

Aktivierung der Tyrosinhydroxylase durch Homovanillinsäure

Tyrosine hydroxylase activity is increased by homovanillic acid

U. Kollner und E. Gründig

Institut für medizinische Chemie der Universität Wien, Währinger Strasse 10, A-1090 Wien (Österreich), 5. August 1976

Summary. Influence of homovanillic acid on tyrosine hydroxylase activity was investigated in homogenates of rat brain: 10^{-3} and 10^{-4} M HVA/l were found to increase enzymatic activity significantly. The probability of physiological concentrations also activating DOPA synthesis is discussed.

Die Umsetzung von Tyrosin zu DOPA ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Catecholamin-Biosynthese^{1,2}. Man kennt 3 Gruppen von Inhibitoren des Enzyms, nämlich substratkompetitive Tyrosin-Analoga, Cofaktor-kompetitive Effektoren, zu denen Verbindungen mit Catecholstruktur zu zählen sind, sowie Chelatbildner, die das zur Katalyse benötigte Fe^{++} , das wahrscheinlich ein integraler Teil des Enzymmoleküls ist³, binden. Die zweite Gruppe der Inhibitoren ist für die Regulation der Transmittersynthese von grösster Bedeutung, da die Tyrosinhydroxylase einer Feedback-Hemmung durch Dopamin und Noradrenalin unterliegt^{4,5}. Eine Beeinflussung der Catecholamin-Synthese durch ihre Abbauprodukte ist bisher nur für Substanzen mit Catecholstruktur bekannt; ihr inhibitorischer Effekt glich jenem, der für Noradrenalin beschrieben wird (Di-Hydroxy-Phenylglycol), oder war beträchtlich geringer⁶. Homovanillinsäure (HVA) wurde für die Untersuchung ausgewählt, da die Substanz der quantitativ bedeutendste Dopamin-Metabolit ohne Catecholstruktur ist⁷.

Methodik. Als Versuchstiere fanden männliche Wistar-Albino-Ratten (150–200 g) Verwendung. Die Tiere wurden dekapitiert, und es wurde das Hirn entnommen. Mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Teflon-Homogenisators wurde vom Gesamthirn ein Homogenat in isotoner Sucrose-

lösung hergestellt (0,32 M; pH 7,4; 1:10). Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde eine Methode von McGeer et al.⁸ herangezogen. 0,2 ml des Hirnhomogenats wurden mit 0,1 μ Ci $U^{-14}C$ -L-Tyr in Gegenwart des DOPA-Decarboxylase-Hemmers Ro-4-4602 (0,2 mM) sowie der jeweils zu untersuchenden Menge an Effektor 30 Min. bei 37°C inkubiert (K-Phosphatpuffer 0,28 M; pH 6,0–6,2), und man isolierte das aus dem markierten Tyrosin gebildete $U^{-14}C$ -DOPA mittels Adsorptionschromatographie (Al_2O_3 ; pH 8,5–9,5; Säulen 7×30 mm, Elution mit 0,3 M Essigsäure). Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Liquid-Scintillation-Counters (isocap 300, Nuclear Chicago, USA) bestimmt. Als Kontrollbestimmungen wurden für jedes Tier mindestens 4 Inkubationen ohne Zusatz von Effektor durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit einer Methode von Lowry et al.⁹. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde Students t-Test herangezogen.

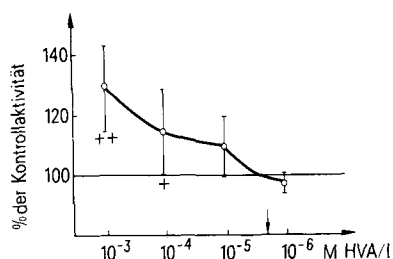
Ergebnisse. In Gegenwart von 10^{-3} M HVA/l lag die enzymatische Aktivität um 29% höher als in den Kontrollen ($p < 0,005$). Bei 10^{-4} M HVA/l wurden um 15% höhere Werte gemessen ($0,05 > p > 0,005$). Die 12prozentige Aktivierung des Tyrosin-Umsatzes durch 10^{-5} M HVA/l wies keine statistische Signifikanz mehr auf, jedoch ist aus dem Verlauf der Kurve in der Abbildung zu entnehmen, dass eine Aktivierung nicht ausgeschlossen werden muss.

Diskussion. HVA kann aus Dopamin auf 2 Wegen entstehen: Entweder wird zuerst durch Einwirkung von Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) 3-Methoxy-Tyramin gebildet, aus dem dann durch Monoaminoxidase (MAO) HVA entsteht; oder MAO setzt Dopamin zuerst zu Dihydroxy-Phenylelessigsäure (DOPAC) um, aus der unter Einwirkung von COMT dann HVA gebildet wird. DOPAC und HVA sind die Hauptmetaboliten des Dopamins^{7,10,11}. Ob DOPAC¹² oder HVA^{13,14} als der quanti-

Einfluss der Homovanillinsäure auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase

	$\bar{x} \pm s^*$	Umsatz in Prozent $\bar{x} \pm s$	n	p
Kontrollen	27,37 \pm 3,68	100 \pm 13,44	12	
10^{-3} M HVA/l	34,40 \pm 3,49	129 \pm 15,05	7	< 0,005
10^{-4} M HVA/l	31,44 \pm 3,96	115 \pm 15,02	12	0,05 > p > 0,005
10^{-5} M HVA/l	29,22 \pm 5,57	112 \pm 9,70	5	n.s.
10^{-6} M HVA/l	26,49 \pm 1,55	98 \pm 5,71	4	n.s.

* Umsatz in $dpm \cdot h^{-1} \cdot \mu Ci^{14}C$ -L-Tyr $^{-1} \cdot \mu g$ Protein $^{-1}$.



++ $p < 0,005$; + $0,005 > p > 0,005$; ↓ Physiologische Konzentration im Striatum.

- 1 G. Rosenfeld, L. Leeper und S. Udenfriend, *Archs Biochem. Biophys.* 74, 252 (1958).
- 2 M. Levitt, S. Spector und S. Udenfriend, *J. Pharmac. exp. Ther.* 148, 1 (1965).
- 3 N. Poillon, *J. Neurochem.* 21, 729 (1973).
- 4 S. Udenfriend, *Pharmac. Rev.* 18, 43 (1966).
- 5 M. Ikeda, L. A. Fahien und S. Udenfriend, *J. biol. Chem.* 241, 4452 (1966).
- 6 M. C. Rubio und S. Z. Langer, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 280, 315 (1973).
- 7 C. O. Rutledge und J. Jonason, *J. Pharmac. exp. Ther.* 157, 493 (1967).
- 8 E. G. McGeer und P. L. McGeer, *Can. J. Biochem.* 45, 115 (1967).
- 9 O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 10 Ch. Mc Goodall, *Pigment Cell* 7, 308 (1973).
- 11 W. B. Abrams, C. B. Coutinho, A. S. Leon und H. E. Spiegel, *J. Am. Med. Ass.* 218, 1912 (1971).
- 12 B. H. C. Westerink und J. Korf, *Brain Res.* 113, 429 (1976).
- 13 G. W. Ashcroft, R. C. Dow und A. T. B. Moir, *J. Physiol., Lond.* 199, 397 (1968).
- 14 Ch. Mc Goodall und H. Alton, *Biochem. Pharmac.* 17, 905 (1968).

tativ bedeutendste Metabolit des Dopamins anzusehen ist, kann als nicht ganz geklärt bezeichnet werden; im Striatum findet die O-Methylierung des DOPAC zu HVA in stärkerem Mass statt als im mesolimbischen System¹²; zudem interessierte als Effektor nur die letztere Verbindung, da die Feedback-Hemmung der Tyrosin-Hydroxylierung durch Catecholverbindungen gut bekannt ist^{8, 15, 16}. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, ist der Effekt der HVA auf die Aktivität der TH bis zu einer Konzentration von 10^{-4} M/l dosisabhängig; zwischen der genannten Konzentration und 10^{-5} M/l bildete die Aktivierungskurve ein Plateau. Wenngleich der Effekt für das letztere Probenkollektiv statistisch nicht mehr als signifikant zu werten war, ist aufgrund des Kurvenverlaufs, der gerade vor Erreichen der endogenen Konzentration noch eine deutliche Wirkung erkennen lässt, dennoch eine Bedeutung auch der Ergebnisse nach Einsatz von 10^{-5} M HVA/l nicht auszuschliessen.

Im Rahmen einer Effektoren-Übersicht untersuchten McGeer et al.⁸ auch die Wirkung der HVA auf die Aktivität der Tyrosinhydroxylase. Es wurden Werte, die innerhalb einer Streuung von $\pm 15\%$ um die Kontrollen geschart waren, beobachtet und als unsignifikant gewertet. Die endogene Konzentration an HVA aus dem Homogenat des Rattenstriatums liegt bei $2,5 \times 10^{-6}$ M/l¹³; an den

dopaminergen Neuronen selbst dürfte die Konzentration von Transmitter und Metabolit einen beträchtlich höheren Wert erreichen: Haug¹⁷ postuliert ein Ansteigen des Verhältnisses von Nervenzellvolumen: Gesamtvolumen im Laufe der Phylogenese; da das als Nager der Ratte phylogenetisch verwandte Kaninchen einen Wert von 1:20 aufwies, ist anzunehmen, dass der Quotient für die Ratte in mindestens eben dieser Grössenordnung liegt. Es kann somit eine Bedeutung des beschriebenen Effektes auch in vivo erwogen werden, da als wahrscheinlich angenommen werden kann, dass die Konzentration an HVA an dopaminergen Neuronen jenen Wert erreicht, der in den beschriebenen Versuchen noch eine deutliche Aktivierung erkennen liess. Die regulatorische Bedeutung des beobachteten Effektes könnte darin liegen, dass die Catecholamin-Synthese durch eine Akkumulation eines Hauptmetaboliten verstärkt wird, da diese Transmittererfordernis signalisiert.

- 15 M. Levitt, J. W. Gibb, J. W. Daly, M. Lipton und S. Udenfriend, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1313 (1967).
- 16 S. Udenfriend, P. Zaltzman-Nirenberg und T. Nagatsu, *Biochem. Pharmac.* **14**, 837 (1965).
- 17 H. Haug, *Acta Anat.* **19**, 239 (1953).

Phosphonacetyl-L-aspartate: An aspartate transcarbamylase inhibitor causing larval death and rudimentary wing phenocopies in *Drosophila melanogaster*

Bettie J. Holaday and J. W. Fristrom¹

Department of Genetics, University of California, Berkeley (California 94720, USA), 15 November 1976

Summary. Phosphonacetyl-L-aspartate, an inhibitor and transition state analogue of aspartate transcarbamylase, has been found to cause rudimentary wing phenocopies and larval death in *Drosophila melanogaster*. We believe this compound may prove useful as a selection agent for regulatory mutations at the rudimentary locus.

The need to use regulatory mutants in studying gene regulation is widely recognized. In eukaryotes, especially multicellular ones, obtaining such mutants is difficult. We are currently engaged in screening for regulatory mutants at the rudimentary wing (r) locus in *Drosophila melanogaster*. This locus is believed to code for the first 3 enzymes in the pyrimidine biosynthetic pathway, carbamyl phosphate synthetase, aspartate transcarbamylase (ATCase) and dihydroorotase²⁻⁵. Rudimentary mutants require pyrimidines for larval development and female fertility and have changes in the wings of both sexes ranging from a slight irregularity in the marginal wing bristles to short, blistered wings with very sparse marginal bristles^{6, 7}. We are attempting to recover mutants which synthesize excess quantities of the first 3 enzymes in pyrimidine biosynthesis. Such 'overproducers' might be recovered by selecting for mutants resistant to compounds which inhibit pyrimidine biosynthesis. In microorganisms one such compound, 6-azauracil (6-AU), when converted to 6-azauridine monophosphate (6-AUMP), is known to be a competitive inhibitor of orotidine monophosphate decarboxylase, the terminal enzyme in pyrimidine biosynthesis⁸. 6-AU kills *Drosophila* larvae and produces r phenocopies⁹. This report concerns a second compound, phosphonacetyl-L-aspartate (PALA), an inhibitor and transition state analogue of ATCase¹⁰. PALA inhibits ATCases from bacteria¹⁰, mammals¹¹ and *Drosophila*¹² and kills mammalian cells in culture¹³. We report here that PALA induces r phenocopies and kills wild-type larvae.

Materials and methods. Na₄PALA was synthesized according to Stark and Swyryd¹⁴. An Oregon r stock was used. The defined media of Sang¹⁵ as modified by Falk and Nash¹⁶ was used without RNA except as noted. Eggs were collected on standard media over a 24-h-period. The resulting eggs (and some first instar larvae) were recovered and rinsed thoroughly with water. They were then floated in 20% sucrose to remove food and agar and

- 1 Acknowledgments. We are grateful to A. Thurmond for technical assistance. This work was supported in part by a grant from the National Science Foundation (PCM) 75-22802.
- 2 J. M. Rawls and J. W. Fristrom, *Nature* **255**, 738 (1975).
- 3 S. Nørby, *Hereditas* **73**, 11 (1973).
- 4 S. Nørby, *Heredity* **33**, 140 (1974).
- 5 B. Jarry and D. Falk, *Molec. gen. Genet.* **135**, 113 (1975).
- 6 S. Nørby, *Hereditas* **66**, 205 (1970).
- 7 D. L. Lindsley and E. H. Grell, in: *Genetic Variations of Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Wash., Publ. No. 627 (1968).
- 8 G. O'Donovan and J. Neuhaud, *Bact. Rev.* **34**, 278 (1970).
- 9 P. Strömman, E. Bahn, S. Nørby and K. Sick, *Hereditas* **73**, 239 (1973).
- 10 K. D. Collins and G. R. Stark, *J. biol. Chem.* **246**, 6599 (1971).
- 11 N. Hoogenraad, *Arch. biochem. Biophys.* **161**, 76 (1974).
- 12 J. M. Rawls, unpublished.
- 13 E. A. Swyryd, S. S. Seaver and G. R. Stark, *J. biol. Chem.* **249**, 6945 (1974).
- 14 T. D. Kempe, E. A. Swyryd, M. Bruist and G. R. Stark, submitted to Cell.
- 15 J. Sang, *J. exp. Biol.* **33**, 45 (1956).
- 16 D. R. Falk and D. Nash, *Genetics* **76**, 755 (1974).