

## Subzelluläre Verteilung der Brenzcatechinamine in Herz und Nebennieren von Meerschweinchen nach Vorbehandlung mit *l*- $\alpha$ -Methyl-Dopa

In den chromaffinen Granula des Nebennierenmarks<sup>1,2</sup> und der postganglionären sympathischen Nerven<sup>3,4</sup> werden die Brenzcatechinamine Adrenalin und Noradrenalin gebildet und gespeichert. Auch in Säugetierherzen liegt ein grosser Teil des Noradrenalins granulär gebunden vor<sup>5,6</sup>. Bei diesen Herzgranula handelt es sich wahrscheinlich um Partikeln aus postganglionären sympathischen Nerven<sup>7</sup>.

Die in den Granula gespeicherten Amine der sympathisch innervierten Gewebe lassen sich durch Pharmaka wie Reserpin und Segontin *in vivo* und *in vitro* freisetzen<sup>8,9</sup>. Auch durch Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Methyl-Dopa werden die Noradrenalindepot der Meerschweinchenherzen entleert<sup>10</sup>. Diese Noradrenalinverarmung lässt sich jedoch grundsätzlich von der durch Reserpin und Segontin verursachten unterscheiden. Nachdem CARLSSON und LINDQUIST<sup>11</sup> nachgewiesen hatten, dass  $\alpha$ -Methyl-Dopa *in vivo* zu  $\alpha$ -Methyl-Dopamin und  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin umgewandelt werden können, konnten wir zeigen<sup>12,13</sup>, dass nach Vorbehandlung mit *l*- $\alpha$ -Methyl-Dopa der Verlust des Herzgewebes an Noradrenalin im stöchiometrischen Verhältnis durch  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin ersetzt wird.  $\alpha$ -Methyl-Dopamin ist nur in geringen Mengen nachweisbar. In Übereinstimmung mit der postulierten Funktion des  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalins als falscher Überträgerstoff, der wie Noradrenalin durch Reizung der Nervi accelerantes aus Kaninchenherzen freigesetzt wird<sup>14</sup>, müsste  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin ähnlich wie Noradrenalin im Herzen lokalisiert sein. Wir haben deshalb geprüft, ob nach Vorbehandlung mit  $\alpha$ -Methyl-Dopa  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin und seine Vorstufe  $\alpha$ -Methyl-Dopamin in den Herzgranula von Meerschweinchen angereichert werden. Darüber hinaus haben wir auch die Verteilung des Adrenalins und der methylierten Brenzcatechinamine auf die durch Differentialzentrifugieren gewonnenen Fraktionen der Nebennieren untersucht.

**Methoden.** Meerschweinchen (20–30 Tiere pro Versuch) im Gewicht von 300–400 g erhielten zweimal täglich je 100 mg/kg *l*- $\alpha$ -Methyl-Dopa<sup>15</sup> i.m. 8 Tage lang und wurden 16 h nach der letzten Injektion getötet. Herz und Nebennieren wurden sofort entnommen, das Feuchtgewicht bestimmt und mit der 10fachen Gewichtsmenge 0,3M eiskalter Saccharoselösung homogenisiert. Das Herzgewebe wurde zunächst mit der Schere zerschnitten und anschliessend 15 sec mit einem Ultra-Turrax homogenisiert, die Nebennieren mit einem Glashomogenisator. Die einzelnen Fraktionen der Herz- bzw. Nebennierenhomogenate wurden nach den von uns<sup>7,16</sup> früher angegebenen Methoden durch Differentialzentrifugieren mit einer Spinco-Ultrazentrifuge bei 0°C gewonnen. Die Brenzcatechinamine wurden mit 0,4 N HClO<sub>4</sub> extrahiert und das gefällte Eiweiss abzentrifugiert. Im Sediment wurde der Eiweisstickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Die Extrakte wurden durch Säulenchromatographie aufgetrennt und in den Eluatien Noradrenalin, Adrenalin und  $\alpha$ -Methyl-Dopamin mit der Trihydroxyindolmethode<sup>17</sup> sowie  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin nach Kupplung mit *o*-Phthaldialdehyd (SCHÜMANN, GROBECKER und SCHMIDT<sup>18</sup>) fluorimetrisch bestimmt.

**Ergebnisse.** Die Verteilung der Brenzcatechinamine (nMol/g Eiweiss) vor und nach Behandlung mit  $\alpha$ -Methyl-Dopa auf die Fraktionen des Meerschweinchenherzens ist in Tabelle I dargestellt. Den Hauptanteil des Noradrenalins im Herzen der Kontrolltiere finden wir im Sediment

100 000 g (669,8 nMol), das aus Partikeln besteht, die als Herzgranula bezeichnet werden und wahrscheinlich mit den von WOLFE und POTTER<sup>17</sup> elektronenmikroskopisch beobachteten Granula mit einem Durchmesser von 30–60 m $\mu$  identisch sind. Im Überstand 100 000 g, der dem Cytoplasma entspricht, werden im Mittel 104,9 nMol Noradrenalin gefunden. Das in den Fraktionen 2000 g und 15 000 g gefundene Noradrenalin ist, wie die Amin-Eiweissquotienten dieser Fraktionen des Meerschweinchenherzens zeigen, wahrscheinlich nur unspezifisch adsorbiert<sup>7</sup>. Nach  $\alpha$ -Methyl-Dopa ist der Noradrenalingehalt der Herzgranula bis auf 99,2 nMol, d.h. 15% des ursprünglichen Gehaltes, vermindert. Im Cytoplasma konnte kein Noradrenalin mehr nachgewiesen werden. Dafür enthält die Granulafraktion jetzt 717,3 nMol  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin, das Cytoplasma im Mittel 179,6 nMol. Die im Vergleich zu Noradrenalin stärkere Anreicherung des  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalins könnte dadurch erklärt werden, dass  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin kein Substrat

Tabelle I. Verteilung der Brenzcatechinamine (nMol/g Eiweiss) auf die durch Differentialzentrifugieren gewonnenen Fraktionen des Meerschweinchenherzens vor und nach Behandlung mit *l*- $\alpha$ -Methyl-Dopa (200 mg/kg i.m. über 8 Tage). Mittelwerte und mittlerer Fehler der Mittelwerte

Fraktion	Kontrollen (n = 6)	Nach $\alpha$ -Methyl-Dopa (n = 4)		
	Noradrenalin	Noradrenalin	$\alpha$ -Methyl-Noradrenalin	$\alpha$ -Methyl-Dopamin
Sediment (2000 g)	26,6 $\pm$ 1,4	1,0 $\pm$ 0,5	20,8 $\pm$ 1,8	0,9 $\pm$ 0,3
Sediment (15 000 g)	64,5 $\pm$ 6,5	4,3 $\pm$ 2,6	55,9 $\pm$ 8,1	11,3 $\pm$ 5,9
Sediment (100 000 g)	669,8 $\pm$ 62,6	99,2 $\pm$ 7,5	717,3 $\pm$ 76,2	160,2 $\pm$ 73,4
Überstand (100 000 g)	104,9 $\pm$ 11,7	–	179,6 $\pm$ 34,8	–

<sup>1</sup> H. BLASCHKO und A. D. WELCH, Arch. exp. Path. Pharmac. 279, 17 (1953).

<sup>2</sup> N. A. HILLARP, S. LAGERSTEDT und B. NILSON, Acta physiol. scand. 29, 251 (1953).

<sup>3</sup> U. S. v. EULER und N. A. HILLARP, Nature 177, 44 (1956).

<sup>4</sup> H. J. SCHÜMANN, Arch. exp. Path. Pharmac. 233, 296 (1958).

<sup>5</sup> A. WEGMAN und K. KAKO, Nature 192, 978 (1961).

<sup>6</sup> L. T. POTTER und J. AXELROD, Nature 194, 581 (1962).

<sup>7</sup> H. J. SCHÜMANN, K. SCHNEL und A. PHILIPPU, Arch. exp. Path. Pharmac. 249, 251 (1964).

<sup>8</sup> A. BERTLER, A. CARLSSON und E. ROSENGREN, Naturwissenschaften 43, 521 (1956).

<sup>9</sup> U. S. v. EULER, L. STJÄRNE und F. LISHAJKO, Life Sci. 3, 35 (1964).

<sup>10</sup> S. M. HESS, R. H. CONNAMACHER, M. OZAKI und S. UDENFRIEND, J. Pharmacol. exp. Therapy 134, 129 (1961).

<sup>11</sup> A. CARLSSON und M. LINDQUIST, Acta physiol. scand. 54, 87 (1962).

<sup>12</sup> H. J. SCHÜMANN und H. GROBECKER, Arch. exp. Path. Pharmac. 247, 297 (1964).

<sup>13</sup> H. J. SCHÜMANN, H. GROBECKER und K. SCHMIDT, Arch. exp. Path. Pharmac. 251, 48 (1965).

<sup>14</sup> E. MUSCHOLL und L. MAITRE, Exper. 19, 658 (1963).

<sup>15</sup> Herrn Prof. G. KRONEBERG, Farbenfabriken Bayer, danken wir für grössere Versuchsmengen.

<sup>16</sup> H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, Arch. exp. Path. Pharmac. 240, 275 (1960).

<sup>17</sup> U. S. v. EULER und J. FLODING, Acta physiol. scand. 45, 122 (1959).

der Monaminoxidase ist<sup>18</sup>. Der Hauptanteil des 16 h nach der letzten  $\alpha$ -Methyl-Dopa-Injektion nur noch in geringen Mengen vorhandenen  $\alpha$ -Methyl-Dopamins ist in der Granulafraktion lokalisiert. Hier findet vermutlich die  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalinbildung aus  $\alpha$ -Methyl-Dopamin statt, da normalerweise die Noradrenalinsynthese aus Dopamin in diesen Granula vor sich geht.

Während Noradrenalin und  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin im Meerschweinchenherzen in Partikeln angereichert werden, die bei 100 000 g sedimentieren, wird der Hauptanteil des Adrenalins (592,6 nMol/kg Körpergewicht) der Meerschweinchennebennieren in grösseren Granula gespeichert, die bereits bei 15 000 g sedimentieren (Tabelle II). Im grobpartikulären Sediment (800 g) und im Überstand 15 000 g (Cytoplasma) werden demgegenüber im Mittel nur 142,2 nMol, bzw. 46,5 nMol, gefunden. Nach  $\alpha$ -Methyl-Dopa ist der Adrenalinegehalt der Granulafraktion um 53% auf 277,8 nMol vermindert, im grobpartikulären Sediment ebenfalls um 53% auf 46,7 nMol. Bemerkenswert ist die Zunahme des Adrenalinegehaltes im Cytoplasma von 46,5 nMol bei den Kontrollen auf 91,3 nMol nach  $\alpha$ -Methyl-Dopa. Der Verlust an Adrenalin wird nicht durch entsprechende Mengen  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin ausgeglichen. Die geringen Mengen des zur Kontrolle der fluorimetrischen Bestimmung auch durch zweidimensionale Papierchromatographie identifizierten  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalins finden sich zum grössten Teil in der

Granulafraktion.  $\alpha$ -Methyl-Adrenalin konnten wir papierchromatographisch nicht nachweisen. Es lässt sich zurzeit nicht entscheiden, ob dieser Befund durch die Unfähigkeit des Nebennierengewebes  $\alpha$ -Methyl-Adrenalin zu bilden oder zu speichern bedingt ist. Ausserdem konnten in der Granulafraktion nur kleine Mengen  $\alpha$ -Methyl-Dopamin nachgewiesen werden.

Unsere Versuche unterstützen die zuerst von CARLSSON und LINDQUIST<sup>11</sup> geäusserte und durch eigene Ergebnisse bestätigte Hypothese, nach der Noradrenalin durch  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin quantitativ ersetzt wird, und, da es wie Noradrenalin subzellulär im Herzen verteilt ist, die Folgerung, dass es als falscher Überträgerstoff auch die physiologischen Funktionen des Noradrenalins übernehmen kann. – Der mehr als quantitative Ersatz des Noradrenalins durch  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin im Überstand 100 000 g (Cytoplasma) könnte, wie bereits erwähnt, durch den unterschiedlichen Abbau der Amine durch die Monoaminoxidase bedingt sein. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass das als falscher Überträgerstoff synthetisierte und in den Herzgranula gespeicherte  $\alpha$ -Methyl-Noradrenalin eine stärkere Affinität zu den aminspeichernden Strukturen besitzt als Noradrenalin. Es wird nämlich durch Reserpin aus Meerschweinchenherzen in vivo und durch Segontin aus Herzgranula in vitro wesentlich schlechter freigesetzt (SCHÜMANN, GROBECKER und SCHMIDT<sup>13</sup>).

**Summary.**  $\alpha$ -Methyl-noradrenalin synthesized after pretreatment of the guinea-pig with  $\alpha$ -methyl-dopa was found to be localized, like noradrenalin, mainly in the granular fraction 100 000 g of the heart and in the fraction of the chromaffin granules of the suprarenal medulla (15 000 g).  $\alpha$ -Methyl-adrenalin could not be found.

H. GROBECKER und H. J. SCHÜMANN<sup>19</sup>

*Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M. und Pharmakologisches Institut des Klinikums Essen der Universität Münster (Deutschland), 20. Juli 1965.*

Tabelle II. Verteilung der Brenzcatechinamine (nMol/kg Körpergewicht) auf die durch Differentialzentrifugieren gewonnenen Fraktionen der Meerschweinchennebennieren vor und nach Behandlung mit 1- $\alpha$ -Methyl-Dopa (200 mg/kg i.m. über 8 Tage). Mittelwerte und mittlerer Fehler der Mittelwerte von 4 Versuchen

Fraktion	Kontrollen		Nach $\alpha$ -Methyl-Dopa		
	Adrenalin		Adrenalin	$\alpha$ -Methyl-Noradrenalin	$\alpha$ -Methyl-Dopamin
Sediment (800 g)	142,2 $\pm$ 9,9		46,7 $\pm$ 8,5	6,6 $\pm$ 0,9	–
Sediment (15 000 g)	592,6 $\pm$ 25,3		277,8 $\pm$ 46,6	28,3 $\pm$ 4,6	4,6 $\pm$ 2,1
Überstand (15 000 g)	46,5 $\pm$ 2,8		91,3 $\pm$ 10,2	11,9 $\pm$ 2,4	–

<sup>18</sup> H. BLASCHKO, D. RICHTER und H. SCHLOSSMANN, *Biochem. J.* **31**, 2187 (1937).

<sup>19</sup> Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

## UV-Induced Photodimerization of Thymine and 5-Hydroxymethyluracil in Frozen Water Solutions

Thymine dimer formation, which was first demonstrated experimentally by BEUKERS and BERENDS<sup>1,2</sup>, has now been shown to be one of the major factors responsible for many biological effects resulting from the UV-irradiation of deoxyribonucleic acids, both in vivo and in vitro<sup>3,4</sup>.

Recently, the replacement of thymine residues by 5-hydroxymethyluracil has been reported in the bacteriophage SP 8 (*B. subtilis*) deoxyribonucleic acid<sup>5,6</sup>. Since

the photochemical dimerization of 5-hydroxymethyluracil in the frozen water solution was not emphasized until now, a comparative study on the rate of dimer conversion of both thymine and 5-hydroxymethyluracil in vitro has been proposed, having regard to a potentially great biological importance of such findings in the photochemistry and/or photobiology of phage SP 8 deoxyribonucleic acid.

Alternating current oscillographic polarography<sup>7</sup> has been used for this study, as in papers formerly published<sup>8–11</sup>. Water solutions ( $5 \cdot 10^{-4} M$  and  $10^{-3} M$ ) of both thymine and 5-hydroxymethyluracil were irradiated at 2.537 Å in the frozen state under a Philips TUV, 30 W, bactericidal lamp. Small Petri-discs have been applied