

The maximum inhibitory effect of *p*-hydroxyphenylpyruvic acid and homogentisic acid was produced at a concentration of 2 mM. However, in the case of these two metabolites concentrations above 4 mM were not tested. In a few experiments, tyramine was used at a concentration of 4 mM, but there was no significant inhibition. In the case of tyrosine, thyroxine and diiodothyronine, higher concentrations than indicated in the table were not tested, since they were already precipitated in the system at 2 mM.

From the data presented above and from the observations that *p*-hydroxyphenylpyruvic acid^{2,5} and homogentisic acid³ are excreted in large amount in rats fed high levels of dietary tyrosine under toxic conditions, it would appear that formation of excess *p*-hydroxyphenylpyruvic acid and homogentisic acid might play a role in the mechanism of inhibition of ascorbic acid biosynthesis in rats receiving toxic amounts of tyrosine.

However, these preliminary experiments do not define the precise mechanism of action of *p*-hydroxyphenylpyruvic acid and homogentisic acid on the inhibition of ascorbic acid biosynthesis.

Further studies on the effect of some of these tyrosine metabolites *in vivo* on the biosynthesis of ascorbic acid are under progress.

We should like to express our thanks to Dr. J. J. GHOSH for his suggestions during this work and also to the Indian Council of Medical Research for financing this work.

Department of Applied Chemistry,
University Colleges of Science and Technology,
Calcutta (India)

SUMITRA GHOSH
B. C. GUHA*

¹ S. GHOSH AND B. C. GUHA, *Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 440.

² F. W. BERNHART AND A. ZILLIKEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 462.

³ W. SCHWEIZER, *J. Physiol. London*, 106 (1947) 167.

⁴ I. B. CHATTERJEE, N. C. GHOSH, J. J. GHOSH AND B. C. GUHA, *Science*, 126 (1957) 608.

⁵ S. GHOSH, *Ph.D. Thesis*, Calcutta University, 1962.

Received December 20th, 1962

* Deceased on 20th March, 1962.

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 213-214

PN 1231

Zur Wirkung des Aethionins auf den Metabolitstatus der Rattenleber

Neuere Beobachtungen^{1,2} machen wahrscheinlich, dass die Hemmung der Proteinsynthese in der Leber durch Aethionin, das Aethyl-Analogon des Methionins, auf einer Störung des Energiestoffwechsels beruht und nicht, wie ursprünglich angenommen, auf einem direkten antagonistischen Effekt des Aethionins auf den Einbau von Methionin in Protein. Möglicherweise wird Aethionin durch das Methionin-aktivierende Enzymsystem zu S-Adenosyl-Aethionin aktiviert¹⁻³, das wegen seiner geringen Verwertbarkeit als ATP-Falle wirkt. Diese Hypothese wird durch den kürzlich von SHULL² beschriebenen ATP-Abfall in der Rattenleber nach Aethionin-Application und die Aufhebbarkeit dieses Effekts durch ATP- oder Adenin-Gaben *in vivo* beträchtlich gestützt.

Das Ziel unserer Studien war es, die Auswirkungen des Aethionin-bedingten ATP-Abfalls auf den Status von Metaboliten des Energiestoffwechsels in der Leber zu untersuchen. Weibliche, mit Standardkost ernährte Ratten (Wistar II) von 160–220 g Gewicht erhielten Aethionin intraperitoneal injiziert. Ein Teil der Tiere erhielt zusätzlich ATP subcutan. 5 h nach der ersten Aethionin-Injektion wurden die Lebern durch Frierstop *in situ* fixiert, entnommen und mit HClO_4 extrahiert⁴. Im neutralisierten Extrakt wurden die folgenden Substrate mit enzymatisch-optischen Testmethoden bestimmt: Lactat, Pyruvat, Glycerin 1-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Fructose 1,6-diphosphat, Glucose 6-phosphat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, ATP, ADP (siehe ref. 4), DPN (ref. 5), Glycerinaldehyd 3-phosphat⁶, Glucose (modifiziert nach SLEIN⁷) und AMP (ref. 8). Anorganisches Phosphat wurde nach WAHLER UND WOLLENBERGER⁹, Glycogen nach KOH-Auflösung des Gewebes, Äthanol-fällung und Säurehydrolyse¹⁰ enzymatisch als Glucose bestimmt.

Wie Tabelle I zeigt, sind die Substratgehalte in den Lebern der Aethionin-behandelten Tiere mit Ausnahme von Lactat und anorganischem Phosphat beträchtlich niedriger als in den Kontrollen. Ausser ATP sind auch die ADP- und AMP-Gehalte abgefallen, die Summe der Adenosinphosphate beträgt nur 30 % im Vergleich

TABELLE I
METABOLITGEHALTE IN DER RATTENLEBER

Aethionin: Den Versuchstieren wurde zweimal je 0.5 mg DL-Aethionin/g Körpergewicht (0.2 M in 0.9 % NaCl-Lösung, bei 37° gelöst) in 60 min Abstand intraperitoneal injiziert (n = 5). Aethionin + ATP: Bei gleicher Aethionin-Dosierung wurden 2 Stunden und 4.5 h nach der 1. Aethionin-Injektion zusätzlich je 0.16 mMol ATP subcutan injiziert (n = 2). Kontrolle: Die Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina 0.9 % NaCl-Lösung ohne Aethionin-Zusatz intraperitoneal injiziert (n = 5). Allen Tieren wurde bei Versuchsbeginn das Futter entzogen. Frierstop jeweils 5 h nach 1. Injektion. Glycogengehalt (als Glucose) in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht, alle übrigen Metabolitgehalte in $\text{m}\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. (n = Zahl der Versuche.)

	Aethionin	Aethionin + ATP	Kontrolle
Glycogen	1.1	1.2	167
Glucose 6-phosphat	27	93	377
Fructose 1,6-diphosphat	2	6	23
Dihydroxyaceton phosphat	6	17	39
Glycerinaldehyd 3-phosphat	0.7*	2	3**
3-Phosphoglycerat	169**	146	351
Phosphoenolpyruvat	76	60	111
Pyruvat	62	125	179
Lactat	2090	2410	1760
Glycerin 1-phosphat	92	166	317
ATP	492	1700	2650
ADP	416	710	861
AMP	170	324	315
Glucose	2606	4410	6740
DPN	493	687	704
P _i	3200	6900	1630***
ATP/ADP	1.2	2.4	3.1
Lactat/Pyruvat	35.8	22.1	9.6
Glycerin 1-phosphat/ dihydroxyaceton phosphat	16.0	9.8	8.2

* Einzelwert, bei den übrigen Versuchen war Glycerinaldehyd 3-phosphat nicht mehr sicher nachweisbar.

** n = 3.

*** n = 2.

zu den unbehandelten Tieren. Die Erniedrigung des ATP/ADP-Quotienten deutet auf das Absinken des energetischen Potentials in den Leberzellen hin. Bei den Metaboliten der Glycolyseketten finden sich die stärksten Veränderungen im Abschnitt zwischen Glycogen und den Triosephosphaten. Sie lassen auf einen ungenügenden Zufluss von Metaboliten in das glycolytische System schliessen. Der Abfall der freien Glucose in der Leber ist von einer Erniedrigung des Blutglucosespiegels auf 45 mg% (enzymatisch bestimmte Glucose) begleitet. Dieser Glucoseabfall und der auch von LUPU UND FARBER¹¹ beobachtete extreme Glycogenschwund weisen auf eine Hemmung der Glucose-(Glycogen-)synthese, respective der Gluconeogenese, hin. Der Anstieg der Quotienten Lactat/Pyruvat und Glycerin 1-phosphat/Dihydroxyacetonphosphat ist Ausdruck des verstärkten Reduktionszustandes des cytoplasmatischen DPN-Systems^{4,12} und kennzeichnet in Verbindung mit dem Verlust an energetischem Potential eine tiefgreifende Störung im Bereich der zelleigenen Steuerungssysteme.

Die Wirkungen des Aethionins auf den Status der Metabolite des Energiestoffwechsels in der Leber lassen sich, wie Tabelle I zeigt, weitgehend durch subcutane ATP-Injektionen verhindern. Das spricht dafür, dass die Metabolitveränderungen — wenigstens zum Teil — unmittelbare Folge des ATP-Mangels sind. Auch die Blockierung der Gluconeogenese dürfte im wesentlichen durch einen Energie-(ATP)-mangel hervorgerufen sein, da ATP-Injektionen *in vivo* das Absinken des Glucosespiegels unter Aethionin verringern. Dagegen macht der Glycogenschwund wenig wahrscheinlich, dass die von SHULL² beobachtete Phosphorylasehemmung durch Aethionin für die Alteration des Energiestoffwechsels wesentliche Bedeutung hat.

Unsere Befunde geben einen weiteren Hinweis für die schwere Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der Leber durch Aethionin, die wahrscheinlich unmittelbare Folge eines ATP-Verlustes der Zellen ist.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Physiologisch-chemisches Institut,
Marburg an der Lahn (Deutschland)

HELMUT BARTELS
HANS-JÜRGEN HOHORST

¹ S. VILLA-TREVINO UND E. FARBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 649.

² K. H. SHULL, *J. Biol. Chem.*, 233 (1962) PC 1734.

³ J. A. STEKOL, zitiert nach ref. 2.

⁴ H. J. HOHORST, F. H. KREUTZ UND TH. BUECHER, *Biochem. Z.*, 332 (1959) 18.

⁵ E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 313.

⁶ TH. BUECHER UND H. J. HOHORST, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962, S. 246.

⁷ M. W. SLEIN, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962, S. 117.

⁸ H. ADAM, *Biochem. Z.*, 335 (1961) 25.

⁹ B. E. WAHLER UND A. WOLLENBERGER, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 508.

¹⁰ C. GOOD, H. KRAMER UND M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) 485.

¹¹ C. I. LUPU UND E. FARBER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 86 (1954) 701.

¹² H. J. HOHORST, F. H. KREUTZ UND M. REIM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4 (1961) 159.

Eingegangen am 18. Januar, 1963