

Loss of Tryptophan Pyrrolase Cofactor from Liver Cytoplasmic Structures of 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene Fed Rats

The induced formation of Tryptophan pyrrolase¹ is by far the best studied model of enzyme induction in animals². It was reported recently that *L*-tryptophan administration does not increase the tryptophan pyrrolase activity in Novikoff hepatoma³ or in Dunning LC 18/81 A hepatoma⁴. According to FIALA and FIALA^{5,6}, azo-carcinogen feeding of rats strongly inhibits the *L*-tryptophan induction of tryptophan pyrrolase. In the present investigations, the induced formation of tryptophan pyrrolase in the early stages of 3-Me-4-DAB carcinogenesis was studied further.

Experiments were carried out with albino rats (100 to 200 g of body weight) fed a semi-synthetic diet containing 0.06% 3-Me-4-DAB^{7,8}. According to previous studies, this diet enhances tumour formation after a period of about 6 months⁷. Tryptophan pyrrolase was induced by *L*-tryptophan (Hoffmann-La Roche), 50–100 mg/100 g body weight, or Hydrocortisone (Schering), 2 mg/100 g body weight, given intraperitoneally. Tryptophan pyrrolase activity was determined by the method of KNOX⁹; protein-according to LOWRY et al.¹⁰.

In a first series of experiments, *L*-tryptophan and Hydrocortisone inductions of tryptophan pyrrolase activity in control and carcinogen fed animals were studied, taking into consideration the independence of these two ways of tryptophan pyrrolase induction¹¹. The results are represented in the Table. As may be seen, 3-Me-4-DAB feeding for 40 days decreases the basal level of tryptophan pyrrolase activity with 55% in comparison with controls. The induced increase of tryptophan pyrrolase is strongly reduced in the 3-Me-4-DAB group with both *L*-tryptophan^{5,6} and hydrocortisone as inducers.

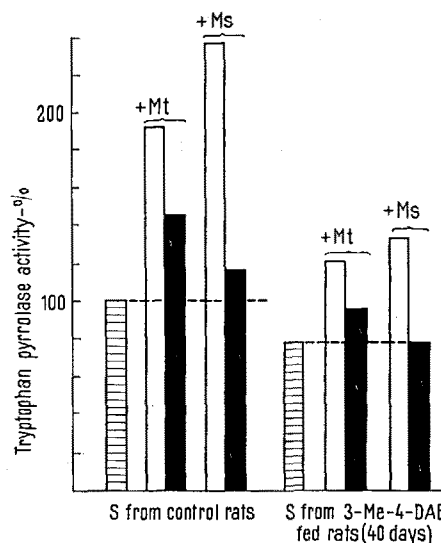
In order to localize better the early injury of liver cell structures by the carcinogen, intracellular distribution of tryptophan pyrrolase was studied. These studies were stimulated by the recent finding of GREENGARD and FEIGELSON¹² that a tryptophan pyrrolase cofactor, localized in mitochondria and microsomes, is released from these structures after induction and is responsible, at least in part, for the induced increase of tryptophan pyrrolase activity. The liver homogenate⁹ was fractionated in a MSE 'Superspeed 25' refrigerated centrifuge: nuclei (N) 10 min at 600 g; mitochondria (Mt) 20 min at 12000 g, and microsomes (Ms) 90 min at 75000 g. It was found that nuclei, mitochondria, and microsomes were devoid of tryptophan pyrrolase activity, while the 75000 g supernatant (S) has only 30–40% of the activity of the original homogenate. Addition of Mt or Ms fractions to the supernatant greatly increases its tryptophan pyrrolase activity, the level of the total homogenate being reached. A potassium chloride media was found essential for the release of tryptophan pyrrolase cofactor from cytoplasmic structures, no activation being observed with 0.25 *M* sucrose media.

The basal tryptophan pyrrolase level in the supernatant of 3-Me-4-DAB fed rats is 21% lower when compared with that of control animals. The activation of the supernatant (S) from control rats by suspensions of Mt and Ms isolated from control and 3-Me-4-DAB fed rats is represented in the Figure. The Ms and Mt concentration is the same as in the original homogenate. As may be seen, microsomes and mitochondria isolated from carcinogen fed animals are unable to increase the tryptophan pyrrolase activity of the supernatant, thus contrasting with the cytoplasmic structures from normal animals. Experiments with the

supernatant fraction from 3-Me-4-DAB fed animals (Figure) give the same results—no activation with microsomes and mitochondria from carcinogen fed rats and marked activation with Ms and Mt isolated from controls.

Rat liver tryptophan pyrrolase activity of normal and 3-Me-4-DAB fed rats

	Control animals		40 days 3-Me-4-DAB fed animals	
	Number	μM kinurenin/h/g liver	Number	μM kinurenin/h/g liver
(1) Basal level	11	8.02	5	3.65
(2) 5 h after 50 mg/100 g <i>L</i> -tryptophan	6	35.3	3	13.91
(3) 5 h after 2 mg/100 g Hydrocortisone	6	53.1	5	14.0



Effect of liver mitochondria and microsomes from normal and 3-Me-4-DAB fed rats on tryptophan pyrrolase activity of the 75000 g supernatant. □ Basal level of the 75000 g supernatant (S) from rat liver homogenates. The activity of the S from normal rats taken as 100. □ Addition of suspensions of mitochondria (Mt) or microsomes (Ms) isolated from normal rat liver. ■ Addition of Mt and Ms isolated from 40 days 3-Me-4-DAB fed rats. For further details see text.

- 1 T. TANAKA and W. E. KNOX, *J. biol. Chem.* **234**, 1162 (1959).
- 2 W. E. KNOX, V. H. AUERBACH, and E. C. C. LIN, *Physiol. Rev.* **36**, 164 (1956).
- 3 S.-K. CHAN and D. E. KIZER, *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **3**, 11 (1959).
- 4 H. G. PITOT, C. H. FOHN, W. H. CLARK, and E. FARBER, *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* **3**, 52 (1959).
- 5 S. FIALA and A. E. FIALA, *Nature* **183**, 1532 (1959).
- 6 S. FIALA and A. E. FIALA, *Brit. J. Cancer* **13**, 236 (1959).
- 7 A. A. HADJIOLOV, *Bull. Inst. Morphol. Acad. Sci. Bulgarie* **2**, 423 (1957).
- 8 A. A. HADJIOLOV, *Z. Krebsforsch.* **62**, 361 (1958).
- 9 W. E. KNOX, in *Methods in Enzymology*, S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, Eds., 1955, vol. 2, p. 242.
- 10 O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 11 M. CIVEN and W. E. KNOX, *J. biol. Chem.* **234**, 1787 (1959).
- 12 O. GREENGARD and P. FEIGELSON, *Biochim. biophys. Acta* **39**, 191 (1960).

The latter results show that the apoenzyme of tryptophan pyrrolase, localized in the supernatant, is not appreciably damaged in the early stages of 3-Me-4-DAB cancerogenesis. It must be noted that in all cases Mt isolated from cancerogen fed rats show some activating effect, while Ms are completely ineffective. This would suggest a more severe damage of microsomes than of mitochondria.

Similar experiments on supernatant activation were performed with prealably *L*-tryptophan induced tryptophan pyrrolase. Cell fractionation and tryptophan pyrrolase activity determinations were made 5 h after inductors application. The results of these experiments show that addition of Ms and Mt from normal rats increases the tryptophan pyrrolase activity of the S fraction isolated from either control or 3-Me-4-DAB fed rats. On the other hand, Mt and more markedly Ms, isolated from cancerogen fed animals, are almost completely devoid of such activity.

The results reported in this work show that in the early stages of rat liver cancerogenesis induced by 3-Me-4-DAB, liver cell microsomes and mitochondria are damaged in such a way that they lose their tryptophan pyrrolase cofactor. It is possible that lipoprotein membranes of ergastoplasm (microsomes) and mitochondria are the first cellular structures damaged by the cancerogen. This

damage determines subsequent changes in the permeability of cytoplasmic structures as revealed by changes in swelling^{13,14} and loss of cofactors¹⁵. Our results are consistent with the representation that structural damage to ergastoplasm and mitochondria is the cause of the metabolic changes in cancerogenesis.

Résumé. L'ingestion du cancérigène 3-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène pendant 40 jours inhibe fortement l'induction de la tryptophane pyrrolase du foie des rats causée par le *L*-tryptophane ou bien l'hydrocortisone. Les auteurs montrent que cet effet est dû à la perte du cofacteur de la tryptophane pyrrolase des mitochondries et des microsomes des animaux soumis au régime alimentaire cancérigène.

A. A. HADJIOLOV and M. D. DABEVA

Department of Biochemistry, Higher Medical Institute, Sofia (Bulgaria), March 27, 1961.

¹³ J. C. ARCOS and M. ARCOS, *Biochim. biophys. Acta* 28, 9 (1958).

¹⁴ J. C. ARCOS, G. W. GRIFFITH, and R. W. CUNNINGHAM, *J. biophys. biochem. Cytol.* 7, 49 (1960).

¹⁵ S. WEINHOUSE, *Adv. Cancer Res.* 3, 269 (1955).

Das Coenzym A in leukämischem Blut

Im Blut von leukämischen Individuen, vor allem in solchen mit myeloischer Leukämie, wurde eine Erhöhung der Sulfonamid- und Paraminobenzoesäure-acetylierenden Wirkung festgestellt, die sowohl *in vitro*¹ als auch *in vivo*² nachweisbar war. Es schien interessant, den Gehalt von Coenzym A im Blut von leukämischen und normalen Personen zu bestimmen, um festzustellen, ob man bei den ersteren eine der acetylierenden Wirkung entsprechende Erhöhung erhielt. Eine vorläufige Mitteilung über dieses Problem wurde von uns schon veröffentlicht³. Weitere Untersuchungen wurden zur Bestätigung, ob die Zunahme des Coenzym-A-Gehaltes vorwiegend im Plasma oder in den Blutkörperchen und in einer besonderen Gruppe derselben stattfindet, unternommen.

Die Bestimmung von Coenzym A wurde mikrobiologisch mit *Lactobacillus arabinosus* 17-5 nach Abspaltung des gebundenen Pantethins durch alkalische Phosphatase^{3,4} durchgeführt. Wir untersuchten 8 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, 4 mit chronischer lymphatischer Leukämie und 2 mit subakuter Retotheliose. Zum Vergleich wurde das Blut von 11 gesunden Individuen untersucht.

Die Ergebnisse der Coenzym A-Bestimmungen (Mittelwerte der verschiedenen Gruppen) sind in Tabelle I zusammengestellt. Das Vorhandensein eines höheren Coenzym A-Gehaltes im Blut von leukämischen Personen, im Vergleich zu demjenigen von Normalen und Kranken mit anderen Leukämieformen ist deutlich. Ein Vergleich des Coenzym A-Gehaltes im Vollblut, Plasma und Blutzellenanteil (durch Zentrifugieren erhalten) zeigte, dass die grösste Menge des Coenzym A in den Blutkörperchen enthalten ist (Tabelle II). Der Anteil von Coenzym A im Plasma, sei es bei normalen oder bei leukämischen Subjekten, erwies sich als niedriger als derjenige im Vollblut, gelegentlich mag das Plasma mit Thrombozyten verunreinigt gewesen sein.

Die Trennung der Leucozyten, durchsetzt mit einer gewissen Anzahl von Thrombozyten, mittels Differenzial-zentrifugation erlaubte festzustellen, dass der grösste An-

teil von Coenzym A in diesen Elementen und nicht in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Zusatz einer aus dem Vollblut abzentrifugierten gleichen Anzahl von Leucozyten zum Plasma führte zu Coenzym A-Werten in derselben Höhe wie beim Gesamtblut und eine weitere Zugabe von Leucozyten zu einer proportionalen Erhöhung des Coenzym A-Gehaltes. Es war nicht möglich, eine Korrelation zwischen der Anzahl der Leucozyten oder besonderer Formen derselben und der Höhe des Coenzym A-Gehaltes des Blutes nachzuweisen.

Tab. I. Mittel aus den Mittelwerten der einzelnen Fälle

	Fälle	Anzahl der Bestimmungen	γ CoA/ml	t-Test (I→) <i>p</i>
I Normale	11	11	$1,52 \pm 0,38$	
II Leukämien	14	22	$5,29 \pm 0,63$	< 0,001
II a Myelämien	8	14	$6,89 \pm 0,55$	< 0,001
II b andere Leukämien	6	8	$3,15 \pm 0,55$	< 0,05

Tab. II. Coenzym A-Gehalt in γ /ml

	Gesamtblut	Plasma
Leukämien	7,80	3,40
Normalblut	2,48	1,35

¹ G. SALVI, U. AMBANELLI, G. ROSATI und R. STARCICH, *Haematologica* (Pavia) 43, 1051 (1958).

² U. AMBANELLI, G. SALVI und R. STARCICH, *Sangre* 2, 213 (1957).

³ U. AMBANELLI, F. BONATI und G. SALVI, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 35, 2100 (1959).

⁴ Wir danken RAETIA ZUERN für die Durchführung der mikrobiologischen Bestimmungen.