

gung am quergestreiften Muskel könnten auch für das adrenerge System wichtige Anhaltspunkte liefern; das gleiche kann von weiteren Einblicken in die physikochemischen Änderungen des Membranzustandes im Zusammenhang mit dem Nervimpuls erwartet werden^[41].

Eingegangen am 15. Februar 1971 [A 839]

- [1] T. R. Elliott, *J. Physiol. (London)* 31 (1904).
 [2] O. Loewi, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 189, 239 (1921).
 [3] W. B. Cannon u. J. E. Uridil, *Amer. J. Physiol.* 58, 353 (1921).
 [4] U. S. von Euler, *Acta Physiol. Scand.* 12, 73 (1946).
 [5] U. S. von Euler, *Acta Physiol. Scand.* 16, 63 (1948).
 [6] F. Stolz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 37, 4149 (1904).
 [7] P. Holtz, K. Credner u. G. Kroneberg, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 204, 228 (1944/1947).
 [8] McC. Goodall, *Acta Physiol. Scand.* 24, Suppl. 85 (1951).
 [9] B. Falck u. A. Torp, *Med. Exp. (Basel)* 6, 169 (1962).
 [10] Ch. Owman u. N. O. Sjöstrand, *Z. Zellforsch.* 66, 300 (1965).
 [11] B. Folkow u. U. S. von Euler, *Circulat. Res.* 2, 191 (1954).
 [12] N.-Å. Hillarp u. B. Hökfelt, *Acta Physiol. Scand.* 30, 55 (1953).
 [13] E. T. Angelakos, K. Fuxe u. M. L. Torchiana, *Acta Physiol. Scand.* 59, 184 (1963).
 [14] U. S. von Euler u. R. Luft, *Brit. J. Pharmacol.* 6, 286 (1951).
 [15] T. Sundin, *Acta Med. Scand.* 161, Suppl. 336 (1958).
 [16] U. S. von Euler u. S. Hellner, *Acta Physiol. Scand.* 26, 183 (1952).
 [17] R. Luft u. U. S. von Euler, *J. Clin. Invest.* 32, 1065 (1953).
 [18] A. Engel u. U. S. von Euler, *Lancet* 2, 387 (1950).

- [19] I. Ehrlén, *Farm. Revy* 47, 242 (1948).
 [20] G. Bloom, U. S. von Euler u. M. Frankenhaeuser, *Acta Physiol. Scand.* 58, 77 (1963).
 [21] J. Leduc, *Acta Physiol. Scand.* 53, Suppl. 183 (1961).
 [22] N.-Å. Hillarp, *Acta Anat.* 2, Suppl. 4 (1946).
 [23] N.-Å. Hillarp, S. Lagerstedt u. B. Nilson, *Acta Physiol. Scand.* 29, 251 (1953).
 [24] H. Blaschko, P. Hagen u. A. D. Welch, *J. Physiol. (London)* 120, 58 P (1953).
 [25] U. S. von Euler u. N.-Å. Hillarp, *Nature* 177, 44 (1956).
 [26] G. Bloom, U. S. von Euler, G. Gemne u. F. Lishajko, unveröffentlicht.
 [27] J. Axelrod, *Recent Progr. Hormone Res.* 21, 597 (1965).
 [28] B. B. Brodie, P. A. Shore u. A. Pletscher, *Science* 123, 992 (1956).
 [29] A. Carlsson u. N.-Å. Hillarp, *Kungl. Fysiografiska Sällskapets i Lund förhandl.* 26, Nr. 8 (1956).
 [30] U. S. von Euler, *Recent Progr. Hormone Res.* 14, 483 (1958).
 [31] A. Dahlström u. J. Häggendal, *Acta Physiol. Scand.* 67, 278 (1966).
 [32] L. Stjärne u. F. Lishajko, *Biochem. Pharmacol.* 16, 1719 (1967).
 [33] U. S. von Euler u. S. Hellner-Björkman, *Acta Physiol. Scand.* 33, Suppl. 118, S. 17 (1955).
 [34] S. Bygdeman u. U. S. von Euler, *Acta Physiol. Scand.* 68, 134 (1966).
 [35] U. S. von Euler u. F. Lishajko, *Acta Physiol. Scand.* 65, 324 (1965).
 [36] U. S. von Euler u. F. Lishajko, *Acta Physiol. Scand.* 57, 468 (1963).
 [37] H. J. Schümann, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 233, 296 (1958).
 [38] U. S. von Euler u. F. Lishajko, *Acta Physiol. Scand.* 77, 298 (1969).
 [39] L. Stjärne in G. Kroneberg u. H. J. Schümann: *Bayer Symposium II*. Springer, Berlin 1970.
 [40] B. Katz: *The Sherrington Lectures X*. Liverpool University Press 1969.
 [41] D. Nachmansohn, *Science* 168, 1059 (1970).

Noradrenalin: Abbau und Regulation seiner Biosynthese (Nobel-Vortrag)^[**]

Von Julius Axelrod^[*]

Als ich 1955 in das National Institute of Mental Health eintrat, begann ich nach einem geeigneten Gegenstand für meine Arbeiten zu suchen. Bei Literaturstudien stellte ich mit Erstaunen fest, daß nur sehr wenig über den Noradrenalin- und Adrenalin-Stoffwechsel bekannt war. 1946 isolierte von Euler^[1] Noradrenalin aus dem sympathischen Nervensystem und identifizierte dieses Catecholamin; später entwickelte er empfindliche Methoden zum quantitativen Nachweis in Geweben^[2]. 1954 hatte ich über den Stoffwechsel in vivo^[3] und in vitro^[4] von Amphetaminen und von Verbindungen gearbeitet, die in ihrer Struktur mit Catecholaminen verwandt sind. Aufgrund dieser Vorgeschichte entschloß ich mich, den Stoffwechsel von Noradrenalin und Adrenalin zu untersuchen.

Gerade als diese Arbeit begann, identifizierten Armstrong et al.^[5] 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure im Harn von

Patienten mit adrenalin-bildenden Tumoren. Diese Beobachtung ließ sofort vermuten, daß Catecholamine *O*-methyliert werden könnten. Cantoni hatte gezeigt, daß enzymatisch aus ATP und Methionin gebildetes *S*-Adenosylmethionin seine Methylgruppe an den Stickstoff von Nicotinamid^[6] abgeben kann, und es erschien möglich, daß *S*-Adenosylmethionin seine Methylgruppe auch auf eine der Hydroxygruppen von Catecholaminen übertragen kann. Beim ersten Experiment wurde eine Rattenleberfraktion mit ATP, Methionin und Mg²⁺ sowie Adrenalin inkubiert und das Verschwinden des Catecholamins gemessen^[7]. Nur in Gegenwart dieser Cofaktoren nahm die Catecholamin-Konzentration deutlich ab. Wenn einer der Cofaktoren weggelassen wurde, fand kein Stoffwechsel statt. Die Notwendigkeit sowohl von ATP als auch von Methionin deutete darauf hin, daß der Leberextrakt *S*-Adenosylmethionin erzeugte. Mit *S*-Adenosylmethionin anstelle von ATP und Methionin nahm der Adrenalin-Stoffwechsel sogar noch zu (Tab. 1). Das *O*-methylierte Stoffwechselprodukt wurde durch Lösungsmittelextraktion isoliert und als 1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-2-methylamino-äthanol (Metanephrin) identifiziert. Senoh und Witkop aus den National Institutes of Health synthet-

[*] Prof. Dr. J. Axelrod
 Laboratory of Clinical Science
 National Institute of Mental Health
 Bethesda, Maryland 20014 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1971. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

tisierten Metanephrin und Normetanephrin innerhalb von zwei Tagen nach der Isolierung.

Catecholamin-*O*-Methyltransferase (COMT)

Tabelle 1. Enzymatische *O*-Methylierung von Catecholaminen.

Substrat	<i>O</i> -Methoxyprodukt (nmol)
L-Adrenalin	59
L-Adrenalin (<i>S</i> -Adenosylmethionin weggelassen)	0
L-Adrenalin (MgCl ₂ weggelassen)	4
DL-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol	0
D-Adrenalin	62
L-Noradrenalin	63
DL-Octopamin	0
Dopamin	60
Tyramin	0
Dopa	63

Catecholamine oder andere Amine (0.3 µmol) wurden bei 37°C 30 Minuten mit folgenden Zusätzen inkubiert: unvollständig gereinigter Catecholamin-*O*-Methyltransferase aus Rattenleber, 50 µmol Phosphatpuffer (pH = 7.8), 150 µmol *S*-Adenosylmethionin und 10 µmol Magnesiumchlorid in einem Endvolumen von 1 ml. Bei Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin als Substraten wurden die *O*-Methoxy-Derivate bestimmt, bei den anderen Substraten wurde das Verschwinden gemessen [9].

In Harn und Gewebe gesunder Ratten wurde dann durch Lösungsmittelextraktion und Papierchromatographie geprüft, ob Normetanephrin, Metanephrin und 3-Methoxytyramin normalerweise vorkommen. Alle diese Verbindungen fanden sich in Gehirn, Milz und Nebenniere^[8]. Später wurde als weiteres *O*-methyliertes Stoffwechselprodukt 1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)glykol identifiziert. Noradrenalin-, Adrenalin- und Dopamingaben hatten eine

Das Enzym, das Catecholamine *O*-methyliert, wurde aus Rattenleber unvollständig gereinigt dargestellt und untersucht^[9]. Es benötigt Mg²⁺ (Tab. 1), das sich aber durch andere zweiwertige Ionen wie Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Cd²⁺ und Ni²⁺ ersetzen läßt. *S*-Adenosylmethionin ist als Methylendonor notwendig. Alle untersuchten Catechole wurden durch das Enzym *O*-methyliert, darunter Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Dopa (Tab. 1), 3,4-Dihydroxymandelsäure, 3,4-Dihydroxy-phenylellessigsäure, 2,3,17β-Östratriol und Ascorbinsäure. Auch körperfremde Catechole wie 3,4-Dihydroxy-ephedrin, 3,4-Dihydroxy-amphetamin und viele substituierte Catechole und Polyphenole können als Substrate für COMT dienen. Monophenole wurden nicht *O*-methyliert (Tab. 1). Die *O*-Methylierung tritt hauptsächlich in *m*-Stellung ein. In vitro werden allerdings je nach dem pH-Wert des Reaktionsgemisches und der Art des aromatischen Substrates sowohl *m*- als auch *p*-Hydroxygruppen methyliert^[10].

Das gereinigte Enzym hat ein Molekulargewicht von ca. 24000^[11]. Durch Stärkeblock-Elektrophorese sind mindestens zwei Formen des Enzyms identifiziert worden^[12]. Das Enzym kann durch Polyphenole^[13], 2,3,17β-Östratriol^[14] und Tropolon^[15] gehemmt werden. In vivo folgt einer Zufuhr von COMT-Hemmern eine geringfügige, aber eindeutige Verlängerung der physiologischen Wirkung von Noradrenalin^[16].

COMT ist in allen untersuchten Tierarten und auch in einigen Pflanzen vorhanden^[17]. Von den tierischen Ge-

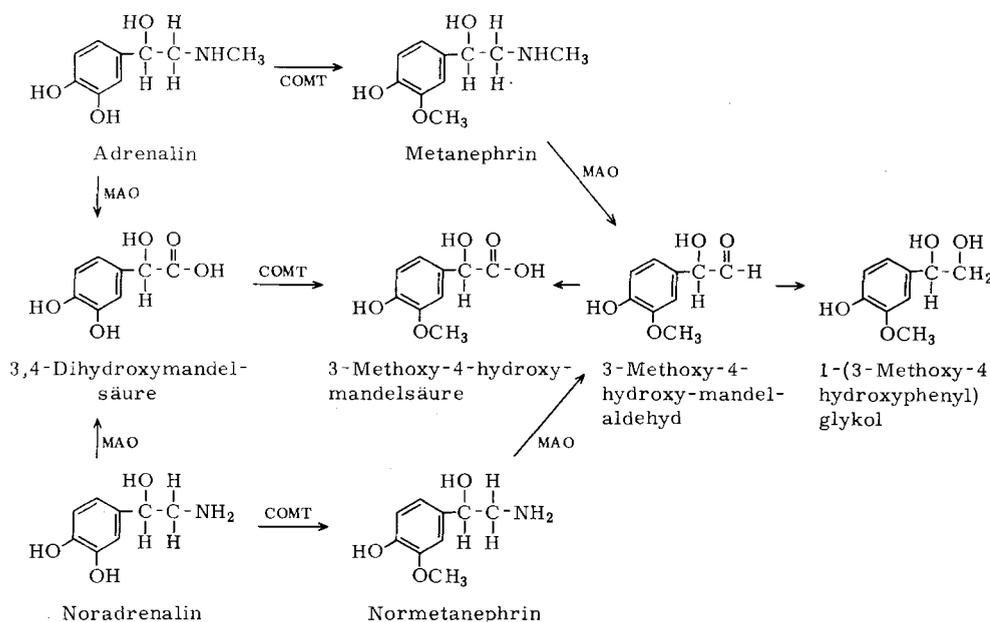


Abb. 1. Stoffwechsel des Noradrenalins und des Adrenalins. COMT bedeutet Catecholamin-*O*-Methyltransferase; MAO bedeutet Monoamin-Oxidase.

erhöhte Ausscheidung von *O*-methylierten Aminen zur Folge. Als Ergebnis dieser Versuche wurde das in Abbildung 1 dargestellte Schema für den Stoffwechsel von Noradrenalin und Adrenalin vorgeschlagen. Der Abbau von Dopamin verläuft analog.

weben zeigen Leber und Niere die höchste COMT-Aktivität. Das Enzym ist im Gehirn ungleichmäßig verteilt; am meisten enthält die Area postrema und am wenigsten die Kleinhirnrinde^[18]. Die Catecholamin-*O*-Methyltransferase findet sich hauptsächlich in der löslichen Zellfraktion, je-

doch kommen kleine Mengen auch in Fetten der Zellmembranen^[19] und in Mikrosomen^[20] vor. COMT wirkt auf Catecholamine vor allem außerhalb des Neurons, während Monoamin-Oxidase, das andere Hauptenzym für den Catecholamin-Stoffwechsel, hauptsächlich innerhalb des Neurons lokalisiert ist^[21]. Kleine Mengen COMT finden sich auch in den sympathischen Nerven der Nickhaut und des Vas deferens^[22]. COMT beteiligt sich vor allem am Stoffwechsel von Catecholaminen, die ins Blut ausgeschüttet werden^[23], und bei der Inaktivierung von Noradrenalin in Geweben mit spärlicher adrenerger Innervation^[24]. Das Enzym scheint auch bei einer extraneuronalen Aufnahme mitzuwirken^[25]. Kürzlich haben wir beobachtet, daß COMT in Säugetier-Erythrocyten vorkommt^[26]. Damit steht eine leicht zugängliche Quelle zur Untersuchung des Enzyms beim Menschen zur Verfügung. Die Aktivität von COMT war bei Frauen mit primär-affektiven Störungen verringert^[27].

Die Entdeckung von COMT führte zur Beschreibung anderer Methyltransferasen, die im Stoffwechsel der biogenen Amine eine Rolle spielen: Histamin-*N*-Methyltransferase^[28], Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase^[29], Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase^[30] und einer unspezifischen Methyltransferase^[31].

Aufnahme von Noradrenalin durch sympathische Nerven

Kurz nach Beginn der Arbeit über die *O*-Methylierung wurde die Verteilung von Adrenalin in tierischen Geweben untersucht. Glücklicherweise verhalf uns *Seymour Kety* zur Synthese von [³H]-Noradrenalin und [³H]-Adrenalin mit hoher spezifischer Aktivität. Dies ermöglichte es uns, mit physiologischen Mengen der neuronalen Überträgersubstanz zu arbeiten und die Lokalisierung und den Stoffwechsel des zirkulierenden Catecholamins zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit *Weil-Malherbe* und *Whitby* wurden spezifische Methoden für die quantitative Erfassung von Adrenalin und Noradrenalin sowie ihren *O*-methylierten Stoffwechselprodukten in Geweben entwickelt. Nach intravenöser Injektion von [³H]-Adrenalin^[32] oder [³H]-Noradrenalin^[33] bei Katzen verteilen sich diese Catecholamine schnell und ungleichmäßig in den Geweben. Die Amine wurden selektiv von Geweben wie Herz und Milz aufgenommen, die viele sympathische Nerven enthalten. Da im Gehirn nur unwesentliche Mengen von [³H]-Catecholaminen vorkamen, mußte auf eine Blut-Hirn-Schranke für diese Verbindungen geschlossen werden. *O*-Methylierungs-Stoffwechselprodukte ([³H]-Metanephrin und [³H]-Normetanephrin) kamen ebenfalls in Geweben vor. Wenn die Gewebe zwei Stunden nach Zugabe der Catecholamine untersucht wurden, und zwar lange nachdem die physiologischen Effekte abgeklungen waren, fand man noch nahezu die gleichen [³H]-Adrenalin- und [³H]-Noradrenalin-Spiegel wie nach zwei Minuten. Diese Experimente legten nahe, daß Noradrenalin und Adrenalin in einer physiologisch inaktiven Form in die Gewebe aufgenommen und dort zurückgehalten werden. Die selektive Bindung von Catecholaminen durch Gewebe mit hoher adrenerger Innervation verwies auf die sympa-

thischen Nerven als Ort, an dem sie gespeichert werden. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden die oberen Cervikalganglien von Katzen auf einer Seite entfernt; danach wurde sieben Tage gewartet, um den sympathischen Nervenfasern Zeit zur vollständigen Degeneration zu geben. Eine Stunde nach intravenöser Injektion von [³H]-Noradrenalin tötete man die Tiere und ermittelte in den Strukturen, die mit sympathischen Cervikalganglien innerviert waren, den [³H]-Catecholamingehalt^[34]. In den chronisch denervierten Strukturen war die Aufnahme von [³H]-Noradrenalin stark herabgesetzt (Tab. 2). Diese Ergebnisse zeigten, daß die sympathischen Nervenendigungen das zirkulierende Catecholamin aufnehmen und zurückhalten.

Tabelle 2. Verminderte Aufnahme von [³H]-Noradrenalin durch sympathische Nerven nach chronischer Denervation.

	chronische Denervation		akute Denervation	
	denerviert	innerviert	denerviert	innerviert
Speicheldrüse	5	42	76	89
Tränendrüse	3	45	—	—
musculus retractor	2	11	13	13
Augenmuskel	6	48	25	26

Bei sechs Katzen wurden die rechten oberen Cervikalganglien entfernt. Nach sieben Tagen bekamen die Katzen 25 µg/kg [³H]-Noradrenalin; die [³H]-Catecholamine wurden eine Stunde später in den innervierten und den denervierten Organen bestimmt. Bei den Experimenten mit akuter Denervation wurden die rechten oberen Cervikalganglien 15 Minuten vor der Gabe von [³H]-Noradrenalin entfernt. Die Ergebnisse sind als ng [³H]-Noradrenalin pro Gramm Gewebe ausgedrückt [34].

Um den intraneuronalen Ort der Noradrenalin-Speicherung zu lokalisieren, wurde eine Kombination von Elektronenmikroskopie und Autoradiographie herangezogen. 30 Minuten nach Injektion von [³H]-Noradrenalin wurde die Zirbeldrüse entnommen und für die Autoradiographie und die Elektronenmikroskopie präpariert^[35]. Die Zirbeldrüse hatten wir wegen ihrer starken sympathischen Innervation gewählt. Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung zeigten die Autoradiographien eine auffallende Lokalisierung der geschwärtzten Körner: Sie waren nicht-myelinisierten Axonen überlagert, die granulierte Vesikel von ca. 500 Å Durchmesser enthielten.

Zusammen mit *Lincoln Potter* wurde versucht, die Vesikel mit dichtem Kern zu isolieren, die das [³H]-Noradrenalin gespeichert hatten^[36,37]. Zuvor hatten *von Euler* und *Hillarp* aus Milznerven des Rindes eine bei hoher Zentrifugengeschwindigkeit abgetrennte Fraktion von noradrenalin-haltigen Granula isoliert^[38]. Wiederum wurde Ratten [³H]-Noradrenalin injiziert; anschließend trennte man subzelluläre Fraktionen aus Herz und anderen Geweben durch Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten ab^[36]. Die „Mikrosomenbande“ enthielt sowohl das Maximum an [³H]-Noradrenalin als auch an endogenem Noradrenalin (Abb. 2). Die noradrenalin-haltigen Partikeln hatten keine pressorische Wirkung, sofern sie nicht in verdünnter Säure aufgelöst wurden, was anzeigte, daß das Catecholamin gebunden war. Zusätzlich zu [³H]-Noradrenalin enthielt die Mikrosomenfraktion auch große Mengen Dopamin-β-Oxidase^[37], dem Enzym, das Dopamin in Noradrenalin um-

wandelt. Weitere Versuche, noradrenalin-haltige Vesikel zu reinigen, blieben ohne Erfolg.

Die Fähigkeit der Nervenendigungen von Geweben, den Überträgerstoff $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin aufzunehmen und zu speichern, machte es *Hertting* und mir möglich, ihn dort zu markieren und sein weiteres Schicksal nach Freisetzung aus den sympathischen Nerven zu verfolgen^[39]. So erhielten Katzen $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin; die Milz, deren Nervenendigungen $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin speicherten, wurde per-

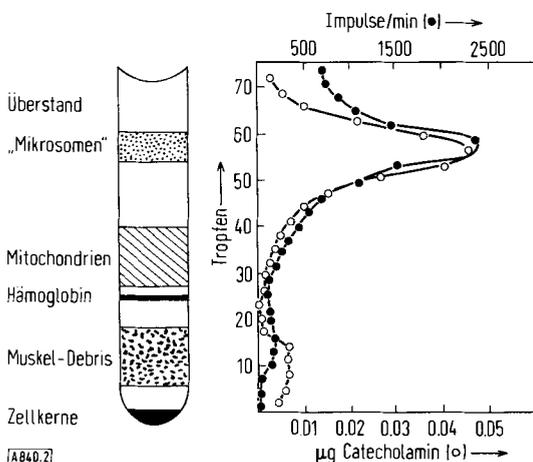


Abb. 2. Subzelluläre Verteilung des Noradrenalins im Rattenherz. Männliche Ratten (Sprague-Dawley) bekamen $50 \mu\text{g}$ $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin und wurden 30 Minuten später getötet. Die Herzen wurden schnell herausgenommen und in isotonischer Saccharoselösung homogenisiert. Ein Teil wurde auf einen exponentiellen Saccharose-Dichtegradienten gebracht und in einer präparativen Spinco-Zentrifuge mit einem SW-39-Rotor 30 Minuten bei 39000 U. p. M. zentrifugiert [37]. Durch den Boden des Röhrchens wurden Proben entnommen und darin $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin und endogenes Noradrenalin bestimmt.

fundiert; nachdem der Milznerv wie von *Brown* und *Gillespie*^[40] beschrieben gereizt worden war, ermittelten wir die Menge des radioaktiven Catecholamins und seiner Stoffwechselprodukte im venösen Ausstrom. Nach jeder Serie von Reizungen stieg die $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-Konzentration im venösen Ausstrom merklich an. Es fand sich ebenfalls eine kleine, aber meßbare Zunahme des *O*-methylierten Stoffwechselprodukts Normetanephrin, aber keine Zunahme desaminierter Stoffwechselprodukte. Aus diesen Versuchen schlossen wir, daß aus den Nervenendigungen freigesetztes Noradrenalin auf mehreren Wegen inaktiviert wurde. Ein Teil wird in den Blutkreislauf ausgeschüttet, ein Teil wird durch COMT *O*-methyliert, und ein Teil wird von den Nervenendigungen aufgenommen.

Die Wiederaufnahme von Noradrenalin durch sympathische Neuronen wurde mit *Rosell* und *Kopin* am Gefäßbett des Musculus gracilis des Hundes in situ untersucht^[41]. Die sympathischen Nerven des musculus gracilis wurden durch eine Infusion von $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin markiert und die Freisetzung von $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin nach Reizung des Nerven gemessen. Bei Reizung der vasomotorischen Nerven nahm der Ausstrom an $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin zunächst ab und stieg dann wieder an (Abb. 3). Die Verzögerung des Ausstroms beruhte dabei auf einer Erhöhung des vasculären Widerstandes. Diese Beobachtung weist auf eine verringerte Fähigkeit des Gefäßbettes hin, das freigesetzte Noradrenalin weiterzuleiten. Nach Beendigung der Rei-

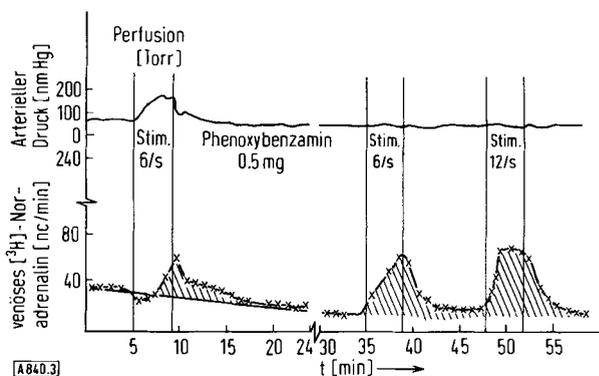


Abb. 3.

Aufnahme und Freisetzung von Noradrenalin im musculus gracilis des Hundes. Der Muskel wurde mit $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin nach der Methode von *Rosell*, *Kopin* und *Axelrod* [41] perfundiert. Peripherer Widerstand und venöser Ausstrom von $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin wurden während der Reizung des sympathischen Nerven vor und nach Behandlung mit Phenoxylbenzamin gemessen.

zung liefen die Verringerung des $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin-Ausstroms und die Wiederherstellung des peripheren Widerstandes einander parallel. Um die Verengung des Gefäßbettes zu verhindern, wurden die Hunde mit Phenoxylbenzamin vorbehandelt, einer adrenergen Blockierungssubstanz, die bekanntlich die Wiederaufnahme von Noradrenalin verhindert. Die Reizung der Vasomotoren hatte eine sofortige und stärkere Erhöhung des Noradrenalin-Ausstroms zur Folge. Der Grund für den größeren und sofort einsetzenden Noradrenalin-Ausstrom war eine Blockierung der Noradrenalin-Wiederaufnahme durch Phenoxylbenzamin. Aus diesen und anderen Versuchen wurde geschlossen, daß die Wiederaufnahme durch sympathische Nerven wesentlich zur Beendigung der Wirkungen des Überträgerstoffes Noradrenalin beiträgt. In späteren Arbeiten beschrieben mehrere Forscher^[42, 43], besonders *Iversen*, die Eigenschaften des neuronalen Aufnahmeprinzips. Er folgt der Sättigungskinetik des Michaelis-Men-

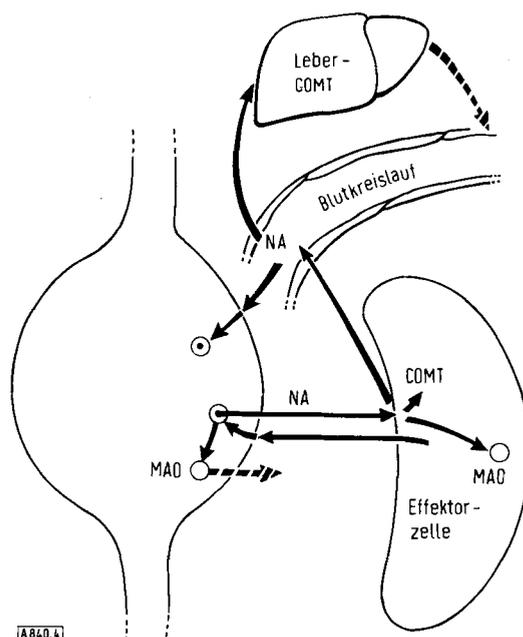


Abb. 4.

Schicksal des Noradrenalins (NA) an einer „Varicosität“ einer sympathischen Nervenendigung. COMT bedeutet Catecholamin-*O*-Methyltransferase, MAO Monoamin-Oxidase.

ten-Typs: Er ist stereospezifisch für das L-Isomere von Noradrenalin und benötigt Na^+ . Viele andere strukturell mit Noradrenalin verwandte Amine können ebenfalls in sympathische Nerven aufgenommen und dort gespeichert werden. Das Schicksal von Noradrenalin in den sympathischen Nervenendigungen und im Blut wird in Abbildung 4 dargestellt.

Noradrenalin kann auch durch einen extraneuronalen Prozeß aufgenommen werden^[44, 45], der *Iversens* Aufnahmemechanismus²^[46] ähnelt. Diese Aufnahme wird durch adrenerge Blockierungssubstanzen und Normetanephrin gehemmt^[25]. Verbindungen wie Isoproterenol, die eine geringe Affinität für die intraneuronale Aufnahme und eine hohe Affinität für die extraneuronale Aufnahme haben, können durch den letztgenannten Prozeß inaktiviert werden. Eine extraneuronale Aufnahme findet bei allen Catecholamin-Konzentrationen statt^[47] und dient dazu, Amine in nicht-neuronale Gewebe zu transportieren, wo sie anschließend abgebaut werden.

Wirkung von Pharmaka auf die Aufnahme von Catecholaminen durch den Nerven

Die Fähigkeit der sympathischen Nerven, ^3H -Catecholamine aufzunehmen, machte eine verhältnismäßig einfache Technik zum Studium der Wirkung einer Vielzahl von Pharmaka auf das sympathische Nervensystem verfügbar. In früheren Versuchen dieser Art behandelte man Mäuse mit Pharmaka und stellte fest, wie schnell das ^3H -Noradrenalin verschwindet^[48]. Dabei zeigte sich, daß die verschiedenartigsten Pharmaka (Imipramin, Chlorpromazin, Cocain, Reserpin, Amphetamin, Tyramin) diese Geschwindigkeit erhöhten. Solche Versuche ließen vermuten, daß diese Pharmaka den Abbau beschleunigen, indem sie die Bindung und/oder die Aufnahme der Catecholamine stören und sie so dem Angriff der Enzyme COMT oder Monoamin-Oxidase aussetzen. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, daß das Catechol Quer-

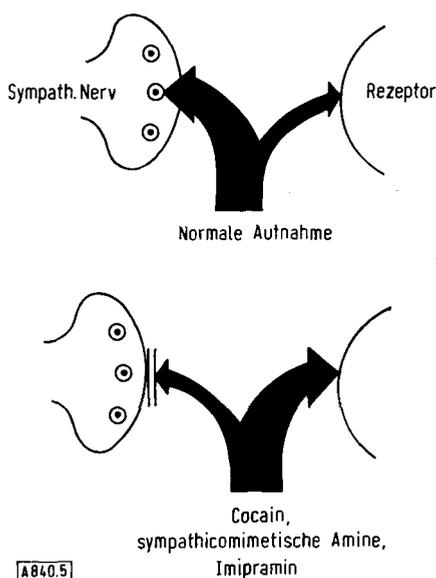


Abb. 5. Wirkung von Pharmaka auf die Aufnahme von Noradrenalin in die sympathische Nervenendigung.

citrin den Catecholamin-Stoffwechsel in vivo stark verlangsamt, vermutlich durch Hemmung von COMT.

Bei den nächsten Experimenten beschränkten wir einen direkten Weg. Mit Cocain behandelten Katzen wurde ^3H -Noradrenalin intravenös injiziert. Eine Stunde später wurden Herz, Milz und Nebennieren auf ^3H -Noradrenalin untersucht^[49]. Bei den mit Cocain vorbehandelten Katzen zeigte sich eine dramatische Verringerung des Gehalts an ^3H -Noradrenalin im Gewebe. Außerdem war bei diesen Tieren der ^3H -Noradrenalin-Spiegel im Plasma stark erhöht. Dieses Experiment zeigte, daß Cocain die Aufnahme von Noradrenalin in das Gewebe, vermutlich in die sympathischen Neurone, kräftig verringert. Die Aufnahmehemmung durch Cocain steigerte demnach die extraneuronale Noradrenalin-Konzentration (wie dies der erhöhte Plasma-Catecholamin-Spiegel anzeigt). Durch Blockierung der Aufnahme in die Nerven bewirkt das Cocain eine erhöhte Noradrenalin-Konzentration am Receptor (Abb. 5), und dies erklärt die durch das Pharmakon erzeugte Überempfindlichkeit.

Ähnliche Experimente wie die mit Cocain wurden auch mit anderen Substanzen ausgeführt^[50, 51]. Die folgenden Verbindungen verringerten die ^3H -Noradrenalin-Konzentration in Geweben: Imipramin, Chlorpromazin, Tyramin, Amphetamin, Guanethidin, Reserpin und Phenoxybenzamin. Alle diese Substanzen erhöhten auch den anfänglichen ^3H -Catecholamin-Spiegel im Blut. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß diese Pharmaka auch die Noradrenalin-Aufnahme in das adrenerge Neuron behindern.

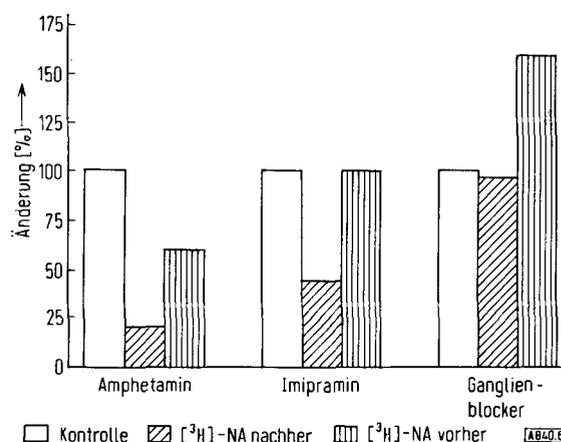


Abb. 6. Wirkungen von Pharmaka auf Aufnahme und Freisetzung von ^3H -Noradrenalin am Rattenherz. Die Ratten bekamen $15 \mu\text{C}$ ^3H -Noradrenalin 30 Minuten vor oder nach Zuführung der Pharmaka und wurden 24 Stunden später getötet. Die Herzen wurden auf verbleibendes ^3H -Noradrenalin untersucht [52, 54]. Als Ganglienblocker diente Chlorisondamin.

Zusätzlich zur Aufnahme-Blockierung könnten diese Substanzen auch die Speicherung oder die Freisetzung des gebundenen ^3H -Noradrenalins verhindern. Wenn eine Substanz nur die Noradrenalin-Aufnahme verhindert, dann sollte sie den ^3H -Noradrenalin-Spiegel im Gewebe nur dann senken, wenn sie vor dem ^3H -Catecholamin appliziert wurde. Wenn sie die Konzentration aber bei Zugabe nach dem ^3H -Noradrenalin herabsetzt, also

zu einem Zeitpunkt, an dem der Überträgerstoff schon an das Gewebe gebunden ist, dann setzt die Substanz zusätzlich das Catecholamin frei. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten entscheiden zu können, erhielten Ratten die Drogen vor oder nach intravenöser [³H]-Noradrenalin-Injektion; anschließend wurde die [³H]-Catecholamin-Menge im Herzen ermittelt^[52]. Reserpin, Amphetamin und Tyramin setzten den Gehalt an bereits gebundenem [³H]-Catecholamin herab. Imipramin (Abb. 6) und Chlorpromazin senkten dagegen die Konzentration von [³H]-Noradrenalin im Herzen nur dann, wenn sie vor dem [³H]-Noradrenalin appliziert wurden. Daraus geht hervor, daß diese Verbindungen die Aufnahme blockieren, aber das Amin nicht freisetzen. Amphetamin verringerte den Gehalt an [³H]-Noradrenalin stärker, wenn es vor dem [³H]-Noradrenalin als wenn es danach gegeben wurde (Abb. 6). Dies zeigte, daß es nicht nur die Aufnahme blockiert, sondern auch das Catecholamin freisetzt. Viele dieser Beobachtungen wurden durch direkte Sichtbarmachung des sympathischen Neurons mit Techniken der Fluoreszenzhistologie bestätigt und erweitert^[53].

[³H]-Noradrenalin wurde auch zur Messung der Wirkungen von Pharmaka hinsichtlich der Blockierung der spontanen Freisetzung der neuronalen Überträgersubstanz verwendet. Langwirkende Ganglienblocker (Chlorisondamin, Abb. 6) und Breylium hemmten die spontane [³H]-Noradrenalin-Freisetzung aus dem Rattenherz^[54, 55]. Durch Dezentralisation des oberen Cervikalganglions wurde die spontane [³H]-Noradrenalin-Freisetzung ebenfalls verlangsamt, was wieder zeigte, daß Nervenimpulse zur Freisetzung des [³H]-Noradrenalins führen^[54].

Aufnahme, Speicherung, Freisetzung und Stoffwechsel von [³H]-Noradrenalin im Rattenhirn

Vogt demonstrierte 1954 die Anwesenheit von Noradrenalin im Gehirn und zeigte, daß es ungleichmäßig verteilt ist^[56]. Pharmaka wie Amphetamin und Reserpin^[56-58] senkten die Konzentration an endogenem Noradrenalin im Gewebe, während Monoamin-Oxidase-Hemmer den Catecholamin-Spiegel erhöhten^[59]. Früher war es uns nicht möglich gewesen, die Verteilung von Noradrenalin im Gehirn zu untersuchen, da die Substanz die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreiten kann^[33]. 1964 entwickelte jedoch Jaques Glowinski eine Technik zur Einführung von [³H]-Noradrenalin in das Rattenhirn über die Seitenventrikel^[59]. Nunmehr ließen sich die Noradrenalin-Vorräte im Gehirn markieren; wir konnten so das Schicksal dieser Verbindung im Gehirn und die Wirkung von Pharmaka untersuchen. Wir prüften zunächst, ob sich dieses exogene [³H]-Noradrenalin mit dem endogenen Vorrat an Gehirn-Catecholaminen mischte. Dazu untersuchten wir zuerst die Verteilung von [³H]-Noradrenalin in verschiedenen Gehirnfeldern. Intraventrikulär injiziertes [³H]-Noradrenalin verteilte sich selektiv auf Bereiche mit hoher Catecholamin-Konzentration, wobei die höchsten Spiegel im Hypothalamus und die niedrigsten in der Großhirnrinde und im Kleinhirn auftraten^[60]. Wesentliche [³H]-Noradrenalin-Mengen kamen jedoch auch im Corpus striatum vor, das normalerweise viel Dopamin und wenig

endogenes Noradrenalin aufweist. Bei autoradiographischen Untersuchungen waren intensive Markierungen auch in den periventriculären und ventromedialen Kernen des Hypothalamus, im medialen Vorderhirnbündel, in spezifischen Bahnen des Rückenmarks und in der Schicht der apikalen Dendriten des Hippocampus zu beobachten. Die Untersuchung der subzellulären Verteilung durch Zentrifugieren im kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten ergab, daß [³H]-Noradrenalin nach intraventrikulärer Zuführung zum Gehirn in der Schicht der Synaptosomen (abgerissene Nervenendigungen) zusammen mit endogenem Noradrenalin^[61] vorlag. Diese Beobachtungen zeigten, daß das [³H]-Noradrenalin sich in beträchtlichem Maße mit den endogenen Catecholamin-Vorräten des Gehirns mischt. Das [³H]-Noradrenalin verblieb lange Zeit im Gehirn, wurde also offensichtlich gespeichert und vor dem Abbau geschützt. Als radioaktive Stoffwechselprodukte bildeten sich Normetanephrin und O-methylierte desaminierte Abbauprodukte. Das Hauptprodukt im Gehirn war [³H]-1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)glykol.

Tabelle 3. Antidepressive Pharmaka und Hemmung der [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in das Rattenhirn.

Behandlung	klinische antidepressive Wirkung	[³ H]-Noradrenalin g/Gehirn (Imp. min ⁻¹ × 1000)
Keine		30 ± 2.0
Imipramin	ja	19 ± 1.0 [a]
Desmethylimipramin	ja	19 ± 1.1 [a]
Amitriptylin	ja	23 ± 2.1 [b]
Verbindung 2	nein	30 ± 1.6
Verbindung 3	nein	28 ± 1.2
Chlorpromazin	nein	32 ± 3.1

[a] P < 0.0001.

[b] P < 0.05.

Gruppen von je sechs Ratten bekamen intraperitoneal die betreffenden Pharmaka (20 mg/kg) eine Stunde vor Zuführung von 0.07 µg [³H]-Noradrenalin in den Seitenventrikel des Gehirns. Verbindung 2 hat die gleiche Struktur wie Imipramin, aber eine Dimethylaminoisopropyl-statt der Dimethylaminopropyl-Seitenkette. Verbindung 3 hat die gleiche Struktur wie Chlorpromazin, aber eine Dimethylaminoäthoxy-statt der Dimethylaminopropyl-Seitenkette [63].

Die Markierung der Noradrenalin-Vorräte im Gehirn ermöglichte es, an Gehirnschnitten die Wirkung von Pharmaka auf die Aufnahme, die Speicherung, die Freisetzung und den Stoffwechsel von [³H]-Noradrenalin zu studieren^[42]. Imipramin und Chlorpromazin blockieren bekanntlich die [³H]-Noradrenalin-Aufnahme in intakte periphere Gewebe^[51] und in Gehirnschnitte^[42]. Im intakten Rattenhirn setzte Imipramin die Anreicherung von [³H]-Noradrenalin nach intraventrikulärer Injektion herab^[63], während Chlorpromazin diesen Effekt nicht hatte (Tab. 3). Andere antidepressive Pharmaka wie Desmethylimipramin und Amitriptylin verringerten die [³H]-Noradrenalin-Ablagerung im Gehirn, während strukturell verwandte Imipramin-Derivate, die klinisch als Antidepressiva unwirksam sind, keinen Effekt hatten. Monoamin-Oxidase-Hemmer sowie Imipramin sind Antidepressiva, die bewirken, daß mehr physiologisch aktives Noradrenalin mit den adrenergen Rezeptoren im Gehirn reagiert. Jede dieser Verbindungen macht das größere Noradrena-

lin-Angebot im Gehirn auf verschiedene Art verfügbar. Imipramin und andere tricyclische Antidepressiva verlangsamen die Inaktivierung durch Wiederaufnahme in das Neuron; Monoamin-Oxidase-Hemmer verhindern den Catecholamin-Abbau. Amphetamin hat mehrfache Wirkungen auf die Catecholamine im Gehirn^[62]: Wie tricyclische Antidepressiva blockiert es die Wiederaufnahme in das Neuron, verursacht die Freisetzung gespeicherten Catecholamins und hemmt die Monoamin-Oxidase. Nach Amphetamin-Zuführung steigert sich die Bildung von [³H]-Normetanephrin im Gehirn, während Reserpin eine Zunahme der desaminierten Stoffwechselprodukte verursacht. Diese Änderungen des Stoffwechsels spiegeln eine Freisetzung von physiologisch aktivem Noradrenalin aus dem Neuron durch Amphetamin und eine Freisetzung von inaktiven Stoffwechselprodukten durch Reserpin wider.

Glowinski und Iversen untersuchten den Noradrenalin-Stoffwechsel in verschiedenen Gehirngebieten. Sie fanden, daß alle Gehirnregionen mit Ausnahme des Striatum Dopamin in Noradrenalin umwandeln können^[64]. Amphet-

talysator dient beim ersten Schritt das Enzym Tyrosin-Hydroxylase^[67], beim zweiten Dopa-Decarboxylase^[68] und beim dritten Dopamin- β -Oxidase^[69]. Diese Reaktionen finden in der sympathischen Nervenendigung statt. Der letzte Schritt wird durch Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase katalysiert und spielt sich fast ausschließlich im Nebennierenmark ab^[30]. In der Nebenniere sind die biosynthetischen Enzyme Tyrosin-Hydroxylase, Dopamin- β -Oxidase und Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase fast nur auf das Nebennierenmark beschränkt.

Das Noradrenalin in den sympathischen Nerven und die Catecholamine (Noradrenalin und Adrenalin) in Nebennierenmark befinden sich ständig im Fluß. Sie werden fortlaufend freigesetzt, metabolisiert und synthetisiert, halten sich jedoch im Gewebe auf einem erstaunlich konstanten Wert. Neuere Arbeiten in unserem Laboratorium und von anderen Forschern enthüllten mehrere Prozesse, die die Biosynthese von Catecholaminen regulieren, darunter langfristige hormonelle wie auch kurz- und langfristige neuronale Regulationen.

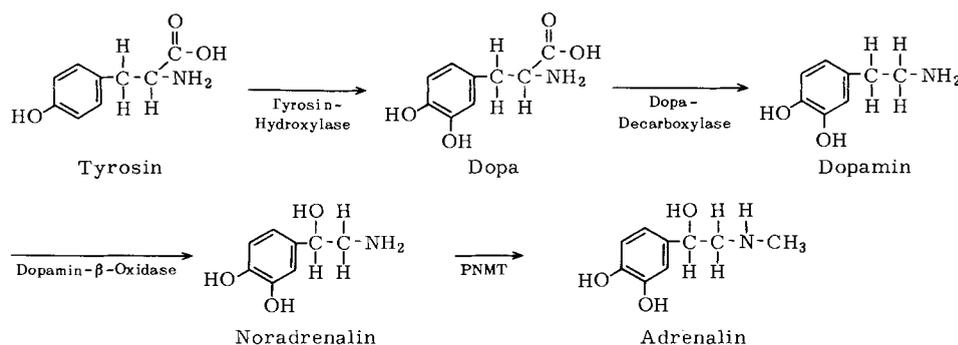


Abb. 7. Biosynthese der Catecholamine. PNMT bedeutet Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase.

amin blockierte die Wiederaufnahme von Noradrenalin in allen Gehirnregionen, während Desmethylimipramin die Aufnahme im Kleinhirn, der Medulla oblongata und im Hypothalamus hemmte, jedoch nicht im Corpus striatum^[62]. Um die Umsatzgeschwindigkeiten (Turnover) des Gehirn-Noradrenalins zu bestimmen, wurden verschiedenartige experimentelle Möglichkeiten ausgewählt. Es wurde ermittelt, wie schnell endogenes Noradrenalin nach Hemmung der Catecholamin-Biosynthese, aus [³H]-Dopamin gebildetes [³H]-Noradrenalin und [³H]-Noradrenalin nach intraventrikulärer Injektion verschwinden. Die mit diesen Methoden gewonnenen Ergebnisse stimmten gut miteinander überein. Im Kleinhirn war der Umsatz am schnellsten, in der Medulla oblongata und im Hypothalamus am langsamsten^[65]. Spätere Arbeiten haben mit diesen Methoden bewiesen, daß der Umsatz von Gehirn-Noradrenalin durch Belastungen aller Art, Temperaturänderungen und Schlaf verändert wird.

Regulation der Catecholamin-Biosynthese

Die Catecholamine werden wie in Abbildung 7 dargestellt synthetisiert. Dieser biosynthetische Aufbau wurde zuerst von Blaschko 1939 vorgeschlagen^[66] und schließlich von Udenfriend und seinen Mitarbeitern bewiesen^[67]. Als Ka-

Hormonelle Regulation

Bei Spezies wie dem Hundshai, bei denen das chromaffine Gewebe außerhalb der Nebenniere liegt, kommt wenig oder kein Adrenalin vor^[70]. Bei Spezies, bei denen das Mark vollständig dem Cortex angelagert ist (Mensch und Ratte), ist als Catecholamin fast nur Adrenalin vorhanden. Dies ließ Wurtman und mich^[71] auf den Gedanken kommen, daß der adrenale Cortex eventuell die Aktivität des adrenalin-bildenden Enzyms Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase beeinflusst. Ich hatte bereits über die Eigenschaften dieses Enzyms gearbeitet und ein empfindliches und spezifisches Testverfahren zu seiner Bestimmung entwickelt^[30]. In der ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung der Hypophysektomie auf die Phenyläthanolamin-*N*-Methyltransferase in der Nebenniere gemessen^[71]. Bei hypophysektomierten Ratten nahm die Aktivität des adrenalin-bildenden Enzyms stetig ab, bis nur noch ca. 20% der anfänglichen Konzentration vorhanden waren (Abb. 8). Eine tägliche Gabe von ACTH (Abb. 8) oder eine Zufuhr von Dexamethason über 21 Tage brachte bei hypophysektomierten Ratten die Enzymaktivität wieder auf ihren normalen Stand. Um zu untersuchen, ob die durch Corticoide induzierte Zunahme von PNMT auf eine verstärkte Synthese von neuem Enzymprotein zurückzuführen war, wurde Dexamethason Ratten gegeben, deren

RNA-abhängige Protein-Synthese durch Puromycin oder Actinomycin D gehemmt worden war. Beide Hemmer der Protein-Synthese verhinderten einen Anstieg der durch Dexamethason verursachten Enzymaktivität. Wiederholte

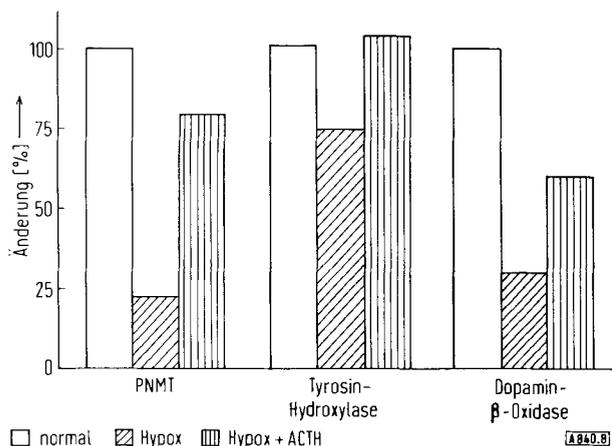


Abb. 8. Regulation der enzymatischen Adrenalin-Synthese im Nebennierenmark durch ACTH. Der Gehalt an Phenyläthanolamin-N-Methyltransferase (PNMT [71] und Dopamin-β-Oxidase [73] wurde 21 Tage nach Hypophysektomie, der Gehalt an Tyrosin-Hydroxylase fünf Tage nach Hypophysektomie [72] gemessen. Nach Hypophysektomie (Hypox) wurde sechs Tage lang täglich ACTH gegeben.

Gaben von ACTH oder Dexamethason an intakte Ratten ließ die adrenale PNMT-Aktivität jedoch nicht über normale Werte ansteigen.

Angesichts der Wirkung einer Hypophysektomie auf die adrenale PNMT-Aktivität wurde die Wirkung anderer an der Catecholamin-Biosynthese beteiligter Enzyme untersucht. Nach Hypophysektomie nahm die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase aus der Nebenniere ab^[72] (Abb. 8). Die Enzymaktivität wurde innerhalb von fünf Tagen (Abb. 8) um 25% und innerhalb von zehn Tagen auf ungefähr die Hälfte reduziert. Wiederholte Zufuhr von ACTH brachte bei hypophysektomierten Ratten (Abb. 8) die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase wieder auf normale Werte. Anders als bei PNMT erhöhte Dexamethason bei hypophysektomierten Ratten nicht die Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität. Auch in diesem Fall steigerten wiederholte Gaben großer Mengen ACTH bei normalen Ratten nicht die adrenale Tyrosin-Hydroxylase.

Auch die Aktivität von Dopamin-β-Oxidase (dem Enzym, das Dopamin in Noradrenalin umwandelt) wurde bei hypophysektomierten Ratten untersucht^[73]. Nach 21 Tagen nimmt die Aktivität dieses Enzyms auf ungefähr 30% seines Normalwertes ab (Abb. 8). Eine ACTH-Zufuhr über fünf Tage erhöhte die Dopamin-β-Oxidase-Aktivität, jedoch wurde innerhalb dieser Zeit die volle Aktivität nicht erreicht. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß zur normalen Bereitstellung von catecholamin-biosynthetisierenden Enzymen in den Nebennieren ACTH notwendig ist.

Neuronale Regulation

Die Catecholamin-Biosynthese in den sympathischen Nerven und in der Nebenniere steht unter scharfer Kontrolle durch neuronale Mechanismen, von denen einer schnell und der andere langsam wirkt. Nach fortgesetzter Reizung des

Nervus splanchnicus ist die Summe aus freigesetztem und in der Drüse verbliebenem Catecholamin größer als die anfänglich in der Drüse vorhandene Menge^[74]. Dies ließ darauf schließen, daß Nervenimpulse die Catecholamin-Biosynthese steigern. *Weiner* und seine Mitarbeiter zeigten an einem isolierten Präparat des hypogastrischen Nerven des Vas deferens, daß die Reizung eine verstärkte Synthese von [¹⁴C]-Noradrenalin aus [¹⁴C]-Tyrosin zur Folge hatte, jedoch nicht aus [¹⁴C]-Dopa^[75]. Sie stellten ferner fest, daß der Zusatz von Noradrenalin eine Zunahme der [¹⁴C]-Catecholaminbildung aus [¹⁴C]-Tyrosin verhinderte. Die Reizung des Vas deferens änderte jedoch nicht die Gesamtmenge an Noradrenalin oder Tyrosin-Hydroxylase in vitro. Die Tatsache, daß Noradrenalin die Umwandlung von [¹⁴C]-Tyrosin in Noradrenalin hemmen kann, wies auf eine schnelle Rückkopplungshemmung auf der Stufe der Tyrosin-Hydroxylase hin.

Eine andere Art der Regulierung der Catecholamin-Biosynthese wurde auf unerwartete Weise entdeckt. *Tranzer* und *Thoenen* berichteten, daß 6-Hydroxydopamin selektiv sympathische Nervenendigungen zerstört^[76]. *Thoenen* beschloß, ein Forschungs-Freijahr in meinem Laboratorium zuzubringen. Zusammen mit *Mueller* untersuchten wir die Wirkung der chemischen Zerstörung von sympathischen Nervenendigungen durch 6-Hydroxydopamin auf das Biosynthese-Enzym Tyrosin-Hydroxylase. Wie erwartet verschwanden die Enzyme vollständig innerhalb von zwei Tagen nach Zufuhr von 6-Hydroxydopamin^[77]. Bei einer Untersuchung der Nebenniere zeigte sich jedoch eine starke Zunahme der Tyrosin-Hydroxylase. Da 6-Hydroxydopamin den Blutdruck senkt, könnte die durch diese Verbin-

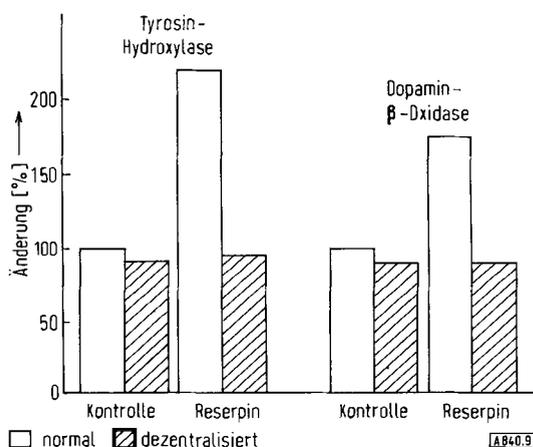


Abb. 9. Transsynaptische Induktion noradrenalin-synthetisierender Enzyme. Das rechte oder das linke obere Cervicalganglion wurde durch Durchtrennung des präganglionären Stammes dezentralisiert. Nach zwei bis sechs Tagen wurde 24 Stunden vor der Bestimmung der Tyrosin-Hydroxylase in den innervierten und den dezentralisierten Ganglien Reserpin (5 mg/kg) gegeben [78]. Bei den Versuchen mit Dopamin-β-Oxidase wurde Reserpin (2.5 mg/kg) dreimal jeden zweiten Tag gegeben und das Enzym am siebenten Tag nach der Dezentralisation bestimmt [83].

dung bedingte Zunahme der Enzymaktivität durch eine reflektorische Zunahme der sympathikus-gesteuerten Nebennierenaktivität bedingt sein. Folglich untersuchten wir die Wirkung von Reserpin, das bekanntlich den Blutdruck senkt und die Aktivität der präganglionären Nerven er-

höht. Reserpin erzeugte für mehrere Tage eine kräftige Zunahme der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität in der Nebenniere von Ratten und einigen anderen Tierarten sowie im oberen Cervikalganglion (Abb. 9) und im Stammhirn des Kaninchens^[78,79]. Der adrenerge Blocker Phenoxybenzamin verursachte ebenfalls eine reflektorische Zunahme der sympathischen Nebennierenaktivität. wiederum resultierte die Zuführung dieser Verbindung in einer Erhöhung der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität in der Nebenniere.

Um festzustellen, ob die erhöhte Enzymaktivität durch die Bildung neuer Enzymmoleküle verursacht wird, wurde die Protein-Synthese vor der Zuführung der Pharmaka gehemmt. Die Hemmung der Protein-Synthese entweder durch Cyclohexamid oder Actinomycin D verhinderte die durch Pharmaka induzierte Zunahme der Tyrosin-Hydroxylase in der Nebenniere und in den Ganglien^[80]. Die wahrscheinlichsten Ursachen für die Zunahme der Enzymaktivität könnten entweder ein Faktor im Blut wie bei der Induktion von PNMT durch ACTH oder eine Zunahme der Aktivität der präganglionären Neuronen sein. Um diese letztgenannte Möglichkeit zu untersuchen, durchschnitten wir einseitig den die Nebenniere versorgenden Nervus splanchnicus^[81] sowie zum oberen Cervikalganglion führende präganglionäre Fasern und applizierten danach Reserpin^[78]. Dieses Pharmakon verursachte den erwarteten Anstieg der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität auf der innervierten Seite und verhinderte außerdem die Abnahme der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität auf der denervierten Seite (Abb. 9). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Zunahme der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität die Folge einer transsynaptischen Induktion des Enzyms ist. Untersuchungen über die molekularen Mechanismen, die diese Induktion über die Nerven hinweg verursachen, waren bis jetzt erfolglos. Die durch den Nerven vermittelte Induktion von Tyrosin-Hydroxylase nach Reserpingabe wird auch sowohl an den Nervenendigungen als auch im Zellkörper beobachtet. Die Zunahme der Tyrosin-Hydroxylase in den Nervenendigungen ist jedoch gegenüber der in den Ganglien um zwei bis drei Tage verzögert^[82]. Versuche mit Hemmstoffen der Protein-Synthese weisen eher auf eine lokale Bildung induzierter Tyrosin-Hydroxylase in den Nervenendigungen hin als auf einen Transport des fertigen Enzyms in die Peripherie.

In Zusammenarbeit mit *Molinoff*, *Weinshilbom* und *Brimijoin*^[83] wurden ähnliche Versuche über die Induktion von Dopamin- β -Oxidase angestellt, einem Enzym, das in Noradrenalin-Speichergranula vorkommt. Diese Versuche wurden durch die Entwicklung eines sehr empfindlichen Bestimmungsverfahrens für Dopamin- β -Oxidase möglich. Das Enzym konnte nunmehr an Stellen nachgewiesen werden, an denen es früher nie gefunden worden war. Wiederholte Reserpin-Zufuhr verursachte eine kräftige Zunahme der Dopamin- β -Oxidase im Ganglion stellatum und den oberen Cervikalganglien (Abb. 9), in den Nervenendigungen sowie im Nebennierenmark der Ratte. Die Zunahme der Dopamin- β -Oxidase in sympathischen Ganglien wurde durch Protein-Synthese-Hemmer oder durch chirurgische Dezentralisation verhindert (Abb. 9). Kürzlich haben wir festgestellt, daß Dopamin- β -Oxidase im menschlichen Plasma und dem anderer Säugetierarten vorkommt^[84].

Vorläufige Experimente legen nahe, daß die zirkulierende Dopamin- β -Oxidase aus sympathischen Nervenendigungen kommt. Nach Reserpin-Zufuhr nahm auch die PNMT-Aktivität in der Nebenniere zu; diese Zunahme wurde durch Unterbrechung des Nervus splanchnicus verhindert^[85].

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung, die den Catecholaminen für die Erklärung von Verhaltensänderungen beigemessen wird, untersuchten wir die Wirkungen von psychosozialem Reizentzug oder von Reizvermehrung auf die Biosynthese-Enzyme Tyrosin-Hydroxylase und PNMT^[86]. In einem speziellen Käfigsystem wurde eine Gruppe von Mäusen gegen visuellen Kontakt isoliert, während eine andere erhöhter sozialer Stimulation ausgesetzt wurde. Nach sechs Monaten stellte man bei den isolierten Mäusen eine kräftige Abnahme der adrenalen Tyrosin-Hydroxylase- und der PNMT-Aktivität fest, während die Aktivität beider Enzyme bei den stimulierten Mäusen erhöht war. In ähnlichen Versuchen wurde auch im Laboratorium von *Kopin* festgestellt, daß eine längere zwangsweise Immobilisierung von Ratten ebenfalls einen Aktivierungsanstieg der adrenalen Tyrosin-Hydroxylase und des PNMT hervorruft und diese Zunahme durch Unterbrechung des Nervus splanchnicus zur Nebenniere beseitigt wird^[87]. Alle diese Ergebnisse legen nahe, daß die Zunahme der catecholamin-bildenden Enzyme unter andauerndem Streß neuronal vermittelt wird und daß diese Reaktion nicht sofort eintritt, wie das bei der schnellen Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin im Zustand der Wut, Furcht oder Aggression der Fall ist.

Noradrenalin als neurochemischer „Wandler“ in der Zirbeldrüse

Die Zirbeldrüse ist außerordentlich reich an sympathischen Nervenfasern, die in den oberen Cervikalganglien entspringen^[88]. Dieses Organ hat die einzigartige Fähigkeit, das Hormon Melatonin (5-Methoxy-tryptamin) wie folgt zu synthetisieren: Tryptophan \rightarrow 5-Hydroxy-tryptophan \rightarrow Serotonin \rightarrow *N*-Acetyl-serotonin \rightarrow Melatonin^[89]. Ein Jahr bevor *Lerner* das Melatonin entdeckte^[90], fanden wir ein *O*-methylierendes Enzym, das COMT^[7]. Dies regte die Suche nach dem Enzym an, das Indole unter Bildung von Melatonin *O*-methyliert. Solch ein Enzym wurde in der Zirbeldrüse gefunden und Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase genannt^[29]. Das Enzym *O*-methyliert *N*-Acetylserotonin zu Melatonin, wobei *S*-Adenosylmethionin als Methylendonor dient. Ungefähr zur selben Zeit wurde das Enzym beschrieben, welches Serotonin zu *N*-Acetylserotonin acetyliert (*N*-Acetyltransferase)^[91]. In der Folge erwies es sich, daß dieses Enzym eine Schlüsselstellung im adrenergen Nervensystem bei der Regulation der Melatonin-Biosynthese innehat.

Die Ansicht, daß Licht eine Wirkung auf die Zirbeldrüse ausübt, wurde 1961 von *Fiske* geäußert, als sie feststellte, daß Tierhaltung bei fortdauernder Belichtung das Gewicht des Organs verändert^[92]. Folglich wurden Ratten dauernder Dunkelheit oder dauerndem Licht ausgesetzt; in der Zirbeldrüse wurde die Aktivität des melatonin-bildenden

Enzyms Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase gemessen^[93]. Nach andauernder Dunkelheit war die Aktivität der Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase in der Zirbeldrüse mehr als doppelt so groß wie nach fortdauernder Belichtung. Die Entfernung der oberen Cervikalganglien beseitigte diesen Unterschied der Enzymaktivität^[94]. Da Noradrenalin als Überträgerstoff in den sympathischen Nerven dient, könnte es der Wirkstoff sein, der die Melatonin-Synthese reguliert. Diese Deutung wird durch den Nachweis gestützt, daß der Noradrenalin-Spiegel in der Zirbeldrüse stark durch die Helligkeit der Umgebung beeinflusst wird^[95].

Als Technik zur Untersuchung, wie der Überträgerstoff im Nerven die Melatonin-Synthese (die außerhalb des Neurons stattfindet) beeinflussen kann, bot sich die Verwendung von Zirbeldrüsen in Organkultur an. Hauptsächlich, dank der Anstrengungen von *Shein*, gelang es uns, Zirbeldrüsen in Organkultur zu halten. Die Zirbeldrüse in Organkultur konnte alle Schritte der Bildung von Melatonin aus Tryptophan ausführen^[96]. Eine Hemmung der Protein-Synthese unterbrach die Umwandlung von Tryptophan in Melatonin völlig, was auf die Bildung neuen Enzymproteins hinwies. Ein Zusatz von Noradrenalin zum Kulturmedium verursachte innerhalb von 24 Stunden eine starke Zunahme der Melatonin-, jedoch nicht der Serotoninbildung aus Tryptophan^[97] (Abb. 10). Noradrenalin

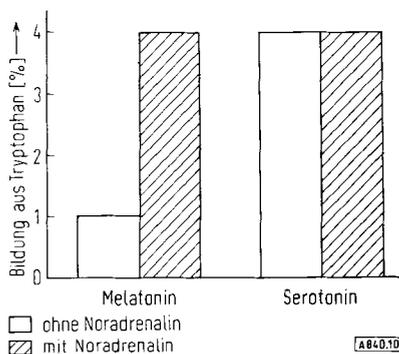


Abb. 10. Anregung der Melatonin-Synthese in der Zirbeldrüse durch Noradrenalin. Kulturröhrchen mit Zirbeldrüsen-gewebe von Ratten wurden mit [¹⁴C]-Tryptophan in Abwesenheit oder Anwesenheit von Noradrenalin ($3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden in den Zirbeldrüsenkulturen [¹⁴C]-Serotonin und [¹⁴C]-Melatonin bestimmt [97].

hatte jedoch nur einen begrenzten Effekt auf die Aktivität von Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase. *Klein et al.* untersuchten das Enzym, das in Zirbeldrüsen-Organ-kulturen Serotonin in *N*-Acetyl-serotonin umwandelt. Er fand, daß Noradrenalin die Aktivität dieses Enzyms bemerkenswert steigert^[98]. Sobald aber die Protein-Synthese blockiert wurde, regte Noradrenalin die Bildung der *N*-Acetyltransferase nicht mehr an. Diese Ergebnisse zeigen, daß aus sympathischen Nerven freigesetztes Noradrenalin die Bildung des Zirbeldrüsenhormons Melatonin anregt, indem es spezifisch die Synthese neuer Moleküle der *N*-Acetyltransferase hervorruft.

Seit *Otto Loewi*^[99] nachgewiesen hat, daß die sympathischen Nerven ihre Wirkung durch Freisetzung eines chemischen Stoffes erzielen, sind zahlreiche Fortschritte gemacht worden. Der Überträgerstoff im Nerven ist als Noradrenalin identifiziert und seine Biosynthese, sein Stoffwechsel und seine Inaktivierung sind weitgehend geklärt worden. Obwohl die komplexen Zusammenhänge bei der Speicherung und der Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin sowie bei der Regulation ihrer Biosynthese teilweise aufgedeckt worden sind, bleibt noch viel zu tun übrig. Unser Verständnis der zentralen adrenergen Mechanismen befindet sich noch am Anfang, verspricht aber eine rasche Weiterentwicklung. Es wurde weiter gezeigt, daß Pharmaka, die bei der Behandlung von affektiven Störungen sowie neurologischen und kardiovaskulären Krankheiten therapeutisch wirksam sind, ebenfalls Aufnahme, Speicherung, Freisetzung, Bildung und Abbau der Catecholamine beeinflussen. Diese Befunde, die sich auf das periphere und zentrale sympathische Nervensystem beziehen, haben einen Einblick in die Ursachen von psychischen Depressionen^[100], Parkinsonscher Krankheit^[101] und Hypertension^[102] gewährt und Möglichkeiten zu ihrer Behandlung eröffnet.

Dank

Für ihre entscheidende Hilfe bei vielen dieser Untersuchungen danke ich den vielen Kollegen, die ständig oder als Gäste mit mir zusammenarbeiteten. Ich bin dem National Institute of Mental Health und den National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, dankbar für großzügige Unterstützung, ausgezeichnete Hilfsmittel und eine anregende Atmosphäre.

Eingegangen am 15. Februar 1971 [A 840]

- [1] *U. S. von Euler*, Acta Physiol. Scand. 12, 73 (1946).
- [2] *U. S. von Euler* u. *T. Floding*, Acta Physiol. Scand. 33, Suppl. 118, 57 (1955).
- [3] *J. Axelrod*, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 110, 315 (1954).
- [4] *J. Axelrod*, J. Biol. Chem. 214, 753 (1955).
- [5] *M. D. Armstrong*, *A. McMillan* u. *K. N. F. Shaw*, Biochim. Biophys. Acta 25, 422 (1957).
- [6] *G. L. Cantoni*, J. Biol. Chem. 189, 203 (1951).
- [7] *J. Axelrod*, Science 126, 400 (1957).
- [8] *J. Axelrod*, *S. Senoh* u. *B. Witkop*, J. Biol. Chem. 233, 697 (1958).
- [9] *J. Axelrod* u. *R. Tomchick*, J. Biol. Chem. 233, 702 (1958).
- [10] *S. Senoh*, *J. Daly*, *J. Axelrod* u. *B. Witkop*, J. Amer. Chem. Soc. 81, 6240 (1959).
- [11] *M. Assicot* u. *C. Bohuon*, Europ. J. Biochem. 12, 490 (1970).
- [12] *J. Axelrod* u. *E. S. Vesell*, Mol. Pharmacol. 6, 78 (1970).
- [13] *J. Axelrod* u. *M. J. LaRoche*, Science 130, 800 (1959).
- [14] *V. R. Knuppen*, *M. Höller*, *D. Tilmann* u. *H. Breuer*, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 1301 (1969).
- [15] *B. Belleau* u. *J. Burba*, J. Med. Chem. 6, 755 (1963).
- [16] *D. W. Wylie*, *S. Archer* u. *A. Arnold*, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 130, 239 (1961).
- [17] *J. D. Mann*, *H. M. Fales* u. *H. S. Mudd*, J. Biol. Chem. 238, 3820 (1963).
- [18] *J. Axelrod*, *W. Albers* u. *C. D. Clemente*, J. Neurochem. 5, 68 (1959).
- [19] *G. J. Traiger* u. *D. N. Calvert*, Biochem. Pharmacol. 18, 109 (1969).

- [20] J. K. Inscoc, J. Daly u. J. Axelrod, *Biochem. Pharmacol.* 14, 1257 (1965).
- [21] J. Axelrod, *Pharmacol. Rev.* 18, 95 (1966).
- [22] B. Jarrot u. L. Iversen, *J. Neurochem.*, im Druck.
- [23] I. J. Kopin, *Pharmacol. Rev.* 16, 179 (1964).
- [24] J. A. Levin u. R. F. Furchgott, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 172, 310 (1970).
- [25] A. J. Eisenfeld, I. Landsberg u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 158, 378 (1967).
- [26] J. Axelrod u. C. K. Cohn, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, im Druck.
- [27] C. K. Cohn, D. Dunner u. J. Axelrod, *Science*, im Druck.
- [28] D. D. Brown, R. Tomchick u. J. Axelrod, *J. Biol. Chem.* 234, 2948 (1959).
- [29] J. Axelrod u. H. Weissbach, *J. Biol. Chem.* 236, 211 (1961).
- [30] J. Axelrod, *J. Biol. Chem.* 237, 1657 (1962).
- [31] J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 138, 28 (1962).
- [32] J. Axelrod, H. Weil-Malherbe u. R. Tomchick, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 127, 251 (1959).
- [33] L. G. Whitby, J. Axelrod u. H. Weil-Malherbe, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 132, 193 (1961).
- [34] G. Hertting, J. Axelrod, I. J. Kopin u. L. G. Whitby, *Nature* 189, 66 (1961).
- [35] D. E. Wolfe, L. T. Potter, K. C. Richardson u. J. Axelrod, *Science* 138, 440 (1962).
- [36] L. T. Potter u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 140, 199 (1963).
- [37] L. T. Potter u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 142, 291 (1963).
- [38] U. S. von Euler u. N.-A. Hillarp, *Nature* 177, 44 (1956).
- [39] G. Hertting u. J. Axelrod, *Nature* 192, 172 (1961).
- [40] G. L. Brown u. J. S. Gillespie, *J. Physiol.* 138, 81 (1957).
- [41] S. Rosell, I. J. Kopin u. J. Axelrod, *Amer. J. Physiol.* 205, 317 (1963).
- [42] H. J. Dengler, I. A. Michaelson, H. E. Spiegel u. E. Titus, *Intern. J. Neuropharmacol.* 1, 23 (1962).
- [43] L. L. Iversen: *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves.* Cambridge University Press 1967.
- [44] A. J. Eisenfeld, J. Axelrod u. L. R. Krakoff, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 156, 107 (1967).
- [45] J. S. Gillespie, D. N. H. Hamilton u. R. J. A. Hosie, *J. Physiol.* 206, 563 (1970).
- [46] L. L. Iversen, *Brit. J. Pharmacol.* 25, 18 (1965).
- [47] S. L. Lightman u. L. L. Iversen, *Brit. J. Pharmacol.* 37, 638 (1969).
- [48] J. Axelrod u. R. Tomchick, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 130, 367 (1960).
- [49] L. G. Whitby, G. Hertting u. J. Axelrod, *Nature* 187, 604 (1960).
- [50] J. Axelrod, L. G. Whitby u. G. Hertting, *Science* 133, 383 (1961).
- [51] G. Hertting, J. Axelrod u. L. G. Whitby, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 134, 146 (1961).
- [52] J. Axelrod, G. Hertting u. L. Potter, *Nature* 194, 297 (1962).
- [53] T. Malmfors, *Acta Physiol. Scand.* 64, Suppl. 248, 1 (1965).
- [54] G. Hertting, L. T. Potter u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 136, 289 (1962).
- [55] G. Hertting, J. Axelrod u. R. W. Patrick, *Brit. J. Pharmacol.* 18, 161 (1962).
- [56] M. Vogt, *J. Physiol.* 123, 451 (1954).
- [57] A. Carlsson, E. Rosengren, A. Bertler u. J. Nilsson in S. Garrafini u. V. Ghetti: *Psychotropic Drugs.* Elsevier, Amsterdam 1957.
- [58] B. B. Brodie, S. Spector u. P. A. Shore, *Ann. New York Acad. Sci.* 80, 609 (1959).
- [59] J. Glowinski, I. J. Kopin u. J. Axelrod, *J. Neurochem.* 12, 25 (1965).
- [60] J. Glowinski u. J. Axelrod, *Pharmacol. Rev.* 18, 775 (1966).
- [61] J. Glowinski, S. H. Snyder u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 152, 282 (1966).
- [62] J. Glowinski, J. Axelrod u. L. L. Iversen, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 153, 30 (1966).
- [63] J. Glowinski u. J. Axelrod, *Nature* 204, 1318 (1964).
- [64] J. Glowinski u. L. L. Iversen, *J. Neurochem.* 13, 655 (1966).
- [65] L. L. Iversen u. J. Glowinski, *J. Neurochem.* 13, 671 (1966).
- [66] H. Blaschko, *J. Physiol.* 96, 50 P (1939).
- [67] T. Nagatsu, M. Levitt u. S. Udenfriend, *J. Biol. Chem.* 239, 2910 (1964).
- [68] P. Holtz, R. Heise u. K. Ludtke, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* 191, 87 (1938).
- [69] S. Kaufman u. S. Friedman, *Pharmacol. Rev.* 17, 71 (1965).
- [70] R. E. Coupland, *J. Endocrinology* 9, 194 (1953).
- [71] R. J. Wurtman u. J. Axelrod, *J. Biol. Chem.* 241, 2301 (1966).
- [72] R. A. Mueller, H. Thoenen u. J. Axelrod, *Endocrinology* 86, 751 (1970).
- [73] R. Weinshilboun u. J. Axelrod, *Endocrinology* 87, 894 (1970).
- [74] S. Bygdeman u. U. S. von Euler, *Acta Physiol. Scand.* 44, 375 (1958).
- [75] N. Weiner u. M. Rabadjija, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 160, 61 (1968).
- [76] J. B. Tranzer u. H. Thoenen, *Experientia* 24, 155 (1968).
- [77] R. A. Mueller, H. Thoenen u. J. Axelrod, *Science* 163, 468 (1969).
- [78] H. Thoenen, R. A. Mueller u. J. Axelrod, *Nature* 221, 1264 (1969).
- [79] R. A. Mueller, H. Thoenen u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 169, 74 (1969).
- [80] R. A. Mueller, H. Thoenen u. J. Axelrod, *Mol. Pharmacol.* 5, 463 (1969).
- [81] H. Thoenen, R. A. Mueller u. J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 169, 249 (1969).
- [82] H. Thoenen, R. A. Mueller u. J. Axelrod, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 65, 58 (1970).
- [83] P. B. Molinoff, W. S. Brimjoin, R. M. Weinshilboun u. J. Axelrod, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 66, 453 (1970).
- [84] R. M. Weinshilboun u. J. Axelrod, *The Pharmacologist* 12, 214 (1970).
- [85] H. Thoenen, R. A. Mueller u. J. Axelrod, *Biochem. Pharmacol.* 19, 669 (1970).
- [86] J. Axelrod, R. A. Mueller, J. P. Henry u. P. M. Stephens, *Nature* 22, 1059 (1970).
- [87] R. Kvetnansky, V. K. Weise u. I. J. Kopin, *Endocrinology* 87, 744 (1970).
- [88] J. A. Kappers, *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 52, 163 (1960).
- [89] R. Wurtman, J. Axelrod u. D.-E. Kelly: *The Pineal.* Academic Press, New York 1968.
- [90] A. B. Lerner, J. D. Case u. R. V. Heinzelman, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 2587 (1958).
- [91] H. Weissbach, B. G. Redfield u. J. Axelrod, *Biochim. Biophys. Acta* 54, 190 (1961).
- [92] V. M. Fiske, K. Bryant u. J. Putnam, *Endocrinology* 66, 489 (1960).
- [93] R. J. Wurtman, J. Axelrod u. L. S. Phillips, *Science* 142, 1071 (1963).
- [94] R. J. Wurtman, J. Axelrod, E. W. Chu u. J. E. Fischer, *Endocrinology* 75, 226 (1964).
- [95] R. J. Wurtman, J. Axelrod, G. Sedvall u. R. Y. Moore, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 157, 487 (1967).
- [96] R. J. Wurtman, F. Larin, J. Axelrod u. H. M. Shein, *Nature* 217, 953 (1968).
- [97] J. Axelrod, H. M. Shein u. R. J. Wurtman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 62, 544 (1969).
- [98] D. C. Klein u. J. Weller, *Fed. Proc.* 29, 615 (1970).
- [99] O. Loewi, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 189, 239 (1921).
- [100] J. J. Schildkraut u. S. S. Kety, *Science* 156, 21 (1967).
- [101] O. Hornykiewicz, *Pharmacol. Rev.* 18, 929 (1966).
- [102] J. de Champlain, L. R. Krakoff u. J. Axelrod, *Circulation Res.* 24, Suppl. 1, 75 (1969).