL-Homocystein	132
Tab. 3.16:	Die Enzymparameter der Tyrosinasen aus <i>S. antibioticus</i> und <i>A. bisporus</i> für den uninhibierten und den durch Homocystein inhibierten Umsatz von L-Dopa	133
Tab. 3.17:	Kinetik-Parameter der Tyrosinase-Reaktion in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, in Weißwein (Riesling), sowie in Rotwein (Spätburgunder)	135
Tab. 3.18:	Aktivität der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i> gegenüber Dopamin in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, in Weißwein, sowie in zwei Rotweinen	136
Tab. 3.19:	Aktivität der Tyrosinase aus <i>A. bisporus</i> gegenüber Dopamin in reinem Puffer, in Gegenwart von Rotweinkapsel-Inhaltsstoffen, sowie in alkoholfreiem Rotwein	137
Tab. 3.20:	Kinetik-Parameter der Uricase-Reaktion in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, sowie in Rotwein (Spätburgunder)	139
Tab. 3.21:	Aktivität der Uricase aus <i>S. scrofa</i> gegenüber Harnsäure in alkoholfreiem und alkoholhaltigem Puffer, in Rotwein, sowie in Gegenwart von Rotweinkapsel-Inhaltsstoffen	139

Sequenz-Alignment von Tyrosinasen, Catecholoxidase und Hämocyanin

```

S.antTY : ----- : -
A.bisTY : ----- : -
A.oryTY : ----- : -
N.craTY : ----- : -
M.mustY : -----MFLAVLYCLLWSFQISDGHFPRACASSK-LLAKECCPPWMDGSPCGQLSGRGSC-QDILLSSAPSGPQFP-FKGVDDRESW : 80
H.sapTY : -----MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPACVSSK-NLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSC-QNILLSNAPLPGPFP-FKGVDDRESW : 80
I.batC0 : -----MEPIHAPEISKCVVPPKDLPPDAIVDNCPLATNVIYKVPRTSP-SAMKIRPAIHRMDKEYIAKFEKAIRLMK : 74
E.calHC (c) : -----MPSDANEMQARLLQLFE-HSTLSTKAKFG-LRVIRDPKLAGIG-ILGRGKIF-SCFHEDHLEEAASRLAEV--LVGAETFD : 74
E.calHC (f) : -----MTVQDKQRQLLPLFE-HLTSLTRGGL--DRTESDVRLRVVG-RLPRGTLF-SCFHSEHLKEATELYQI--LYKADSFA : 71

```

```

S.antTY : -----MTVRKNQASLTAEER---RFV : 19
A.bisTY : -----MSLIATVGTGGVKNRLNIWDFVKNKFFTLVRSLEL : 38
A.oryTY : -----MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSIRDLMEEELDKLIEAWRW : 44
N.craTY : -----MSTDIKFAITGVPTTPSSNGAVPLRRELRLDQONYPEQFNLYLLGLRD : 48
M.mustY : PSVFNRTQCSCGNFMGFCMGCKFGFGPPNCTEKRVLIRRNIF-DLSVSEKMKFFSYLTAKHTISS-VYVIPGTGYQMNGS--TPMF : 167
H.sapTY : PSVFNRTQCSCGNFMGFCMGCKFGFGPPNCTERRLLVRRNIF-DLSAPEKDKFFAYLTAKHTISS-DYVIPGTGYQMNGS--TPMF : 167
I.batC0 : ----- : -
E.calHC (c) : EFIDLCHQCRDFVNEALFVYSLVAAILHRPDCHGISLPPIQEIFPDKFVPVETIYKAFKEATRHADKTDLDIIVDMEATGTIMDPEYNLAY- : 165
E.calHC (f) : DFHHLAQQARDIVNEGLFVYSVVAAILHRDDCRGVTVPPIQEIFPDRFVPAETVNAQVAVKADLKRQSSDEDVLEIQTGNILDPEHKLAYF- : 162

```

Cu_A

```

S.antTY : AALLELKRTGRVDAFVTTWNAFILGDTDN-----GERTGRR-----SPSFLPWRRFLLEFERALQSVDA : 79
A.bisTY : LQAKEQHDYSSFFQLAGIEGLPFTTEWAKERPSMNLTK-----AGYCTHG-----QVLFTWHRTYLSVLEQILQAAAI : 106
A.oryTY : IQDPARTGEDSFFYLAGEIIEGPFPRGAGYMNSSHWW-----GGYCHHG-----NILFPTWHRAYLMAVEKALRKAACP : 109
N.craTY : FQGLDEAKLDSFYQVAGIEGMPFKPWAGVPSDITDWSQGSSEGGYCTHS-----SILFITWHRPYLALYEALYASVQ : 122
M.mustY : NDINI-----YDLFVWMMHYVYSRDTLLGGSEIWR-----DIDFAHE-----APGFLPWHRFLLLWEQEIRELTG : 227
H.sapTY : NDINI-----YDLFVWMMHYVYSMDALGGYEIWR-----DIDFAHE-----APAFLPWHRFLLRWQEIQKLTG : 227
I.batC0 : -ELPADD-PRNFYQALVHCAYCNGGYVQTDYDPK-----EI-QVEM-----SWLFFPWRWYLYFFYERILGKLG : 137
E.calHC (c) : -----REDIGINAHMWH-----MHWVYPSAAMDVSKMHRKDRKGLFFYMHQVMCARYDCERLBNGL : 222
E.calHC (f) : -----REDIGANAHMWH-----MHLVYPPPTWDA SVMSKVKDRKGLFFYMHQVMCARYDCRLSTGL : 219

```

```

S.antTY : SVALPYWDWSADRSTRSSLW---APDFLGGTGRSRDC---QVMDGPF AAS-----AG-----NWPINVRVDGR-----TFL : 139
A.bisTY : EVAKKFTSNQTDWVQAAQDLRQPYWDWGFELMPPDEVIKNEEVNITMYDGKKISVKNPILRYHFHPIDPSFKPYGDFATWRTTVRNPDRNR : 198
A.oryTY : DVSLPYWDESDDETAKKGIPLIFTQKEYKQKPNPLYSYTFSEIRIVDRLAKFPDADYSKPGYKTCRYPYSGLCGQDDIAIAQHMFLDANF : 201
N.craTY : AVAQKFPVEGGLRAKYVAAAKDFRPFYD WASQPPKGTALAFPESSSRITQVVDVWGKTKSINNPLHRFTFHPVMPSPGDFSAAWSRYPTV : 214
M.mustY : DENFTVYUDWRDAENCDIC---TDEYLGGRHPENPN---LLSPASFFSS---WQIICS-R-S---EY---NS-HQVLCGDT-P---EGPL : 297
H.sapTY : DENFTVYUDWRDAEKCDIC---TDEYMGQGHPTNPN---LLSPASFFSS---WQIVCS-R-L---EY---NS-HQSLCNGT-P---EGPL : 297
I.batC0 : DPTFGLPFUNMDTPAGMLIPQYFRNQNSPLYDENRNQSHLPLVMDLGYAGTDMDVTDQERISNNLALMYKSMVINAETAELFLGKPKYAGDD : 229
E.calHC (c) : ARMIPFHNWHEPLEGYNPHLSSTQNGLPYAFRPEPMTLCDMHDVSVQDLERWRERILDAINLGEVTDPNGDEYALDETFGIDVGAIESSR : 314
E.calHC (f) : RRMIPFHNWHEKLEGYSPHLTSLVSGLNYSRPAAGLHLRDLVDVFDVQDMARWRERLLYSIDIGHVIDHEGQEIPLDAEHGIDVLGALLES- : 310

```

```

S.antTY : RRALG---AGVS-----ELPTRAEVDS-----VLAMATYD-----MAPWNSGS-----D---GFRNHLEGWRGVN- : 188
A.bisTY : EDIPGLIKMRLEEGQIREKTYNMLKFNDAWERFSNHGISDDQ-----HANS : 245
A.oryTY : NQEQITGLNNSNVTSWNLGQFTDIEGKQVKADTRWKIRQCLLTHEEYTVFSNITSAQRWDEQFHPLESGGKET---EAKATSLAVP--- : 285
N.craTY : RYPMRLTGASRDERIAPILANELASLRNVSLLLSYKDFDAPSYNRWDPTNTPGD-----FGS : 273
M.mustY : LRNPGNHDKAKT---P---RLPSSADVEF-----CLSLTQYE-SG-----SMDRTANFS---FRNTLE---GFASPLTGIADPS- : 358
H.sapTY : RRNPGNHDKSRT---P---RLPSSADVEF-----CLSLTQYE-SG-----SMDKAANFS---FRNTLE---GFASPLTGIADAS- : 358
I.batC0 : PVMKG-----GGSI : 238
E.calHC (c) : DSK-----NRES : 321
E.calHC (f) : SHD-----SLNDDY : 319

```

Cu_B

```

S.antTY : ---LEWRVWVWVGQMATGV-----SPNDPVFWLHAYIDKLUAEWQRR--HPSSPYLPGGGTPNVVD----- : 246
A.bisTY : LESVHDDIEVMVGYGKIEGH-----MDHPFAAFDPFVWHLHNTVDRLLS---LUKAINPDVWVTS---GRNRDGTMGIAPNQAI : 319
A.oryTY : LESVHDDMLAIGGVQIPGFNVDDYAGANGDMGENDTASFDPIFYFHCFIDYLF-----WTWQTMH-----KKTIDASQIT-- : 356
N.craTY : LEDVHNEIEDRTGGNGH-----MSLEVSADFPLFWLHNVVDRLLS---IQQDLNPNFSFMTPR---PAPYSTFVAQEGESQS : 345
M.mustY : QSSMHNALEHFM--NGT-----MSQVQGSANDPIFLLEHAFVDSIFEQWLR--HRPLLEVYPEANAPIGHN-R---DS-YMV- : 427
H.sapTY : QSSMHNALEHYM--NGT-----MSQVQGSANDPIFLLEHAFVDSIFEQWLR--HRPLQEVYPEANAPIGHN-R---ES-YMV- : 427
I.batC0 : ENIPHTPVRRWVGDVKPRTQNGEDMGNF-----YSAGRDILFYCHHSNVDRMWTIWQQLGKGRRRDFTDSDWLDATFIFYDENKQAVRV : 323
E.calHC (c) : YGSLHNVGHWLMAINVDPDGKYQTMGPV---MDDTATSLRDPIFYRWRHFIDDMFQEFKRKLPKPYTKQLSFTGVEIKNVKVAHEENVITT : 410
E.calHC (f) : YGNLHNSGHWMMARIHDPGRFRENPGV---MSDTSTSLRDPIFYRYRHFIDMIFQEKATLPCYEKDLLEFSGWEIVNCTVNAKAPNVINT : 408

```

S.antTY : ----LNETMKPMN-DTTPAALL-----DHTRHYT-FDV----- : 273
A.bisTY : NSETP-LEPFYQSGDKVWTSASLADTARLGYSTP-----DFDKLVGGT---KELIRD AIDDLIDERYGSKPSS---GARN-TAFDL : 392
A.oryTY : -----ILPEYPGTNSVD----SQG--PTPGISGNTWLTLD-TPLDPFRE---NGDKVTSNKLLTLKD--LPYTYKAPTSGTGVSF : 424
N.craTY : KS-TPLEPFMDKSAANFWTSEQVKDSITFGYAYPETQKWKYS-SVKEYQAAIRKSVTALYGSNVFANFVENVADRTPALKNPQATGEEKST : 435
M.mustY : --P-FIPLYRN-G-DFFITSKD-LGY-DYSYLQE-SDPGF-YRNYIEPYLEQASRIWPWLLGAALVGAV--IAAALSGLSSRLCLQKKKKK : 508
H.sapTY : --P-FIPLYRN-G-DFFISSKD-LGY-DYSYLQD-SDPDS-FQDYIKSYLEQASRIWSULLGAAMVGAV--LTALLAGLVSLLCRHKRR--Q : 506
I.batCO : RVGDALD-----NQKLGKYK-----EFTNLPWLNKSP----LPT-KKKTGLAARSKAPFV-TDVFPPLTDKVVQVVKVPRPK : 388
E.calHC (c) : TFVEDLLEISNAFNFGRGTGAVKVRVYQHLDEHPFYDIEVENHSARLPHGTGCRIFLAPVHDELQNLQTPPEELRRLMIEDRFRVLEKPGVNHN : 502
E.calHC (f) : YMKESTLEMSHGISFKGAVKVKYQHLHDHPFTYSISVENTTGDVKHATVRI FLGPTQDELGNRLRLNEQRRFYIELDKFHAE LAAGKNTITR : 500

S.antTY : ----- : -
A.bisTY : LADFKGITKEHKEDLKNYDWTIHVAFKKFELKESFSLLFYFASDGGDYDQENCFVG-----SINAFRGTAPETCANCQD-- : 466
A.oryTY : N-----DVPRLN--YPLSPPILRVSG--INRASIA--G--SFALAISQTDHTGKAQVKGIESVLSRWVHVGQCANCQTHLSTTAFVPLFELNE : 503
N.craTY : VSAAAAHAVELSGARKVAEK-VHNVFQHAEEKAQKPVVVKDKAESSTAAGMMIGLSIKRPSKLTASPGP-IPESLYLAPDGKYDWMVHN : 525
M.mustY : QPQEEQRPLLMDKDDYHSLLYQSHL----- : 533
H.sapTY : LP-EEKQPLLMEKEDYHS-LYQSHL----- : 529
I.batCO : KRSRKE--EKEAEEEELEIQGIEVA-----IDQYAKF--DVYLNDED----EPEAGKEKAEYAGSFAHLPHKHTGSKKI : 454
E.calHC (c) : HRHSRDSSTVTSKPKFDELLKGGKTNMANEYCSGCGWPDHLLVPGMDRGMPFHLVCMITDYLVDLVGDYGYDTPCVDVAVSYCCGAKDSLYPD : 594
E.calHC (f) : KSSESSVTVSHTPTFEELQRGEGVDENTTEFCSCGWPEHLLVPRGYTKGMDFQLFVMLTDYEDDHVGHSHNGQTLCADAVSYCCGAKDSKYDPK : 592

S.antTY : ----- : -
A.bisTY : ---NENLIQEGFIHLNHYLARDLESFEPQDVHKFLKEKGLSYKLYS-RGDKPLTSLSVKIEGRPLHPPG-EHRPKYDHTQARVVFDDVAWH : 553
A.oryTY : DDAKRKHANNE LAVHLHTRGNPGGQRVRNVVTGTMR----- : 539
N.craTY : VR-AQKHGLGQSFRVIVFLGDFNPDPEWDEFCNCGRVSVLGRSAETQCGKCRKDNANGLIVSGTVPLTSLCCRILWAASSRASSLRMSR : 616
M.mustY : ----- : -
H.sapTY : ----- : -
I.batCO : RTSLSLGLMEPLED--LGAEDDDAVLVTLAPKVGCGGVVTVENIKIVYGS----- : 501
E.calHC (c) : RRAMGFPPDRPIPEGHASNLHQPNVVSFSQIKIQHH----- : 629
E.calHC (f) : RAMGFPPDRVIKARTVADFRITNMSFTDVVKIQFKDQV----- : 629

S.antTY : ----- : - S.antTY: *Streptomyces antibioticus* Tyrosinase (P07524)
A.bisTY : VIN---- : 556 A.bisTY: *Agaricus bisporus* Tyrosinase (CAA11562)
A.oryTY : ----- : - A.oryTY: *Aspergillus oryzae* Tyrosinase (BAA07149)
N.craTY : ICAPT-- : 621 N.craTY: *Neurospora crassa* Tyrosinase (YRNC)
M.mustY : ----- : - M.mustY: *Mus musculus* Tyrosinase (BAA00341)
H.sapTY : ----- : - H.sapTY: *Homo sapiens* Tyrosinase (AAK00805)
I.batCO : ----- : - I.batCO: *Ipomoea batatas* Catecholoxidase (CAC29040)
E.calHC (c) : ----- : - E.calHC: *Eurypelma californicum* Hämocyanin,
E.calHC (f) : ----- : - Untereinheiten c (Q9NFL6) und f (Q9NFL5)

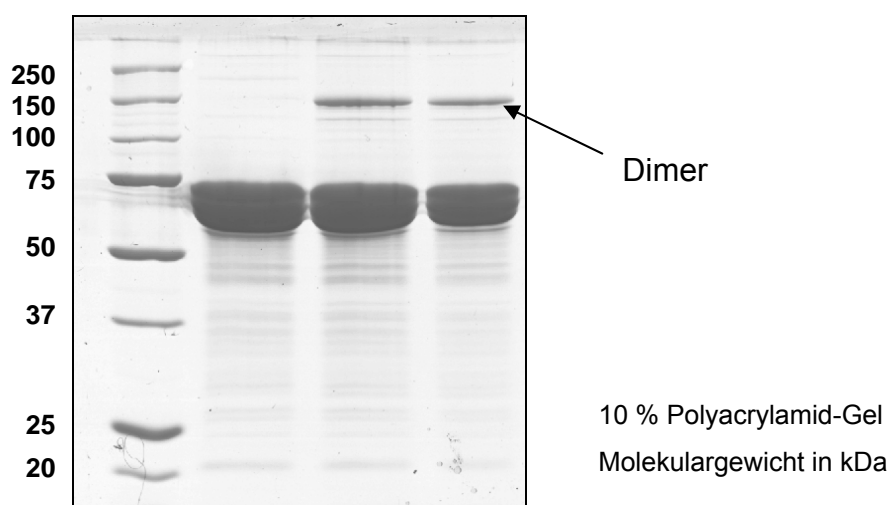
8.2 Sequenzierungsergebnisse

Die Analyse erfolgte mittels Massenspektrometrie am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Probe 1: Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* ($0,75 \text{ mg ml}^{-1}$)

(7 verschiedene Untereinheiten (a-g) mit jeweils 60-65 kDa)

Quervernetzung durch Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* ($17 \mu\text{g ml}^{-1}$)

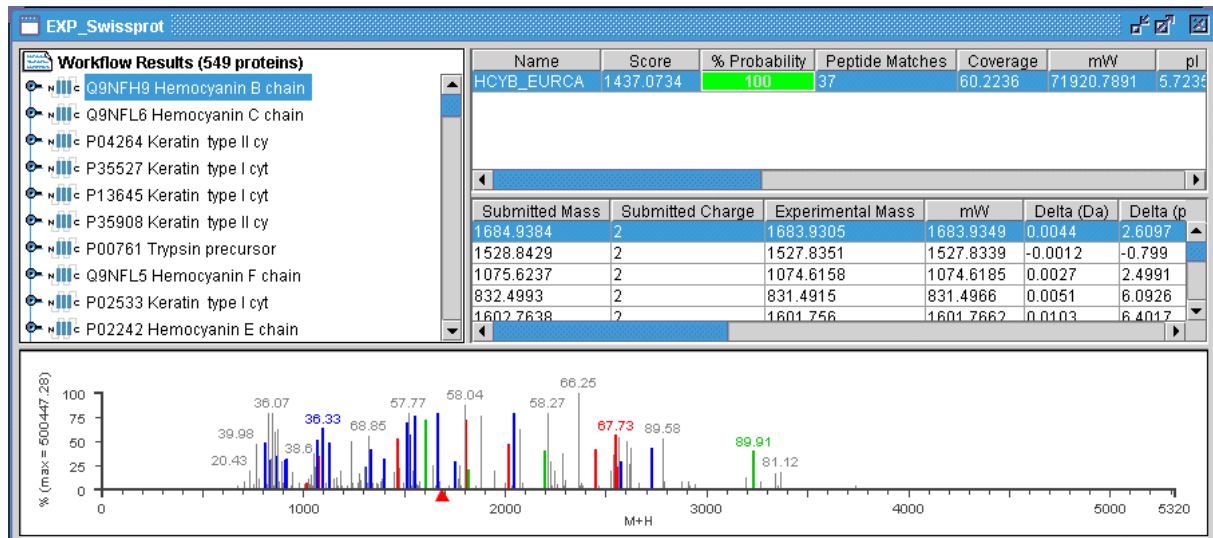


Analyse der Dimer-Bande:

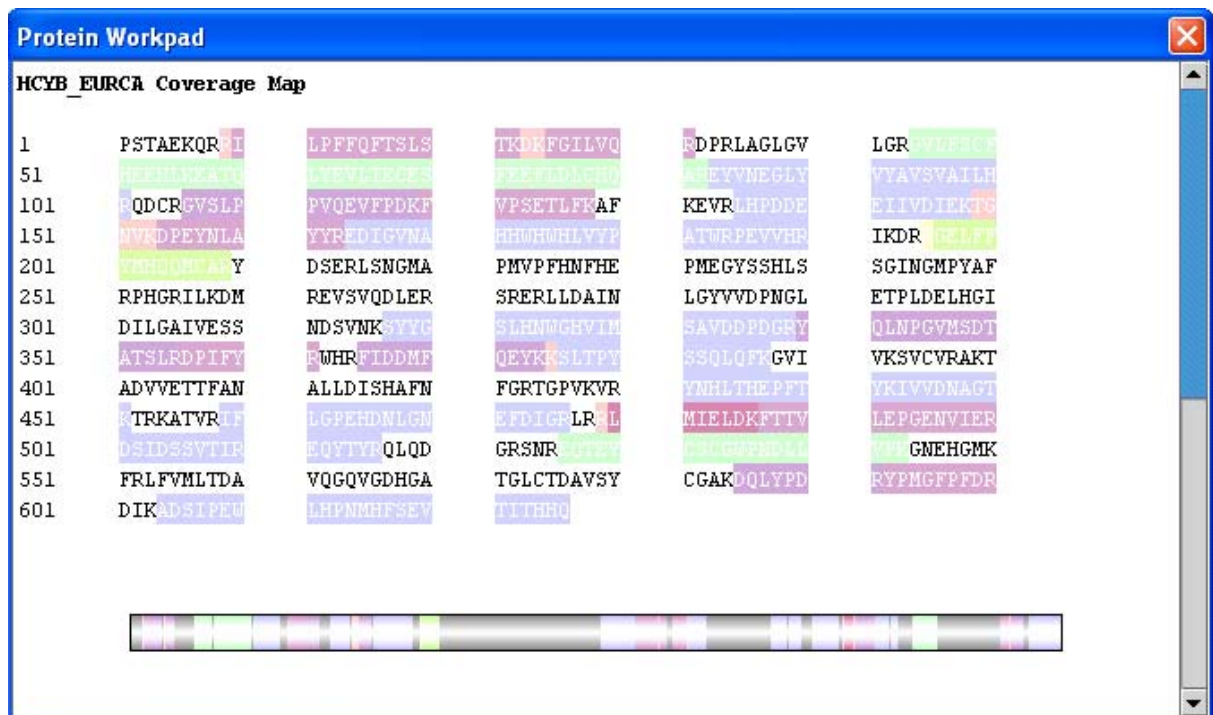
Protein	Accession No.	Intensity Score	Peptide matches
hemocyanin chain a	P14750	56	16
hemocyanin chain b	Q9FH9	1437	37
hemocyanin chain c	Q9FL6	907	29
hemocyanin chain d	P02241	46	9
hemocyanin chain e	P02242	76	14
hemocyanin chain f	Q9FL5	119	16
hemocyanin chain g	Q9NFL4	-	0

Der *Intensity Score* repräsentiert die relative Signalstärke (in willkürlichen Einheiten). *Peptide matches* gibt die Anzahl der unterschiedlichen Peptidfragmente an, deren Sequenz mit dem Protein übereinstimmt. Die Daten dokumentieren eindeutig die Dominanz der Untereinheiten b und c.

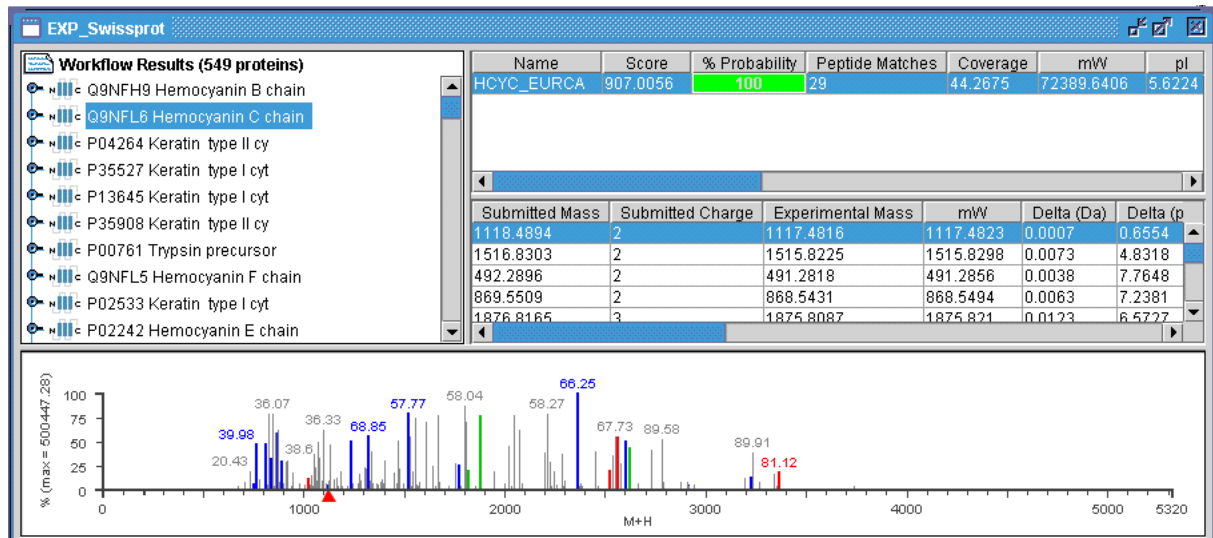
Detektierte Fragmente der Hämocyanin-Untereinheit b (Original-Daten):



Hemocyanin B Chain Coverage Map



Detektierte Fragmente der Hämocyanin-Untereinheit c (Original-Daten):

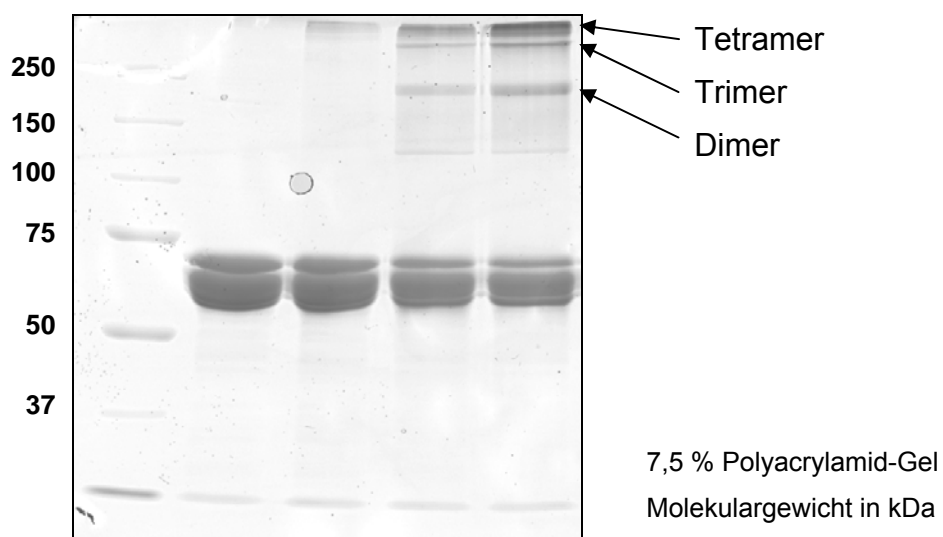


Hemocyanin C Chain Coverage Map



Probe 2: Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* ($0,75 \text{ mg ml}^{-1}$)
(7 verschiedene Untereinheiten (a-g) mit jeweils 60-65 kDa)

Quervernetzung durch SDS-Aktivierung zur Phenoloxidase (0,1 % SDS)



Analyse der Dimer-Bande:

Protein	Accession No.	Intensity Score (sample a)	Intensity Score (sample b)
hemocyanin chain a	P14750	60	37
hemocyanin chain b	Q9FH9	160	69
hemocyanin chain c	Q9FL6	160	104
hemocyanin chain d	P02241	70	44
hemocyanin chain e	P02242	130	160
hemocyanin chain f	Q9FL5	175	82
hemocyanin chain g	Q9NFL4	106	94

Analyse der Trimer-Bande:

Protein	Accession No.	Intensity Score (sample a)	Intensity Score (sample b)
hemocyanin chain a	P14750	75	105
hemocyanin chain b	Q9FH9	80	73
hemocyanin chain c	Q9FL6	150	158
hemocyanin chain d	P02241	605	735
hemocyanin chain e	P02242	360	690
hemocyanin chain f	Q9FL5	581	950
hemocyanin chain g	Q9NFL4	386	700

Analyse der Tetramer-Bande:

Protein	Accession No.	Intensity Score (sample a)	Intensity Score (sample b)
hemocyanin chain a	P14750	150	335
hemocyanin chain b	Q9FH9	321	409
hemocyanin chain c	Q9FL6	220	550
hemocyanin chain d	P02241	300	692
hemocyanin chain e	P02242	292	800
hemocyanin chain f	Q9FL5	460	734
hemocyanin chain g	Q9NFL4	260	742

Die Daten der drei Tabellen dokumentieren eindeutig, dass keine der sieben Untereinheiten in den analysierten Oligomeren dominiert.