

with rhodamine 6 G, ninhydrin (0.4% in acetone:lutidine 9:1 v/v), phosphomolybdic acid — stannous chloride, and I_2 vapours⁴⁾. Radioactivity was determined in each spot and phospholipids were eluted with 1 N methanolic HCl. Eluates from each spot were combined separately, evaporated to dryness *in vacuo* and analyzed for phosphorus. Phosphorus values were corrected for paper blanks treated similarly.

The effect of hypervitaminosis A on rat plasma phospholipids is shown in the table. Percentage composition of rat plasma phospholipids is in agreement with that reported by NEWMAN et al.⁵⁾. The distribution of plasma phospholipids is not affected in hypervitaminosis A, but their specific activities show a change when compared to control group. An decrease is noted in the turnover rates of phosphatidyl ethanolamine, lecithin, and sphingomyelin where as lysolecithin showed a greatly increased incorporation of $^{32}P_i$ in hypervitaminosis A rats as compared to the control group (Table). Whether these

Table. Effect of hypervitaminosis A on rat plasma phospholipids

Substance ^{a)}	Control ^{b)}		Experimental ^{b)}	
	% PLP ^{c)}	sp.act. ^{d)}	% PLP ^{c)}	sp.act. ^{d)}
Phosphatidyl ethanolamine	5.86	375.5	6.34	273
Lecithin	66.52	192.5	65.59	133
Sphingomyelin	10.48	141.5	9.25	107
Lysolecithin	17.05	190.5	16.95	305

a) Substances separated by silicic acid impregnated paper chromatography. — b) All values are average of two experiments done in duplicate. — c) % total PLP. — d) Specific activities in counts/min/ μ g P.

changes on plasma phospholipids are brought about directly by the toxicity of vitamin A or result due to an indirect and unspecific reaction of vitamin A is not certain.

Technical assistance of Mr. N. SRIVASTAVA is acknowledged.

Department of Radioisotopes and Biochemistry, V. P. Chest Institute, University of Delhi, Delhi-7, India

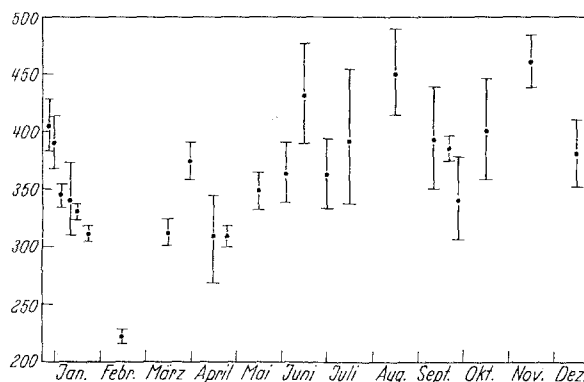
U. K. MISRA

Eingegangen am 13. März 1965

¹⁾ MISRA, U. K.: Naturwissenschaften 52, 188 (1965). — ²⁾ MISRA, U. K.: Ind. J. Biochem. 1, 95 (1964). — ³⁾ BARTLETT, G. R.: J. Biol. Chem. 234, 466 (1959). — ⁴⁾ MARINETTI, G. V., J. ERBLAND, and J. KOCHEN: Federation Proc. 16, 837 (1957). — ⁵⁾ NEWMAN, H. A. I., C. T. LIU, and D. B. ZILVERSMIT: J. Lipid Res. 2, 403 (1961).

Jahreszeitliches Verhalten der LD 50 von Na_2 -Ädta

Zur Frage der Reproduzierbarkeit einer LD 50 wurde in den Jahren 1961—1964 23mal die subcutane LD 50 von Na_2 -Äthylendiamintetraacetat (Na_2 -Ädta) ermittelt. Insbesondere interessierte, ob eine jahreszeitliche Abhängigkeit

Fig. 1. Subcutane LD 50 von Na_2 -Ädta in Abhängigkeit von der Jahreszeit

der Wirksamkeit dieses im Organismus vornehmlich auch Calcium bindenden Chelatbildners vorliegt, zumal für den Calcium-Phosphat-Stoffwechsel jahreszeitliche Schwankungen nachgewiesen werden konnten¹⁾. Als Versuchstier diente die bei gleichmäßiger Ernährung gehaltene weiße Maus aus institutseigener Zucht. Pro LD 50 wurden durchschnittlich etwa

30 bis 36 männliche Tiere verwendet; injiziert wurde Na_2 -Ädta in 5%iger Lösung vormittags zwischen 8 und 13 Uhr. Berechnung nach LITCHFIELD und WILCOXON²⁾.

Ergebnisse. Die LD 50 ergab sich im Durchschnitt für alle 23 Bestimmungen zu 363 mg/kg (Vertrauensintervall 338 bis 390). Der niedrigste Wert betrug 221 mg/kg (215 bis 228), der höchste 460 mg/kg (438 bis 483). Bei Zuordnung der LD 50 zur Jahreszeit finden sich nach Fig. 1 die niedrigsten Werte im Frühjahr, die höchsten im Sommer und im Herbst; für Januar bis Mai beträgt der Durchschnitt 333 mg/kg (316 bis 349; $f=10$), für Juni bis Dezember 402 mg/kg (380 bis 427; $f=13$). Ein ähnlich jahresrhythmisches Verhalten wurde für die Wirksamkeit toxischer und durch hohe Gaben von $CaCO_3$ potenziert antirachitischer Dosen Vitamin D_2 an Ratte und Maus erhalten, während antirachitische D-Dosen allein an Ratten in ihrer Wirksamkeit von der Jahreszeit unabhängig waren¹⁾. Wenn man davon ausgeht, daß der Tod im tetanischen Anfall nach Na_2 -Ädta allein auf Hypocalcämie beruht, würden unsere Ergebnisse bedeuten, daß im Frühjahr im Organismus der Maus, vielleicht durch Überwiegen der Knochen aufbauenden Sexualhormonwirkung zu dieser Jahreszeit, Calcium erschwert, im Sommer und Herbst dagegen leichter und schneller aus dem Calciumpool zur Verfügung gestellt werden kann. Ob dies so ist oder ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, wird durch detailliertere Untersuchungen abzuklären sein.

Pharmakologisches Institut der Universität, Halle (Direktor: Prof. Dr. K. POHLE)

H. BEKEMEIER

Eingegangen am 11. März 1965

¹⁾ BEKEMEIER, H., u. A. BENAD: Intern. Z. Vitaminforsch. (im Druck). — ²⁾ LITCHFIELD, J. T., u. F. WILCOXON: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 96, 99 (1949).

Über den Einfluß von NADPH₂-NAD-Transhydrogenase auf die direkte Oxydation der Glukose; Versuche unter Verwendung von Homogenaten des Ehrlich-Ascitestumors

Die Oxydation von Glukose über den Pentosephosphat-Zyklus führt zur Hydrierung von NADP und damit zu einer Bereitstellung von Wasserstoff für zelluläre Synthesen. Bei Vorhandensein einer Pyridinnucleotid-Transhydrogenase besteht die Möglichkeit einer Übertragung des Wasserstoffes von NADPH₂ auf NAD und damit dessen Verwertung für die ATP-Gewinnung in der Endoxydation. Das Ausmaß der direkten Glukoseoxydation ist vom Vorhandensein des primären Wasserstoffakzeptors NAD abhängig. Da in den meisten Fällen neben NADH₂ auch NAD vorzufinden wird, jedoch fast ausschließlich nur NADPH₂, kann man erwarten, daß in Zellen mit fehlender oder wenig aktiver Pyridinnucleotid-Transhydrogenase nach Zugabe dieses fermentes NADPH₂ dehydriert wird und dadurch eine Aktivierung der Glukoseverwertung über den Pentosephosphat-Zyklus erfolgt. Bei Verwendung von Glukose-1-¹⁴C müßte bei derartigen Zellen nach Zugabe von Transhydrogenase die Menge an anfallendem ¹⁴CO₂ zunehmen. Eine Prüfung der erwähnten Überlegungen erschien dann durchführbar, wenn unter anaeroben Bedingungen und Zusatz von NAD einem Zellhomogenat oder dem Überstand des letzteren nach hochtouriger Zentrifugierung Pyridinnucleotid-Transhydrogenase zugegeben wird.

Versuchsanordnung: 0,5 g Ehrlich-Asciteszellen der Maus wurden 20 sec im Homogenisator nach MERKENSCHLAGER homogenisiert (0,25 m Saccharose, 0,002 m EDTA). Zentrifugieren bei 3000 g ergab das Homogenat, bei 96000 g den Überstand, die beide mit Transhydrogenase (EC 1.6.1.1.) und Glukose-1-¹⁴C eine Stunde bei 30° in N₂-Atmosphäre inkubiert wurden. Milieu: 0,05 m Tris-0,02 m Phosphat, pH 7,4, 0,002 m EDTA, 0,015 m KCl, 0,005 m MgSO₄, 0,006 m ATP, 9 E Hexokinase. Die Transhydrogenase wurde nach KAPLAN¹⁾ oder einer eigenen noch unveröffentlichten Methode gewonnen. Pro Ansatz wurden 20 μ M Glukose mit einer C-1-Aktivität von 0,4 μ C (8,8 · 10⁵ dpm) eingesetzt. Endvolumen 2,5 ml.

Tabelle. Direkte Glukoseoxydation im Überstand

NAD*) . .	—	—	0,06	6,0	0,6	6,0	6,0	6,0
TrH . . .	—	0,10	—	—	0,10	0,001	0,01	0,10
Gluk . . .	0,002	0,005	0,012	0,016	0,019	0,019	0,023	0,065

*) NAD in μ M pro Ansatz; TrH = Transhydrogenaseaktivität in μ M NADPH₂/min pro Ansatz; Gluk = Glukose-C-1-Umsatz in μ M CO₂.

Die angegebenen Werte zeigen, daß für eine nennenswerte Glukose-C-1-Dehydrierung NAD notwendig ist und daß bei Gegenwart von NAD der Glukoseumsatz durch Transhydrogenase auf fast den fünffachen Wert gesteigert wird.

In den Homogenaten wurden nach Zusatz von NAD und Transhydrogenase analoge, wenn auch geringere Effekte festgestellt. Transhydrogenase allein bewirkt eine Senkung der direkten Glukoseoxydation, während thermisch inaktiviertes Enzym nicht hemmt. Das deutet auf einen NADP-Mangel, der vielleicht dadurch verursacht wird, daß es zu einem „Rückstau“ des aus glykolytischen Prozessen stammenden Wasserstoffes und als Folge einer Umkehr der Wasserstoffübertragung zu einer zusätzlichen Hydrierung von NADP kommt.

Auf Grund unserer Befunde ist anzunehmen, daß Ehrlich-Ascites-Tumorzellen entweder keine Transhydrogenase enthalten oder das Enzym wegen seiner Lokalisierung in den Mitochondrien für den Shunt nicht verfügbar ist. Dem entspricht auch die Beobachtung von WENNER et al.²⁾, wonach der 40000 g-Überstand von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen keine Pyridinnucleotid-Transhydrogenasen enthält.

Institut für medizinische Chemie, Wien 9, Währingerstraße 10, und Österreichisches Krebsforschungsinstitut, Wien 9, Borschkegasse 8a

F. SEELICH, F. SALVENMOSER und R. KRAMAR

Eingegangen am 13. März 1965

¹⁾ KAPLAN, N.O., S.P. COLOWICK u. E.F. NEUFELD: J. Biol. Chem. 205, 1 (1953). — ²⁾ WENNER, C.E., J.H. HACKNEY u. F. MOLITERNO: Cancer Research 18, 1105 (1958).

Kathepsin-Bestimmung im Serum bei lathyrischen und mit Prednison behandelten lathyrischen Ratten

Bei lathyrischen Ratten folgt einer zunächst stark beschleunigten Synthese der Kollagenmolekel ein verstärkter Abbau allein auf Kosten der neu synthetisierten Kollagenfraktion. Die Ursache liegt in einer Blockierung der inter- und intramolekularen Bindungen und damit in einer Hemmung des Übergangs vom neu synthetisierten Kollagen zum unlöslichen Kollagen durch β -Amino-propionitril (BAPN), dem Wirkstoff aus *Lathyrus odoratus*¹⁾. Auf Grund dessen erfolgt ein verstärkter Abbau des neu synthetisierten Kollagens, worauf auch eine gesteigerte Hydroxyprolinausscheidung im Urin hinweist²⁾, da eine Stabilisierung der Dreikettenstruktur durch Zusammenlagerung der Kollagenmolekel zu Aggregaten oder Fibrillen verzögert ist. Bei Körpertemperatur von 37° sind aber gelöste Kollagenmolekel gegen Kathepsine nicht beständig³⁾.

Im folgenden sollte nun untersucht werden, inwieweit bei diesem gesteigerten Kollagenabbau unter Umständen eine erhöhte Aktivität von Gewebsproteasen, hier insbesondere der Kathepsine, eine Rolle spielt. Da eine vermehrte Kathepsinaktivität in der Nachbarschaft von Tumorgewebe⁴⁾,⁵⁾ sich auch im Serum widerspiegelt⁶⁾, versuchten wir durch Serum-Kathepsin-Bestimmungen bei lathyrischen Ratten einen Anhalt über eine solche Erhöhung der Gewebsproteasen zu erlangen. Durch die gleichzeitige Gabe von BAPN und Prednison sollte festgestellt werden, ob eine etwaige Steigerung dieser Enzymaktivität durch Prednison unterdrückt werden kann.

Tierversuche. 160 \pm 25 g schwere weibliche Albinoratten wurden in 3 Gruppen eingeteilt. Gruppe 1: 6 Kontrolltiere erhielten pro Tag 10 g Altromin + 10 g Hackfleisch; Gruppe 2: 6 Tiere mit derselben Diät unter Zusatz von 0,2% BAPN/die; Gruppe 3: 5 Tiere mit gleicher Diät wie Gruppe 2 unter Zusatz von 0,5 mg Prednison*/die. Nach 17 Tagen erfolgte die Gewinnung des Serums.

Die Kathepsinbestimmung im Serum erfolgte nach der Methode von ANSON⁷⁾. Die Kathepsinaktivität wurde in Milliäquivalent freigesetztes Tyrosin/ml Serum unter den Versuchsbedingungen von ANSON angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Testes überprüft.

Ergebnisse und Besprechung. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, findet sich im Serum von mit BAPN behandelten Ratten eine signifikante Erhöhung der Kathepsinaktivität ($p < 0,005$). Demnach wäre bei lathyrischen Ratten nicht allein eine Blockierung der inter- und intramolekularen Quervernetzung vorhanden, sondern auch eine vermehrte Aktivität von Gewebsproteasen, die zusätzlich an dem starken Abbau des neu synthetisierten Kollagens beteiligt sind.

Weiterhin konnte die Erhöhung der Kathepsinaktivität durch Prednison unterdrückt werden. Dieser Befund steht allgemein mit den Anschauungen über die Einwirkung von Corticosteroiden auf die Alterung bzw. Reifung des Kollagens in Einklang⁸⁾.

Hautklinik der Universität, Mainz (Direktor: Prof. Dr. G.W. KORTING)

H. HOLZMANN, G.W. KORTING und B. MORSCHES

Eingegangen am 1. März 1965

^{*} Ultracorten®, Fa. Ciba A.G., Wehr (Baden).

¹⁾ KÜHN, K., M. DURUTTI, P. IWANGOFF, F. HAMMERSTEIN, K. STECHER, H. HOLZMANN u. G.W. KORTING: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 4—12 (1964). — ²⁾ MARTIN, G.R., S.E. Mergen-Hagen u. D.J. Prockop: Nature 191, 1008 (1961). — ³⁾ FRANKLAND, D.M., u. C.H. WYNN: Biochem. J. 84, 20 P (1962). — ⁴⁾ BENZ, G.: Oncologia 12, 128—142 (1959). — ⁵⁾ HOLMBERG, B.: Acta Unio Intern. contra Cancrum 18, 236—237 (1962). — ⁶⁾ LIBENSON, L., u. J. MILTON: Cancer 10, 1004—1007 (1957). — ⁷⁾ ANSON, M.L.: J. Gen. Physiol. 20, 565—574 (1937). — ⁸⁾ KÜHN, K., P. IWANGOFF, F. HAMMERSTEIN, K. STECHER, M. DURUTTI, H. HOLZMANN u. G.W. KORTING: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 337, 249—256 (1964).

Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Aminosäuren in die Samenblasen- und Thymusproteine unreifer Ratten

Über den Einfluß von Testosteron auf den Einbau von Aminosäuren in die Proteine von Sexualorganen und einigen anderen Organen kastrierter Ratten und Mäuse wurde während der letzten Jahre eine Reihe von Arbeiten durchgeführt^{1—3)}. Wir interessieren uns wegen der andersartigen physiologischen Situation für den Einfluß des Testosterons auf die Organe

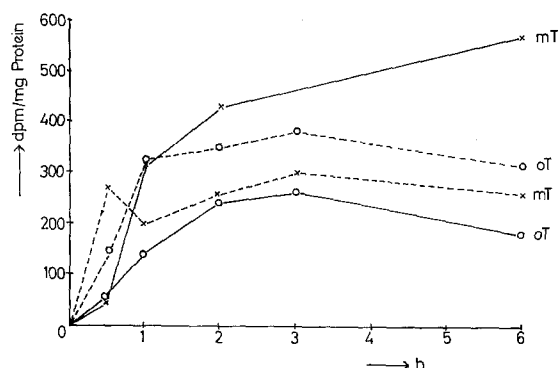


Fig. 1. Einfluß von Testosteron auf den zeitlichen Verlauf des Einbaus von L-Histidin-2-ring-¹⁴C in die Proteine von Samenblasen und Thymus unreifer Ratten (30 d). 50 μ g Testosteron zu 5 Tagesdosen à 100 μ g/0,2 ml Sesamöl; 2 μ g L-Histidin-2-ring-¹⁴C/0,5 ml H₂O am Versuchstage; 15 h vor Histidininjektion wurden Tiere auf Hunger gesetzt; je 3 Versuche. — Samenblasenprotein; — Thymusprotein; oT = ohne Testosteron, mT = mit Testosteron

unreifer⁴⁾ anstatt kastrierter Tiere. Bei unreifen Tieren beschleunigt dieses Hormon die natürliche Entwicklung, bei kastrierten hebt es die unnatürliche Rückbildung wieder auf. Wir wählten Hungertiere, um Anhaltspunkte über den Ursprung der Aminosäuren zu bekommen, die zur Synthese der Proteine von Sexualorganen verwendet werden.

Methodisches. 25 Tage alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten (60 \pm 10 g) wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen je 100 μ g Testosteron/0,2 ml Sesamöl subcutan und am Versuchstage 2 μ g L-Histidin-2-ring-¹⁴C/0,5 ml H₂O (spez. Aktivität: 22 μ Ci/ μ M) intraperitoneal injiziert. Der Einbau dieser Aminosäure in die Proteine von Samenblasen und Thymus wurde über eine Periode von 6 h verfolgt. Die Proteine isolierten wir nach HAUSCHILDT und GROSSMANN⁵⁾. Die Radioaktivität der Proteine wurde mit Hilfe von Schöninger-Verbrennungen und Messungen im Flüssig-Szintillations-Spektrometer bestimmt.