

THE INFLUENCE OF THYROXINE ON THE OXYGEN CONSUMPTION
OF LIVER HOMOGENATES*

by

W. RADSMA, H. L. GOLTERMAN AND J. C. BIRKENHÄGER

Laboratory of Physiological Chemistry of the Municipal University of Amsterdam (Netherlands)

In a previous paper in this journal we¹ have shown that, with adrenochrome, inhibition as well as stimulation of oxygen consumption of diluted liver homogenates could be obtained, dependent upon the substrates and co-factors for oxidation added to these diluted homogenates, and we suggested that the many contradictory findings described in literature about the effect of adrenaline on the oxygen consumption of surviving tissue preparations may be the result of uncontrollable variations in substrate oxidized and concentration of co-factors in such tissue preparations.

In the literature about the influence of *thyroxine* on the oxygen consumption of tissue preparations *in vitro*, we meet with the same seemingly contradictory results obtained by different investigators as with adrenaline.

The literature on this subject has been surveyed by BARKER² in 1951. BARKER concluded that: "A conservative summary of the present status of this aspect of thyroid function would be that no *in vitro* response to thyroxine or thyroglobulin has yet been obtained to furnish a means of probing further into detailed mechanisms of the action of the hormone".

When working with tissue pulp, tissue slides, homogenates, as surviving tissue preparations one is seldom exactly informed about the kind of substrates which are oxidized, nor about the question which of the many chemical reactions that are implied in the oxygen consumption of such preparations is the rate-limiting reaction.

By using *diluted* homogenates which show no *spontaneous* oxygen consumption, it is possible to vary the substrates for oxidation and the rate-limiting reactions in a controllable way, by adding to these diluted homogenates various substrates and co-factors.

In this investigation we have studied the influence of *thyroxine* on such diluted homogenates to which various substrates and co-factors were added.

As for the preparation of homogenates, cytochrome *c*, and DPN, used in this investigation we refer to our previous publication¹. The thyroxine used by us was DL-thyroxine Roche, it was dissolved in aq. dest. at slightly alkaline reaction, the solution then brought to pH 8. The stock solution contained 2 mg or 3 mg thyroxine in 1 ml, this solution was opalescent at pH 8. As a rule 0.1 ml of this solution was added to the homogenate preparations in the Warburg vessel. The oxygen consumption was measured at a temperature of 38° C on the thermostat.

We found a *strong and constant inhibition* (mostly between 30 and 40%) by thyroxine in concentrations down to 100 γ /ml of the oxygen consumption of a system consisting of diluted homogenate 1.5% (1.5 g fresh liver/100 ml) + sodium lactate 0.04 M + DPN (1/3 mg/ml) and on the same system to which $1/6 \cdot 10^{-3}$ M sodium ascorbate was added.

No effect of thyroxine was found on the oxygen consumption of a system consisting of homogenate 1.5% + sodium succinate 0.01 M.

When cytochrome *c* was added to this system (1/6 mg/ml) thyroxine constantly *stimulated* oxygen consumption.

While the *inhibition* of the lactate systems by thyroxine showed little fluctuation the *stimulation* of the succinate-cytochrome *c* system showed large variations from 1% to 110%. The average stimulation was $27.7 \pm 7.67\%$ (experiments with 28 different homogenates).

At concentrations of thyroxine below 100 γ /ml no *constant* inhibiting effect on the lactate systems was obtained, though in some of our experiments very distinct inhibiting effects of thyroxine were observed at concentrations between 1 and 10 γ /ml.

We tested the influence of a number of other amino acids in a concentration of 100 γ /ml on the oxygen consumption of the lactate and succinate systems. No effects were observed, save for aspartic acid which in this concentration distinctly inhibited the oxygenconsumption of the succinate systems, evidently by competitive inhibition.

Stimulation of succinate oxidation by thyroxine has been described by GEMMILL³ with a succinic acid-dehydrogenase-cytochrome *c*-cytochrome-oxidase-preparation prepared from washed homogenate of rat heart; FELDT and LARDY⁴ found—in most cases—an inhibition of oxygen uptake by a washed residue of rat kidney cortex in the presence of glutamate and KREBS' cycle intermediates, while in their experiments thyroxine stimulated the oxidation of DL- β -hydroxybutyric acid.

* Supported by a subsidy from the Netherlands Organisation for Pure Scientific Research (Z.W.O.)

Evidently thyroxine affects more than one enzyme system of oxidation in tissue preparations and has a stimulating effect on some, an inhibiting effect on others.

REFERENCES

- ¹ W. RADSMA AND H. L. GOLTERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 80.
- ² S. B. BARKER, *Physiol. Reviews*, 31 (1951) 205.
- ³ C. L. GEMMILL, *J. Clin. Endocrin. and Metabolism*, 12 (1952) 1300.
- ⁴ G. FELDOTT AND H. A. LARDY, *Fed. Proceedings*, 10 (1951) 182.

Received March 3rd, 1954

ÉTUDE DES PEPTIDES DE LA PHÉNYLALANINE RÉSULTANT DE L'HYDROLYSE ACIDE ET ENZYMATIQUE DU LYSOZYME

par

R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule ne contient que trois résidus de phénylalanine par molécule¹. L'étude des peptides de la phénylalanine résultant de l'hydrolyse ménagée de la protéine est donc susceptible de fournir des enchaînements "repères" en vue d'une investigation plus complète de la structure.

Hydrolyse acide. 1 g de carbonate de lysozyme cristallisé (Armour Laboratories, Chicago) dissous dans 20 ml d'acide chlorhydrique 11 N est hydrolysé pendant 4 ou 8 jours à 37° dans les conditions décrites antérieurement². Les peptides aromatiques sont d'abord séparés des peptides non aromatiques par chromatographie sur une colonne de 1,5 g de charbon Activit 50 XP³, puis fractionnés en peptides acides, neutres et basiques par ionophorèse dans un appareil à 4 compartiments selon SANGER ET TUPPY⁴. Dans chaque fraction, les peptides de la phénylalanine sont isolés en utilisant plusieurs chromatographies sur papier (Whatman n° 1) à une dimension dans les mélanges butanol-acide formique, pyridine — collidine, et phénol tamponné à pH 4⁵. La composition est établie, après hydrolyse totale par HCl 5.7 N, au moyen de la chromatographie sur papier. Les peptides isolés ainsi sont tous des di- ou des tripeptides. L'acide aminé en position initiale a été déterminé par deux méthodes dans chaque cas: désamination⁶ et utilisation du dinitrofluorobenzène⁷. Pour les tripeptides, l'acide aminé en position terminale a été déterminé par la carboxypeptidase. Les peptides *Val. Phe* et *Lys. Val. Phe*; *Phe. Asp* et *Ser. Phe. Asp*; *Phe. Glu*, ont pu être caractérisés. Les peptides *Val. Phe* et *Lys. Val. Phe* proviennent très probablement de l'enchaînement *Lys. Val. Phe. Gly* établi par SCHROEDER au moyen de l'hydrolyse acide⁸. Les trois résidus de phénylalanine sont donc nécessaires pour tenir compte de tous les peptides déterminés.

Hydrolyse trypsique. Le lysozyme en solution aqueuse, après dénaturation par la chaleur, est laissé 24 heures à 37° à pH 7.5-8.0 au contact de la trypsine cristallisée Worthington (concentration en protéine 2%, rapport enzyme: substrat 1:100). Après élimination des grands peptides et de la protéine par précipitation par l'alcool, le liquide surnageant est concentré, chromatographié sur charbon, et les peptides de la fraction absorbée sont purifiés par chromatographie sur papier. Un tétrapeptide contenant de la phénylalanine a été ainsi isolé; sa composition en acides aminés a été établie, après hydrolyse, par la technique de MOORE ET STEIN⁹; sa structure a été déterminée par la technique de SANGER⁷ et par l'étude des fragments obtenus par hydrolyse acide; elle a été vérifiée au moyen de la méthode de dégradation récurrente d'EDMAN^{10,11}. Il s'agit du peptide *Val. Phe. Gly. Arg*.

SCHROEDER⁸ ayant montré que la molécule de lysozyme, chaîne peptidique unique, est constituée dans sa partie initiale par la séquence *Lys. Val. Phe. Gly*, le peptide *Val. Phe. Gly. Arg* ne peut que provenir de cette partie de la protéine, car dans le cas contraire, il faudrait supposer l'existence d'un quatrième enchaînement presque identique à l'enchaînement initial. En outre, en appliquant la technique d'EDMAN au lysozyme, il a été possible de confirmer que l'arginine occupe effectivement la cinquième position dans la chaîne. Ceci ressort des expériences suivantes: la protéine subit quatre dégradations successives selon EDMAN puis est copulée avec le dinitrofluorobenzène. On effectue l'hydrolyse totale de la DNP-protéine obtenue et on extrait d'abord à l'éther, puis à la méthyléthylcétone. Les dérivés dinitrophényles de chaque extrait sont purifiés par passage sur colonne d'Hyflo-supercel tamponné, puis identifiés par chromatographie sur papier^{12,13} et dosés. La dinitrophényl-arginine est présente dans l'extrait méthyléthylcétone. D'autres dérivés ont été identifiés en pro-