

Tryptophanhydroxylase im Corpus pineale beim Menschen

Aus dem Corpus pineale (C.p.) konnten LERNER et al.¹ vor einigen Jahren Melatonin (*N*-Acetyl-5-methoxytryptamin) isolieren. Als Prekursor-Substanz gilt *N*-acetyliertes Serotonin, und AXELROD und WEISSBACH² isolierten aus dem C.p. ein Enzym, das *N*-Acetylserotonin in Position 5 methyliert. Eine hohe Aktivität dieser Hydroxyindol-O-Methyltransferase konnte ebenfalls im C.p. vom Menschen gefunden werden, und die Aktivität erwies sich unabhängig vom Alter³. Am Anfang der Biosynthese des Melatonin steht die Tryptophanhydroxylase, ein Enzym, das beim Menschen kürzlich⁴ im Carcinoidgewebe nachgewiesen werden konnte. Es soll hier darüber berichtet werden, dass es gelang, Tryptophanhydroxylase-Aktivität auch im C.p. vom Menschen nachzuweisen.

Zum Nachweis der Tryptophanhydroxylase wurde folgendermassen vorgegangen. Homogenate aus menschlichen C.p. wurden mit radioaktivem Tryptophan (³H-D,L-Tryptophan, spezifische Aktivität 5990 $\mu\text{C}/\mu\text{M}$) in Gegenwart eines Dekarboxylasehemmers inkubiert und das gebildete Tritiumwasser gemessen. Die C.p. stammten von 5 Patienten im Alter von 42 bis 72 Jahren. Die Obduktion erfolgte spätestens 5 h nach dem Tode. Das Gewebe wurde gewogen und mit der 6-fachen Menge eisgekühlter 0,32 *M* Saccharoselösung, die 10⁻³ *M* Merkaptotäthanol enthielt, homogenisiert. Nach Zentrifugierung (10 min, 20 000 · *g* bei + 2°C) wurde der Überstand zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Die Bestimmung des Eiweissgehaltes erfolgte nach LOWRY et al.⁵ Das Standardreaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen: Phosphatpuffer (pH 6,5) 200 μmol ; Merkaptotäthanol 100 μmol ; *N*-Methyl-3-hydroxyphenylhydrazin 0,1 μmol ; FeSO₄ 0,5 μmol ; Enzymlösung 400 μl ; L-Tryptophan 0,03 μmol ; ³H-D,L-Tryptophan 0,02 μmol ; 6,7-Dimethyltetrahydropteridin 2 μmol .

Es folgte eine Präinkubierung von 5 min, wobei die 3 letzten Substanzen noch nicht zugesetzt waren. Das Endvolumen der Inkubationslösung betrug 1,2 ml und die Inkubationszeit 15 min. Die Inkubation erfolgte bei 38°C unter aeroben Bedingungen im Schüttelbad. Sie wurde durch Zusatz von 0,1 ml Eisessig abgebrochen. Nach 10 min wurde zentrifugiert (10 min, 20 000 · *g*) und die Lösung auf eine Chromatographiesäule (Durchmesser 0,4 cm) gebracht, die 1 cm hoch mit aktiver Kohle (Norit-Granulat) und 3 cm hoch mit Dowex-Harz (Typ 50 W · 2, 100–200 mesh in H⁺-Form) gefüllt war. Das Substrat und das gebildete 5-Hydroxytryptophan (5-HT) wird hierbei zurückgehalten. Das gebildete Tritiumwasser wurde direkt in BRAYS⁶ Lösung aufgefangen, ebenso wie das Waschwasser (3 · 0,5 ml). Die Aktivität wurde im Szintillationszähler gemessen. Hierbei ist zu sagen, dass lediglich 10–15% der erwarteten Menge Tritiumwasser gefunden wurde. Der grösste Teil der Aktivität konnte trotz erfolgter Hydroxylierung an der 5-Position im gebildeten 5-HT gefunden werden. Eine Erklärung dafür geben Untersuchungsergebnisse von RENSON et al.⁷ Zur Kontrolle wurde auch das gebildete 5-HT von der Ionenaustauschersäule (die dann keine aktive Kohle enthielt) mit 2 *N* Ammoniak eluiert, unter Stickstoffstrom eingengt und hochspannungselektrophoretisch⁴ aufgetrennt. Nach Lokalisierung mit Referenzsubstanz wurde das gebildete 5-HT isoliert und die Radioaktivität gemessen. Als Blank für die Enzymversuche dienten jeweils Ansätze, bei denen das Homogenat für 5 min bei 80°C erhitzt worden war oder aber, wo das Enzym mit *p*-Chlorphenylalanin (10⁻³ *M*) gehemmt wurde.

In der Tabelle sind die gefundenen Werte wiedergegeben. Aus ihr geht hervor, dass in allen Extrakten aus menschlichen C.p. Tryptophanhydroxylase-Aktivität gefunden werden konnte. Die Aktivität war im C.p. 3 bis 6 mal grösser als im Cortex-Gewebe. Eine höhere Aktivität konnte an keiner anderen Stelle im menschlichen Gehirn gefunden werden, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll. Lediglich in Lebermetastasen von einem Patienten mit Carcinoid konnten höhere Aktivitätswerte als im C.p. registriert werden.

Der hier erstmalig veröffentlichte Nachweis von Tryptophanhydroxylase im menschlichen Corpus pineale bedeutet, dass die Synthese von Melatonin unabhängig vom 5-Hydroxytryptophan-Transport ist. Es wäre nun zu untersuchen, welcher Schritt in der Melatonin-Synthese beim Menschen geschwindigkeitsbegrenzend ist⁸.

Corpus pineale No.	Alter der Patienten	H ³ im gebildeten Wasser, ausgedrückt in Imp/min/mg Protein/15 min Inkubation
1	72	450
2	68	390
3	57	275
4	56	458
5	42	590
Cortex frontalis		90–110
Cortex temporalis		80–102

Summary. Tryptophanhydroxylase has been demonstrated in the human pineal gland. The enzyme activity was 3–6 times greater than that of homogenates from cortical areas of human brain. The presence of tryptophan hydroxylase in the pineal gland implies that this organ is not dependent on the transport of 5-hydroxytryptophan but is able to synthesize this precursor of melatonin.

W. v. STUDNITZ

Zentrallaboratorium für klinische Chemie (Universität Lund), Allgemeines Krankenhaus Malmö (Schweden), 23. März 1967.

¹ A. B. LERNER, J. D. CASE und R. V. HEINZELMAN, J. Am. chem. Soc. 81, 6084 (1959).

² J. AXELROD und H. WEISSBACH, J. biol. Chem. 236, 211 (1961).

³ R. J. WURTMAN, J. AXELROD und J. D. BARCHAS, J. clin. Endocrinol. Metab. 24, 299 (1964).

⁴ D. G. GRAHAME-SMITH, Biochim. biophys. Acta 86, 176 (1964).

⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁶ G. A. BRAY, Analyt. Biochem. 1, 279 (1960).

⁷ J. RENSON, J. DALY, H. WEISSBACH, B. WITKOP und S. UDEN-FRIEND, Biochem. biophys. Res. Commun. 25, 504 (1966).

⁸ This work was supported by grants from the Medical Faculty, University of Lund and the Swedish Cancer Society.