

Die Bedeutung des Substrates bei der Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase * in RLC-Zellen **

The Importance of the Substrate for the Induction of Tyrosine- α -ketoglutarate-Transaminase in RLC-cells

Hans Kröger, Ingrid Donner, Herbert Voss und Gisela Plötze

Robert Koch-Institut, Berlin

(Z. Naturforsch. 30 c, 263–265 [1975]; eingegangen am 17. Oktober/21. November 1974)

Substrate, Induction, RLC-cells, Tyrosine- α -ketoglutarat-transaminase, Dexamethasone Phosphate

1. Dexamethasone phosphate causes approximately a threefold increase of the tyrosine- α -ketoglutarate transaminase in the culture of RLC cells.
2. The induction of the enzyme depends on the presence of L-tyrosine. Omission of L-leucine or L-tryptophan, respectively, has no effect.
3. Omission of L-tyrosine influences the activity of the lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase not at all and that of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase only to a small extent.
4. In the absence of L-tyrosine an super-induction takes also place by actinomycin.

Frühere Untersuchungen *in vivo* haben ergeben, daß für die Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in adrenaletomierten Ratten durch geringe Mengen Hormon auch das Substrat notwendig ist^{1–4}. Maximale Induzierbarkeit wird erreicht, wenn das Hormon und das Substrat zusammen appliziert werden. Actinomycin hemmt bei gleichzeitiger Verabreichung die Induktion. Daraus kann geschlossen werden, daß die Synthese von mRNA auf diese Weise erreicht wird. Wir haben diese Ergebnisse auch *in vitro* überprüft und Untersuchungen an RLC-Zellen durchgeführt.

Methoden

1. Züchtung der Zellen

Wir bezogen die Zellen von Professor Gerschenon, Warren Hall Laboratory, Univ. of Calif., Los Angeles. Die Zellen wurden gezüchtet in Plastikflaschen (Falcon-Plastics = 75 cm², 250 ml). Dabei wurde folgendes Medium verwendet: Gibco-Nutrient-Mixture F-12, Powder Med. + 0,1% Na-bicarb., 50 γ /ml Streptomycin, 100 E/ml Penicillin, pH 7,2. Vor Gebrauch wurden jeweils 10% foetales Kälberserum zugesetzt. Für einige Versuche wurde hierbei mit der gleichen Zusammensetzung des oben genannten Mediums gearbeitet, das einen Mangel an einer Aminosäure aufwies (eigene Herstellung). Die Zellen wurden jede Woche einmal im Verhältnis 1:3

vermehrt. Dazwischen erfolgte ein Medium-Wechsel jeden 2. – 3. Tag.

2. Bestimmung der Enzym-Aktivitäten

a. Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase

Die Zellen wurden zweimal mit je ca. 10 ml Hank's Lösung ohne Ca²⁺, pH 7,4, durch Hin- und Herbewegen der Lösung in der Flasche gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers aus den Flaschen herausgespült und durch Zentrifugation bei 300 \times g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen mit ca. 10 ml 0,15 M Na-PO₄-Puffer, pH 7,8, und in 1 ml Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden aufgeschlossen durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen (in Trockeneis-Alkoholgemisch). Anschließend wurde 15 min bei 16000 \times g zentrifugiert und im Überstand die Aktivität der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase bestimmt⁵.

b. In dem Extrakt wurde die *Lactat-dehydrogenase* nach Wróblewski *et al.*⁶, die *Malat-dehydrogenase* nach Bergmeyer⁷ und die *Glucose-6-phosphat-dehydrogenase* nach Kornberg *et al.*⁸ ermittelt.

c. Der Protein-Gehalt wurde festgestellt mit Hilfe des Biuret-Verfahrens⁹.

Material

Penicillin und Streptomycin bezogen wir von der Firma Hoechst, Frankfurt; das Kälber-Serum von Flow-Laboratories, Irvine, Schottland; Dexametha-

Sonderdruckanforderungen an Dr. Hans Kröger, Robert Koch-Institut, D-1000 Berlin 65, Nordufer 20.

* (EC 2.6.1.5.) = Tyrosin-aminotransferase.

** Teile dieser Ergebnisse wurden vorgetragen auf der Herbsttagung für Biologische Chemie, Erlangen 1972 (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1574 [1972]).

Abkürzungen: BTS, Brenztraubensäure.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

sonphosphat erhielten wir von Merck, Sharp & Dohme, München. Dexamethasonhemisulfat stellte uns Dr. P. Schulze, Schering-Werke Berlin, freundlicherweise zur Verfügung. Gibco-Nutrient-Mixture F-12, Powder Med., bezogen wir von der Firma Boehringer, Mannheim, ebenso die Testkombination. Von Calbiochem erhielten wir Actidion, von Serva, Heidelberg, Actinomycin D.

Ergebnisse

1. Enzym-Induktion in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Zugabe von Dexamethasonphosphat läßt sich bereits nach zwei Stunden ein Enzym-Anstieg feststellen (Abb. 1). Dieser hält an bis zur achten Stunde. Danach beginnt dann ein langsamer Abfall.

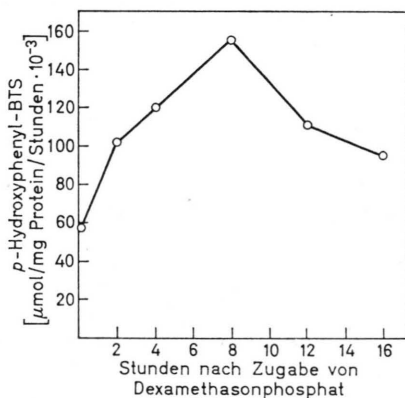


Abb. 1. Zeitliche Abhängigkeit der Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase nach Zugabe von 5 μ g/ml Dexamethasonphosphat. Die Zellen wurden vorgezüchtet wie unter Methoden beschrieben und das Dexamethasonphosphat zusammen mit neuem Medium zugesetzt.

Wir haben überprüft, ob in diesem System auch Dexamethasonhemisulfat aktiv ist. Mit dieser Substanz kann die Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase ebenfalls induziert werden (Tab. I).

Tab. I. Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase durch verschiedene Konzentrationen an Dexamethasonhemisulfat. Methodik wie in Abb. 1 beschrieben.

Zugesetzte Menge an Dexamethasonhemisulfat [μ g/ml]	p-Hydroxyphenyl-BTS [μ mol/mg Protein/Stde. $\cdot 10^{-3}$]
1,25	19
2,50	32
5,00	42
10,00	45
20,00	46

2. Abhängigkeit von Aminosäuren

a. L-Tyrosin

Wenn das L-Tyrosin aus dem Ansatz ausgelassen wird, ist die Induktion des Enzyms erheblich herabgesetzt (Tab. II). Dieses ist schon der Fall bei der halben Tyrosin-Konzentration. Noch drastischer ist der Effekt bei Zellen, welche über 2–3 Passagen ohne Tyrosin gehalten wurden.

Tab. II. Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in Anwesenheit verschiedener L-Tyrosin-Mengen. Die Zellen wurden vorgezüchtet, dann zweimal mit Hank's Medium gewaschen und danach Medien mit verschiedenen L-Tyrosin-Mengen zugesetzt. Induktions-Zeit: 16 Stunden.

Tyrosin-Menge	p-Hydroxyphenyl-BTS [μ mol/mg Protein/Stde. $\cdot 10^{-3}$]
—	44
3×10^{-5} M	91
$1,5 \times 10^{-5}$ M	64
3×10^{-6} M	42
3×10^{-7} M	41
3×10^{-8} M	38

b. L-Tryptophan, L-Leucin

Eine herabgesetzte Induktion beobachtet man auch bei sehr geringen L-Tryptophan-Mengen (Tab. III). Beim L-Leucin hingegen ist auch bei sehr geringer Aminosäure-Konzentration noch eine maximale Induzierbarkeit vorhanden (Tab. IV).

Tab. III. Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in Anwesenheit verschiedener Tryptophan-Mengen. (Methodik siehe Tab. II.) Induktions-Zeit: 16 Stunden.

Tryptophan-Menge	p-Hydroxyphenyl-BTS [μ mol/mg Protein/Stde. $\cdot 10^{-3}$]
—	57
1×10^{-6} M	77
$0,5 \times 10^{-6}$ M	81
1×10^{-7} M	70
1×10^{-8} M	68
1×10^{-9} M	56

Tab. IV. Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in Anwesenheit verschiedener Leucin-Mengen. (Methodik siehe Tab. II.) Induktions-Zeit: 16 Stunden.

Leucin-Menge	p-Hydroxyphenyl-BTS [μ mol/mg Protein/Stde. $\cdot 10^{-3}$]
—	53
1×10^{-4} M	87
$0,5 \times 10^{-4}$ M	87
1×10^{-5} M	106
1×10^{-6} M	85
1×10^{-7} M	81

3. Verhalten anderer Enzyme

Wie aus Tab. V hervorgeht, ändern sich die Aktivitäten der anderen von uns untersuchten Enzyme beim Auslassen von L-Tyrosin nicht sehr wesentlich. Der Effekt ist demnach spezifisch für die Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase.

Tab. V. Verhalten verschiedener Enzyme in Anwesenheit von Dexamethasonphosphat in Gegenwart bzw. Abwesenheit von L-Tyrosin. Die Zellen wurden wie unter Methoden beschrieben vorgezchtet. Danach wurden die entsprechenden Medien mit 5 μ g/ml Dexamethasonphosphat zugesetzt und 20 Stunden lang inkubiert. * (EC 1.2.1.22) = L-Lactaldehyde : NAD + Oxidoreductase. ** (EC 1.1.1.82) = L-Malate : NADP + Oxidoreductase. *** (EC 1.1.1.49) = D-Glucose-6-Phosphat : NADP + 1-Oxidoreductase.

mU mg Protein	– Tyrosin	+ Tyrosin
Lactat-dehydrogenase *	3956	3747
Malat-dehydrogenase **	1304	1163
Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase ***	106	126

4. Einfluß von Actinomycin und Actidion

Zugabe von Actinomycin führt zu einer Super-Induktion (Tab. VI). In den hier aufgezeigten Werten ist der Effekt bei Abwesenheit von L-Tyrosin stärker. Mit Actidion wird dann in beiden Fällen eine erhebliche Aktivitäts-Abnahme erreicht.

Tab. VI. Einfluß von Actinomycin bzw. Actidion auf die durch Dexamethasonphosphat bewirkte Induktion. 24 Stunden vor Versuchsbeginn L-Tyrosin-freies Medium; dann Dexamethasonphosphat + Tyrosin-freies Medium, zweimaliges Waschen mit Hank's Medium; anschließend über 5 Stunden die entsprechenden Zusätze. Im Medium waren enthalten: 0,25 μ g/ml Actinomycin bzw. 28 μ g/ml Actidion.

Behandlung der Zellen	p-Hydroxyphenyl-BTS [μ mol/mg Protein/ Stde. $\cdot 10^{-3}$]
ohne L-Tyrosin	14
ohne L-Tyrosin + Actinomycin	24
ohne L-Tyrosin + Actinomycin	21
ohne L-Tyrosin + Actidion	03
Zusatz von L-Tyrosin	35
Zusatz von L-Tyrosin + Actinomycin	38
Zusatz von L-Tyrosin + Actidion	06

Diskussion

Wird die Konzentration an L-Tyrosin in dem Medium für die Zellkulturen auch nur auf die Hälfte gesenkt, so wird die Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase erheblich herabgesetzt. Dieser Effekt ist bei L-Tryptophan im wesentlich geringeren Maße, beim L-Leucin dagegen überhaupt nicht zu beobachten. Von Lee und Kenney¹⁰ wurde mit größeren Leucin-Mengen sogar eine Steigerung der Enzym-Induktion beobachtet. Andere von uns untersuchte Enzyme, wie Lactat-dehydrogenase, Malat-dehydrogenase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase werden nicht betroffen. Das Substrat spielt demnach – wie auch die Verhältnisse *in vivo* bereits gezeigt hatten^{1–4} – eine entscheidende Rolle. Vermutlich liegt der Angriffspunkt auf der Stufe der Transkription, denn in früheren Untersuchungen hatte sich herausgestellt, daß diese Reaktion durch Actinomycin gehemmt wird¹.

Die Arbeiten wurden auch unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk.

¹ H. Kröger u. B. Greuer, *Nature* **210**, 200 [1966].

² H. Kröger, J. Philipp u. A. Wicke, *Biochem. Z.* **344**, 227 [1966].

³ H. Kröger u. B. Greuer, *Z. ges. exper. Med.* **145**, 71 [1968].

⁴ H. Kröger, W. Kotulla u. J. Hoshino, *Z. Naturforsch.* **24b**, 229 [1969].

⁵ H. Kröger u. B. Greuer, *Biochem. Z.* **341**, 190 [1965].

⁶ F. Wróblewski u. J. S. La Due, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 210 [1955].

⁷ H. U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse* **Bd. I**, p. 575, Verlag Chemie, Weinheim 1970.

⁸ A. Kornberg u. B. L. Horecker, *Methods in Enzymology*, **Bd. I**, p. 323, Academic Press, New York 1955.

⁹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 [1951].

¹⁰ K. L. Lee u. F. T. Kenney, *J. Biol. Chem.* **246**, 7595 [1971].