

BBA 63252

Eine Methode zur Bestimmung der Dekarboxylase aromatischer Aminosäuren

Zur Aktivitätsbestimmung der Dekarboxylase aromatischer Aminosäuren wurde bisher das gebildete CO₂ manometrisch oder das Amin nach chromatografischer Abtrennung photometrisch bzw. fluorometrisch gemessen¹⁻³. Bei eigenen Untersuchungen erwies sich die photometrische Methode als nicht empfindlich genug. Es ergab sich, dass die Amine als 2,4,6-Trinitrophenyl(TNP)-Derivate gut bestimmt werden konnten.

Die enzymatische Aktivität wurde im Lebergewebe von Mäusen gemessen. Die Aufarbeitung des Gewebes wurde früher beschrieben⁵.

Der enzymatische Testansatz enthielt 40 mM Tris-HCl Puffer (pH 8.5), 1 mM Isopropylisonikotinsäurehydrazid, 0.5 mM Pyridoxal-5'-phosphat und 1.5 mM DL-5-Hydroxytryptophan (0.75 mM L-5-Hydroxytryptophan ergab den gleichen Umsatz) bzw. 0.75 mM L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA). Es wurde 30 min bei 37° inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 2.5 ml. Die Reaktion wurde durch 2.5 ml 8%ige Überchlorsäure gestoppt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand neutralisiert (pH 6-7).

Ein aliquoter Anteil wurde darauf in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.5) mit 3.4 mM 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNB⁴) 20 min bei 40° inkubiert (Gesamtvolumen 5 ml). Die gebildeten TNP-Amine wurden mit 5 ml Benzol extrahiert und die Absorption bei 340 mμ gemessen.

Die TNBS reagiert ebenfalls mit den Aminogruppen der Aminosäuren⁴. Die TNP-Amine werden unter den beschriebenen Bedingungen jedoch quantitativ von den TNP-Aminosäuren getrennt. Auf Grund der starken Absorption der TNP-

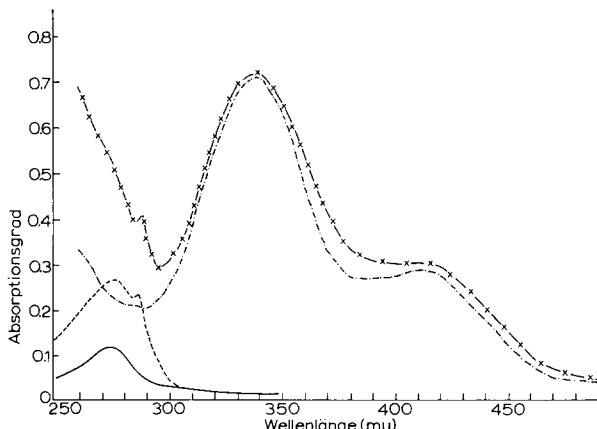


Abb. 1. Absorptionsspektren des N-TNP-5-Hydroxytryptamins (×—×) und N-TNP-Dopamins (······) in Benzol sowie des 5-Hydroxytryptamins und Dopamins in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.5). Die Konzentration betrug in allen Fällen $6.5 \cdot 10^{-5}$ M.

Abkürzungen: TNP, 2,4,6-Trinitrophenyl; DOPA, L-Dihydroxyphenylalanin; TNBS, 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure.

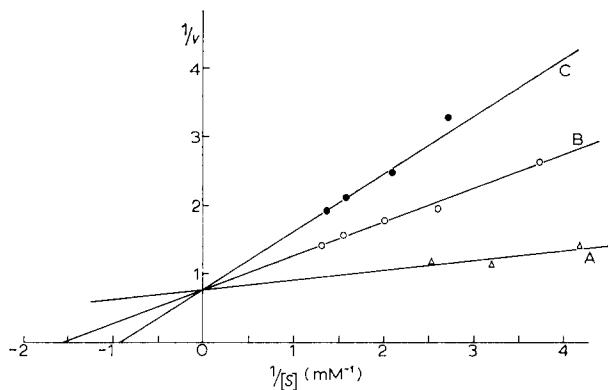


Abb. 2. Hemmung der 5-Hydroxytryptophan-Dekarboxylierung des Enzympräparates aus Mäuseleber durch DOPA, aufgetragen nach Lineweaver-Burk. A, ohne Zusatz von DOPA; B, $3.7 \cdot 10^{-4}$ M DOPA; C, $7.4 \cdot 10^{-4}$ M DOPA.

Derivate bei $340 \text{ m}\mu$, der molare Extinktionskoeffizient beträgt für N-TNP-5-Hydroxytryptamin $1.28 \cdot 10^4$ und N-TNP-Dopamin $1.24 \cdot 10^4 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ist eine gute Bestimmung der Amine möglich (Abb. 1). Da ausserdem das Extraktionsvolumen kleiner ist als das Elutionsvolumen, bei der chromatografischen Trennung, so ist diese Methode etwa um den Faktor 10 empfindlicher als andere photometrische Verfahren^{2,3}. Die enzymatische Dekarboxylierung von Tryptophan und Tyrosin kann auf die gleiche Weise gemessen werden.

Es wird angenommen, dass die aromatischen Aminosäuren in den Geweben der Säugetiere von dem gleichen Enzym dekarboxyliert werden⁶⁻⁸. Kinetische Untersuchungen ergaben, dass die Dekarboxylierung von DL-5-Hydroxytryptophan durch DOPA kompetitiv gehemmt wird (Abb. 2). Für diese Messungen wurde das Enzym aus Mäuseleber nach CLARK, WEISZBACH UND UDENFRIEND⁹ angereichert. Es wurde mit DL-5-Hydroxy[$3\text{-}^{14}\text{C}$]tryptophan (New England Nuclear Corp.) inkubiert und die

TABLE I

DER KOMPETITIVE EFFEKT ZWISCHEN L-5-HYDROXY[$3\text{-}^{14}\text{C}$]TRYPTOPHAN (5-HTP) UND DOPA UM DIE DEKARBOXYLASE AROMATISCHER AMINOSÄUREN

Die Menge an gebildetem 5-Hydroxytryptamin wurde aus der Radioaktivität der TNP-Amine errechnet. Die Absorption bei $340 \text{ m}\mu$ des Benzolextraktes war ein Maß für die Summe 5-Hydroxytryptamin + Dopamin. Die enzymatischen Aktivitäten sind in nMol/h pro mg Protein bei 37° angegeben (Spalten 3 und 5).

Konzentration von 5-HTP (mM) (x)	Konzentration von DOPA (mM) (2)	5-HTP- Dekarboxylase Aktivität (3)	% der max. 5-HTP- Aktivität (4)	DOPA-De- karboxylase Aktivität (5)	% der max. DOPA- Aktivität (6)	Summe aus Spalte 3 und 5 (7)	Summe aus Spalte 4 und 6 (8)
0.74	0.00	75	100	0	0	75	100
0.74	0.74	46	61	58	37	104	98
0.63	0.74	39	52	75	48	114	100
0.48	0.74	33	44	82	53	115	97
0.37	0.74	25	33	93	60	118	93
0.26	0.74	21	28	101	65	122	93
0.00	0.74	0	0	156	100	156	100

Radioaktivität des extrahierten TNP-Amins im Flüssigkeitsscintillationsspektrometer (Tricarb, Packard) gemessen.

Inkubiert man mit DL-5-Hydroxy[$3\text{-}^{14}\text{C}$]tryptophan und DOPA gleichzeitig, so tritt eine gegenseitige Hemmung der Dekarboxylierung ein (Tabelle I), es werden beide Aminosäuren umgesetzt. Da beide TNP-Amine nahezu den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten bei $340\text{ m}\mu$ haben, kann aus der Messung der Absorption bei $340\text{ m}\mu$ und der Radioaktivität des Benzolextraktes der Anteil des TNP-5-Hydroxytryptamins und TNP-Dopamins errechnet werden. Die Summe der prozentualen Aktivitäten (maximale Aktivität = 100%) ergibt stets ungefähr 100% (Spalte 8, Tabelle I), während die absolute Menge der gebildeten Amine ausgedrückt in Mol, unterschiedlich ist (Spalte 7, Tabelle I).

Es tritt hier also der besondere Fall ein, dass der Hemmstoff eines Enzyms gleichzeitig auch als Substrat desselben Proteins fungieren kann. Es erhebt sich die Frage, ob diesem Umstand physiologische Bedeutung zukommt.

*Radiologisches Institut der Universität Freiburg,
Freiburg im Breisgau (Deutschland)*

CHRISTIAN STREFFER

- 1 H. BLASCHKO, *Biochim. Biophys. Acta*, **4** (1950) 130.
- 2 L. S. DIETRICH, *J. Biol. Chem.*, **204** (1953) 587.
- 3 V. E. DAVIS UND J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, **235** (1960) 124.
- 4 T. OKUYAMA UND K. SATAKE, *J. Biochem. Tokyo*, **47** (1960) 454.
- 5 C. STREFFER, *Biochim. Biophys. Acta*, **92** (1964) 612.
- 6 E. WERLE UND D. AURES, *Z. Physiol. Chem.*, **316** (1959) 45.
- 7 A. YUWILER, E. GELLER UND S. EIDUSON, *Arch. Biochem. Biophys.*, **80** (1959) 162.
- 8 W. LOVENBERG, H. WEISSBACH UND S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, **237** (1962) 89.
- 9 C. T. CLARK, H. WEISSBACH UND S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, **210** (1954) 139.

Eingegangen am 1. März, 1967

Biochim. Biophys. Acta, **139** (1967) 193-195

BBA 63246

Citrate synthase interaction with polyphosphate derivatives

The competitive inhibition of citrate synthase (EC 4.1.3.7) from pig heart^{1,2}, yeast¹, beef heart, beef liver and *Escherichia coli*³ by ATP with respect to CoASAc has been reported. Citrate synthase isolated from rat liver mitochondria⁴ and lemon are also inhibited by ATP. Citrate synthase from *E. coli* is inhibited by NADH⁵. Triphospho- and diphosphonucleotides and palmitoyl-CoA exhibit an inhibition on pig heart citrate synthase which is reduced at low concentrations of divalent metal ions (Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+}) suggesting that the effect of the metal ions is due to the chelation with the polyphosphate moiety of the inhibition molecules⁶. The inhibition of pig heart citrate synthase by divalent metal ions (Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+}) has also been reported². This inhibition is competitive with respect to CoASAc. Results reported in this communication indicate the CoASAc molecule binds to citrate by its polyphosphate group.

Abbreviation: DTNB, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid).