

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Liver DNA and RNA in Pantothenic Acid Deficiency¹

Little is known about the relationship between pantothenic acid and nucleic acid metabolism. An earlier report by SURE and FORD² suggested that in pantothenic acid-deficient rats no change of purine nitrogen in the urine could be detected. On the other hand, it has been claimed that pantothenic acid could play a role in the synthesis of various C₁ compounds, like the methyl groups³ and the ureido groups of purines, uric acid and formate, via the succinate-glycine cycle of SHEMIN⁴.

These observations suggested a study of the effect of dietary pantothenic acid on the incorporation of P³²-labelled phosphate into rat liver nucleic acids. In fact, nucleoprotein synthesis is in part related to the metabolism of C₁ compounds. The results of the study are presented here.

Materials and methods. Male albino rats of the Wistar strain weighing 45–50 g were divided into two groups of 12 animals each.

Rats in group 1 received the pantothenic acid-deficient diet⁵ composed of vitamin-free casein, sucrose, corn oil, cystine, choline chloride and mineral and vitamin supplements, excluding Ca-pantothenate. The other group was kept on the same diet supplemented with 10 mg of Ca-pantothenate per kg of diet.

At the end of the experiment (10 weeks) six animals of each group were injected intraperitoneally with 0.5 mC of P³²-labelled phosphate. The rats were killed after 8 h and the livers were used for the measurement of the incorporation of P³²-phosphate into liver RNA and DNA, as described previously⁶.

The radioactivity was determined in a well-type scintillation counter. The specific radioactivity of each sample was calculated as the biological concentration coefficient⁷.

$$\frac{\text{Counts/min/mg of RNA (or DNA)} \cdot 100}{\text{Administered counts/min/g of body weight}}$$

The values reported in this paper refer to the relative specific radioactivity, which is defined as follows:

$$\frac{\text{Biological concentration coeff. of RNA (or DNA)} \cdot 100}{\text{Biological concentration coeff. of acid-soluble phosphorus.}}$$

The total relative radioactivity is defined as the amount of RNA (or DNA)/g of fresh liver multiplied by its relative specific radioactivity.

The livers of remaining animals of each group were saved for the determination of the content of RNA and DNA, by a method detailed by SCHNEIDER⁸. The data have been analysed by statistical procedure.

Results. It appears from Table I that no significant changes in the content of DNA and RNA per unit weight of fresh tissue were present in the livers of rats that had received the pantothenate-deficient diet, as compared with the pantothenate-fed rats.

Table II shows that no difference was found in the incorporation of P³²-phosphate into liver DNA, while the incorporation of radiophosphate into liver RNA in the rats given pantothenic acid was higher ($P < 0.001$).

The increase of liver RNA turnover in the pantothenate-fed animals, when RNA content was not increased, is difficult to explain. Since in the biosynthetic pattern of nucleic acid no reaction requiring CoA derivatives is known to date, and since the participation of formyl-CoA in tetrahydrofolate activation or, more

Table I. Effect of pantothenic acid on the content of nucleic acids in rat liver

Group	Supplement to diet	RNA	DNA
mg/g of liver			
1	None	12.44 ± 0.14	2.04 ± 0.064
2	Ca pantothenate 10 mg/kg of diet	13.12 ± 0.11	2.17 ± 0.021

¹ This investigation was supported by a grant from the CNR, Roma.

² B. SURE and Z. W. FORD, *J. Nutrition* 24, 405 (1942).

³ J. A. STEKOL, *Symposium on Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 509.

⁴ A. M. NEMETH, C. S. RUSSEL, and D. SHEMIN, *J. biol. Chem.* 229, 415 (1953).

⁵ J. J. BARBORIAK, W. A. KREHL, and G. R. COWGILL, *J. Nutrition* 67, 13 (1957).

⁶ M. MARCHETTI, C. M. CALDARERA, and P. PUDDU, *Biochem. J.* 92, 46 (1964).

⁷ J. SCHULMAN and M. FALKENHEIM, *Nucleonics* 3, 13 (1950).

⁸ W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* 164, 747 (1946).

Table II. Effect of pantothenic acid on the incorporation of P³²-phosphate into the nucleic acids of rat liver

Group	Supplement to diet	RNA Relative specific radioactivity	Total relative radioactivity	DNA Relative specific radioactivity	Total relative radioactivity
1	None	4.45 ± 0.20	55.37 ± 4.07	0.63 ± 0.08	1.29 ± 0.13
2	Ca pantothenate 10 mg/kg of diet	5.98 ± 0.17	78.40 ± 2.19	0.64 ± 0.06	1.39 ± 0.09

generally, in the synthesis of C_1 compounds^{9,10} still remains to be demonstrated¹¹, it follows that the increase of RNA turnover is to be tentatively interpreted on the basis of an indirect action of the vitamin.

Pantothenic acid might increase liver RNA turnover through its action on carbohydrate and lipid metabolism. In fact, it has been shown that the total number of phosphorus atoms incorporated into RNA is increased by raising energy intake in the diet¹². This is in agreement with the in vitro studies of HENDERSON and LEPAGE¹³ on the necessity of glucose as a source of energy for purine synthesis.

Riassunto. È stato studiato nel ratto mantenuto a dieta carente di acido pantotenico l'effetto della somministrazione dietetica della vitamina sul contenuto ed il turnover degli acidi nucleinici del fegato. L'acido pantotenico non influenza il contenuto degli acidi nucleinici e l'incorporazione del P^{32} nel DNA, mentre provoca un aumento del-

l'incorporazione del P^{32} nell'RNA, interpretato come un'azione indiretta della vitamina.

P. PUDDU, R. BUDINI,
and C. M. CALDARERA

*Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Bologna
(Italy), August 6, 1964.*

⁹ L. JAENICKE and E. BRODE, *Biochem. Z.* 334, 108 (1961).

¹⁰ H. NAKAGAWA, F. SUZUKI, and Y. TAKEDA, *J. Biochem. (Tokyo)* 49, 191 (1961).

¹¹ W. S. SLY and E. R. STADTMAN, *J. biol. Chem.* 238, 2639 (1963).

¹² H. N. MUNRO, D. J. NAISMITH, and T. W. WIKRAMANAYAKE, *Biochem. J.* 54, 198 (1953).

¹³ J. E. HENDERSON and G. A. LEPAGE, *J. biol. Chem.* 234, 2364 (1959).

Über die Freisetzung von Katecholaminen durch Thrombin

Nachdem wir in vorangegangenen Arbeiten^{1,2} die durch Thrombin ausgelöste Serotoninabgabe aus den Blutplättchen untersucht hatten, versuchten wir die Frage zu klären, ob das Gerinnungsferment Thrombin auch an anderen Objekten eine Freisetzung biogener Amine bewirken kann. Die pharmakologische Analyse der positiv inotropen Wirkung des Thrombins am isolierten Froschherzen³ hatte bereits zu der Vermutung geführt, dass diese Thrombinwirkung über eine Freisetzung von Katecholaminen aus dem chromaffinen Gewebe zustande kommen könnte.

Wir haben daher geprüft, welchen Einfluss das Thrombin auf die Aminabgabe aus der isoliert durchströmten Nebenniere hat. Zu diesem Zweck wurden frisch präparierte Rindernebennieren nach dem von SCHÜMANN et al.⁴ beschriebenen Verfahren mit sauerstoffgesättigter Tyrodelösung unter einem Druck von 40 cm H_2O -Säule bei 37°C retrograd durchströmt. Das aus einer etwa 2 mm tiefen Inzision ausfließende Perfusat (durchschnittlich 1 ml/min) wurde jeweils 10 min lang gesammelt und zur Eiweißfällung mit 3,5% konzentrierter Perchlorsäure versetzt. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurde die Lösung mit 10%iger K_2CO_3 -Lösung auf pH 6,0 gebracht und der Gehalt an Katecholaminen kolorimetrisch nach der Methode von EULER und HAMBERG⁵ gemessen. Nachdem die Spontanfreisetzung in einer Vorlaufperiode bestimmt worden war, wurde 10 min lang mit einer thrombinhaltigen Tyrodelösung durchströmt und danach die Durchströmung wieder mit normaler Tyrodelösung fortgesetzt. Als Thrombinpräparat wurde hochgereinigtes Rinderthrombin, gewonnen nach SEEGER⁶, mit einer spezifischen Aktivität von 2100 NIH-E/mg verwandt. Das Ergebnis der Versuche ist in der Figur zusammengefasst.

Demnach kommt es bereits nach vorübergehender Durchströmung mit 100 NIH-E Thrombin/ml zu einem deutlichen Anstieg der Katecholaminabgabe aus der Nebenniere. Bei Erhöhung der Thrombinkonzentration

auf 300 NIH-E/ml erreicht die Aminabgabe das Dreifache der Ruhefreisetzung. Die Inaktivierung des Fermentes durch Bindung an den spezifischen Thrombininhibitor Hirudin⁷ hatte auch eine Blockade der aminfreisetzenden Wirkung des Thrombins zur Folge.

Von den zum Vergleich geprüften proteolytischen Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Papain und Plasmin hatte nur das Trypsin in einer Konzentration von 0,5 mg krist. Trypsin/ml eine gleichartige Wirkung.

Wir haben ferner untersucht, ob durch Einwirkung von Thrombin auf die isolierten Granula des Nebennierenmarks vom Rind eine Freisetzung von Katecholaminen ausgelöst wird. Die Isolierung und Inkubation der Granula sowie die Bestimmung der Adrenalin- und Noradrenalinabgabe erfolgte nach der von SCHÜMANN und WEIGMANN⁸ beschriebenen Methode. Im Gegensatz zu den Versuchen an der Nebenniere bewirkte Thrombin keine signifikante Erhöhung der Aminabgabe aus den in calciumfreier und calciumhaltiger Lösung suspendierten chromaffinen Granula des Nebennierenmarks. Auch die Erhöhung der Thrombinkonzentration auf 500 NIH-E/ml brachte keine Änderung des Ergebnisses. Der Angriffspunkt für die aminfreisetzende Wirkung des Thrombins kann demnach

¹ F. MARKWARDT und W. BARTHEL, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 249, 176 (1964).

² F. MARKWARDT, W. BARTHEL und A. HOFFMANN, *Naturwissenschaften*, im Druck.

³ F. MARKWARDT, K.-O. HAUSTEIN und W. NUERNBERGK, *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 12, 262 (1964).

⁴ H. W. HAAG, A. PHILIPP und H. J. SCHÜMANN, *Exper.* 17, 187 (1961).

⁵ U. S. v. EULER und U. HAMBERG, *Acta physiol. scand.* 19, 74 (1949).

⁶ W. H. SEEGER, W. G. LEVINE und R. S. SHEPPARD, *Canad. J. Biochem.* 36, 603 (1958).

⁷ F. MARKWARDT, *Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blut-saugenden Tieren* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963).

⁸ H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 240, 275 (1960).