

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 8—13, Januar 1969

Akute Barbitalkwirkungen auf den Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel der Rattenleber

VON H. KRÖNER, B. GUTENBERGER¹⁾, S. HOLLMANN und W. STAIB

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 5. August 1968)

Es wurden kinetische Analysen von Barbitalkwirkungen an der Rattenleber durchgeführt. Die Aktivität der Threonindehydratase und der Tryptophanpyrrolase sowie des Blutgerinnungsfaktors V fällt primär ab, steigt wieder an und weist danach noch ein zweites Minimum auf. Entsprechend verhält sich die, über den Einbau von Leucin-[1-¹⁴C] in vivo gemessene Proteinsynthese. Auch die RNA-Synthese, gemessen über den RNA-Gehalt und über den Einbau von Orotsäure-[5-³H] in vivo, wird durch Barbitalk gehemmt. Hier findet sich nur ein Minimum. Der DNA-Gehalt nimmt kontinuierlich geringfügig ab. Die Analyse der Adeninnucleotide ergibt einen Anstieg des ATP-Gehaltes mit einem Maximum 4 Stdn. nach der Barbitalkinjektion. Der Zusammenhang der beobachteten Barbitalkwirkungen wird diskutiert.

The effect of acute barbitalk loading on the protein and nucleic acid metabolism of rat liver

Kinetic analyses are reported on the action of barbitalk on rat liver. The activities of threonine dehydrase, tryptophan pyrrolase and blood coagulation factor V show an initial decrease, followed by an increase, then a second minimum. The same behaviour was shown by the in vivo protein synthesis, measured by the incorporation of [1-¹⁴C]leucine. The synthesis of RNA, measured by the RNA concentration and the incorporation of [5-³H]orotic acid, was also inhibited by barbitalk, and there was only one minimum. There was a continuous small decrease in the concentration of DNA. Analysis of the adenine nucleotides showed an increase in the concentration of ATP to a maximum 4 hr. after the injection of barbitalk. The relationship between these effects is discussed.

Barbiturate und verschiedene andere Pharmaka verursachen eine Aktivitätszunahme mikrosomaler Enzyme über eine gesteigerte Proteinsynthese (1). Zu den so „induzierbaren“ Enzymen gehört die Uridindiphosphat-Glucuronyltransferase (EC 2.4.1.17) und auch die nicht mikrosomale Uridindiphosphatglucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.22) (2). Wie HOLLMANN und Mitarbeiter (3) zeigen konnten, bewirkt Barbitalk (Veronal) bzw. Aminophenazon primär eine kurzfristige Aktivitätsabnahme dieser beiden Enzyme. Damit ergibt sich die Frage, ob diese Hemmung auch Enzyme betrifft, die nicht mit dem Arzneimittelabbau in Zusammenhang gebracht werden können, ob also die Proteinsynthese der Leber generell durch Barbitalk primär gehemmt wird. Als Nebenbefund wird eine solche akute Hemmung der Proteinsynthese durch Nembutal in der Literatur erwähnt (4). Für Enzymuntersuchungen schienen uns Enzyme mit kurzer Halbwertszeit besonders geeignet wie die Tryptophanpyrrolase (EC 1.13.1.12) (5), die Threonindehydratase (EC 4.2.1.16) (6) und der Blutgerinnungsfaktor V (7), ein spezifisches Protein, das in der Leber synthetisiert wird. Den Einfluß von Barbitalk auf die gesamte Proteinsynthese der Leber haben wir zu ermitteln versucht durch Messung des Einbaus von markiertem Leucin in vivo. Da eine Proteinsynthesehemmung sekundäre Folge einer Hemmung der RNA-Synthese sein könnte, haben wir die Beeinflussung derselben durch Barbitalk über den Einbau von markierter Orotsäure in vivo untersucht. Um eine eventuelle Störung des Energiestoffwechsels als primäre Ursache der Barbitalkwirkung zu erfassen, haben wir die Adeninnucleotide der Leber bestimmt.

¹⁾ Diese Arbeit enthält wesentliche Teile der Dissertation von B. GUTENBERGER (Med. Fakultät Univ. Düsseldorf 1969).

Die Versuche wurden an adrenaletomierten Tieren durchgeführt, um sicher zu stellen, daß es sich um direkte, hormonunabhängige Barbitalkwirkungen handelt (8).

Methodik

Männliche Wistar-Ratten (Fa. Brünger, Bokel) 200—300 g schwer, wurden in leichter Äthernarkose von einem dorsalen Median-schnitt ausgehend doppelseitig adrenaletomiert. Bis zum Versuchsbeginn, 5—6 Tage nach der Operation, erhielten die Tiere physiologische Kochsalzlösung und Standardfutter (Fa. Höveler, Langenfeld-Immigrath).

Veronal wurde in Form des Na-Salzes, 150 mg/kg als 1,5proz. Lösung in physiologischer Kochsalzlösung, i. p. injiziert.

Zu verschiedenen Zeiten nach der Veronalinjektion wurde in leichter Äthernarkose der Bauchraum eröffnet, durch Punktion der Aorta Blut entnommen, dieses 1:9 mit 3,8proz. Na-Citratlösung versetzt und das Plasma zur Bestimmung des Faktors V abzentrifugiert. Anschließend wurden Leberproben zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Tryptophanpyrrolase und der Threonindehydratase entnommen. Nach einmaliger Punktion und Entnahme der Gewebsproben wurden die Tiere getötet.

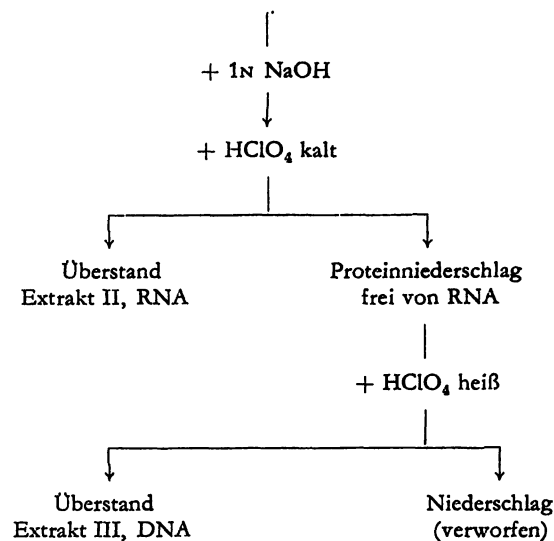
Die Bestimmung der Threonindehydratase erfolgte nach PITOT und PERAINO (6). Als Eichsubstanz für die dabei verwendete Farb-reaktion nach GREENBERG (9) diente α -Ketobuttersäure reiner Fa. Schuchardt. Die Tryptophanpyrrolase wurde nach KNOX und AUERBACH (10) bestimmt.

Die Bestimmung des Blutgerinnungsfaktors V erfolgte nach dem Einphasenprinzip mit den Reagenzien und nach der Vorschrift der Fa. Behringwerke AG. Der Faktorengehalt des Normalplasmas — ein Mittelwert von 10 nicht adrenaletomierten Kontrolltieren — diente als 100%-Wert. Die Beziehung zwischen Faktorengehalt (Plasmaverdünnung) und Gerinnungszeit wurde von uns wie üblich ermittelt. Da im Normalfall bei dieser Methode nur ein Abfall des Gerinnungsfaktors zu erwarten ist, wir aber auch mit einem Anstieg über den 100%-Wert rechnen mußten, haben wir von den Versuchstieren jeweils den 50%-Normwert — zusätzliche Plasmaverdünnung 1:1 — angesetzt. Damit sind Werte zwischen 20% und 200% direkt aus der Eichkurve ablesbar, Werte über 200% sind extrapoliert.

In einer zweiten Versuchsserie wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Barbitalinjektion in leichter Äthernarkose eine Leberprobe mittels Frierstopp entnommen. Daraus wurde zunächst mit eisgekühlter Perchlorsäure der Extrakt I hergestellt zur Bestimmung der Adeninucleotide (11). Aus dem Rückstand wurden mit einer modifizierten Schmidt-Thannhauser-Methode (12, 13) die Nucleinsäuren extrahiert (Schema 1) Einzelheiten siehe (14).

Schema 1: Extraktion der Nucleinsäuren aus Leber.

Gewebsrückstand nach Extraktion mit kalter HClO_4



Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Biuretreaktion nach WEICHELBAUM (15), Eichsubstanz war Serumalbumin vom Rind der Fa. Behringwerke. Die RNA wurde durch Extinktionsmessung bei 260 nm, die DNA nach BURTON (16) bestimmt. Als Eichsubstanz diente für beide Bestimmungen hydrolysierte Kalbsthymus-DNA der Fa. Serva.

30 Min. vor der Tötung erhielten die Tiere dieser zweiten Versuchsserie eine intraperitoneale Injektion von Leucin-[1- ^{14}C], 20 $\mu\text{C}/\text{kg}$ und Orotsäure-[5- ^3H], 60 $\mu\text{C}/\text{kg}$. Das Leucin hatte eine spezifische Aktivität von 27,5 $\mu\text{C}/\text{mg}$, die Orotsäure von 5000 mC/mMol .

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Tri-Carb, Liquid Scintillation Counter der Fa. Packard Instruments, als Scintillationsgemisch diente Diotol (17). Quenchkorrektur erfolgte mittels externen Standards. Gemessen wurde die ^{14}C -Aktivität des Leucins im RNA-freien Proteinniederschlag. Dieser wurde mit kalter Perchlorsäure nachgewaschen, in 1 ml Hydroxid of Hyamin (Fa. Röhm & Haas) gelöst und zum Scintillationsgemisch gegeben. Die Tritium-Aktivität der Orotsäure wurde in Extrakt II gemessen, der die teilhydrolysierte RNA enthält. 0,5 ml Extrakt II wurden mit Scintillationsgemisch versetzt. Nebeneinander haben wir die ^{14}C - und Tritium-Aktivität des Extraktes I gemessen, von dem ebenfalls 0,5 ml mit Diotol versetzt wurden. Entsprechend der unterschiedlichen Energie der Strahlung der beiden Nuclide wurde in einem Kanal des Tri-Carb fast ausschließlich ^{14}C , in einem anderen Kanal vorwiegend Tritium gemessen. Bei fehlendem oder konstantem und daher zu vernachlässigendem Quench kann über eine einfache rechnerische Korrektur die wahre ^{14}C - und Tritium-Aktivität der Proben ermittelt werden. Der Korrekturfaktor wurde in Vorversuchen ermittelt, bei denen jeweils nur ein Nuclid gegeben wurde.

Ergebnisse

Relativ kurzfristig nach der Barbitalinjektion fanden wir sowohl für die untersuchten Leberenzyme als auch für den Gerinnungsfaktor V eine Aktivitätsabnahme (Abb. 1). Das erste Aktivitätsminimum liegt für die Threonin-

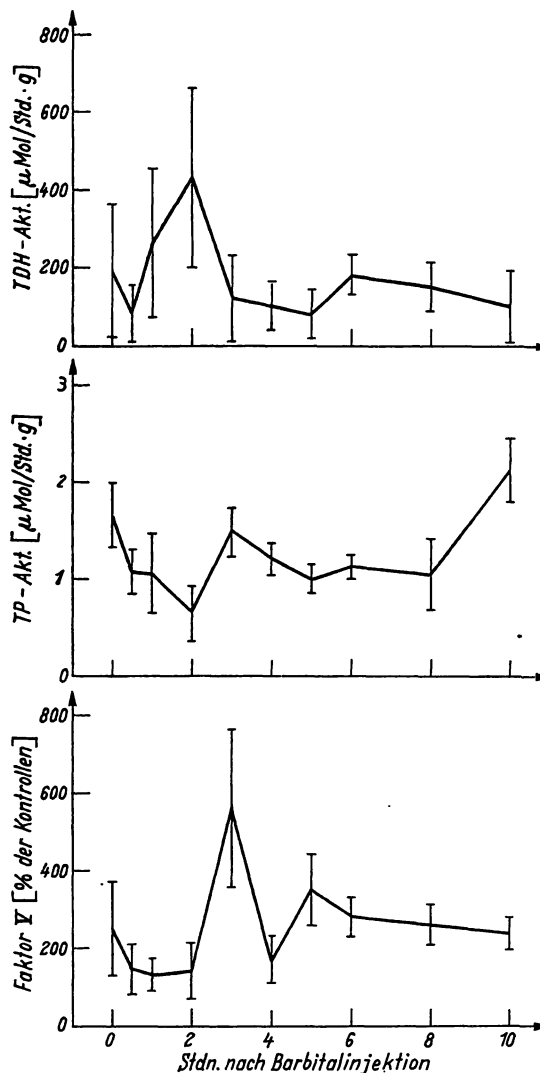


Abb. 1

Enzymaktivitäten in der Leber adrenaletomierter Ratten nach Gabe von Barbitol-Na, 150 mg/kg i. p. für Threonindehydratase (TDH) und Tryptophanpyrrolase (TP) in μMol Substratumsatz/Std. \cdot g Frischgewicht, für den Faktor V in Prozent der intakten (nicht adrenaletomierten) Kontrollen. Mittelwert von je 6 Versuchstieren \pm Standardabweichung

dehydratase $\frac{1}{2}$ Std. nach der Barbitalinjektion, für den Faktor V 1 Std. und für die Tryptophanpyrrolase 2 Stdn. nach der Barbitalinjektion. Die primäre Abnahme ist für den Faktor V schwach ($p < 0,05$) und für die Tryptophanpyrrolase deutlich ($p < 0,001$) signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abb. 1). Es folgt für alle drei Proteine ein signifikanter Aktivitätsanstieg, Tryptophanpyrrolase: $p < 0,001$, Threonindehydratase: $p < 0,01$, Faktor V: $p < 0,001$. Dabei liegt das Maximum der Threonindehydratase 2 Stdn. nach Barbitalgabe 125% über den Kontrollwerten, das Maximum des Faktors V 3 Stdn. nach Barbitalgabe ebenfalls 125% über den Kontrollwerten. Nur das Maximum der Tryptophanpyrrolase-Aktivität 3 Stdn. nach der Barbitalinjektion erreicht nicht ganz den Wert der unbehandelten Kontrollen. Die Aktivität der untersuchten Enzyme fällt danach wieder ab unter den Normalwert der Kontrolltiere. Diese zweiten Minima für die Tryptophanpyrrolase und die Threonin-

dehydratase liegen 5 Std. nach der Barbitalgabe und sind gegenüber dem Maximum mit $p < 0,001$ (Tryptophanpyrrolase) und $p < 0,01$ (Threonindehydratase) signifikant. Der Abfall des Faktors V bis zur 4. Std. ist besonders steil und hochsignifikant ($p < 0,001$). Es folgt schließlich noch ein zweiter signifikanter Aktivitätsanstieg für die Threonindehydratase ($p < 0,02$), für den Faktor V ($p < 0,001$) und für die Tryptophanpyrrolase ($p < 0,001$). Der zweite Anstieg der Threonindehydratase zwischen 8. und 10. Std. nach der

Barbitalinjektion erfolgt relativ spät im Vergleich zu dem Wiederanstieg der Threonindehydratase und des Plasmafaktors V nach 6 bzw. 5 Std. Diese beiden Proteine zeigen danach bis zur 10. Std. keine signifikanten Aktivitätsänderungen mehr.

In der ersten Std. nach Barbitalinjektion wird vermindert Leucin- $[^{14}C]$ in das Leberprotein eingebaut (Abb. 2). Die *Einbaubremung* setzt sofort nach der Injektion ein und beträgt 24% bezogen auf Leberfrischgewicht und 22%, berechnet als spezifische Aktivität.

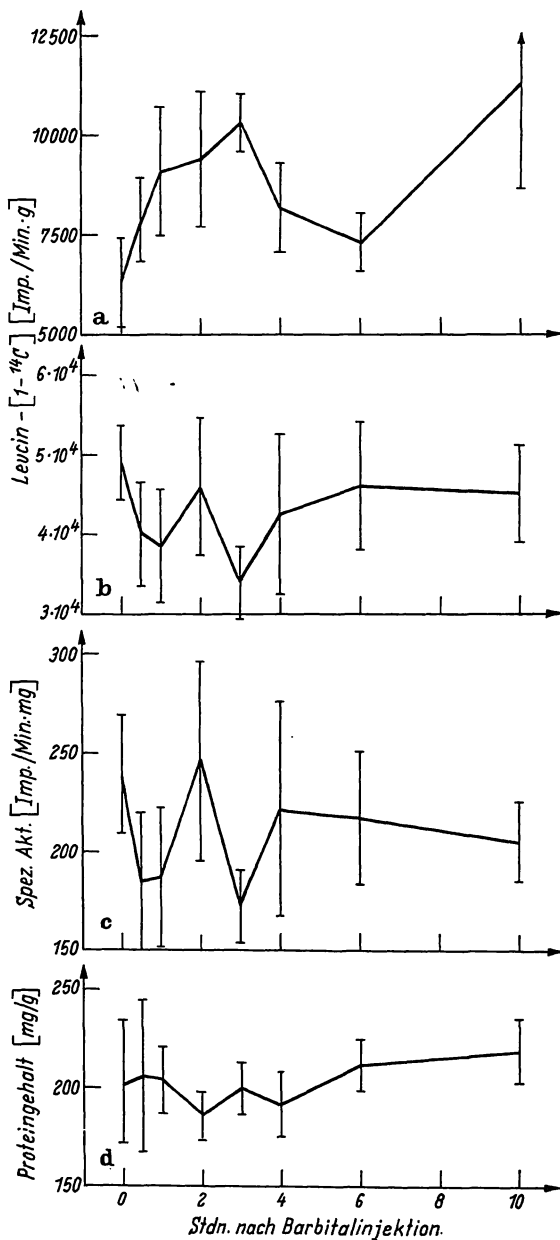


Abb. 2

Proteingehalt und Einbaureate von Leucin- $[^{14}C]$ in Rattenlebern in vivo nach Gabe von Barbitol-Na, 150 mg/kg. Leucin $[^{14}C]$, 20 $\mu C/kg$ i. p. 30 Min. vor der Tötung

- a: Aktivität von Leucin $[^{14}C]$ in der säurelöslichen Fraktion, Imp./Min./g Leber
 - b: Einbau von Leucin $[^{14}C]$ in die Proteinfraction, Imp./Min./g Leber
 - c: Spezifische ^{14}C -Aktivität der Proteinfraction, Imp./Min./mg Protein
 - d: Proteingehalt der Leber in mg/g Frischgewicht
- Mittelwerte von mindestens 5 Einzelwerten \pm Standardabweichung

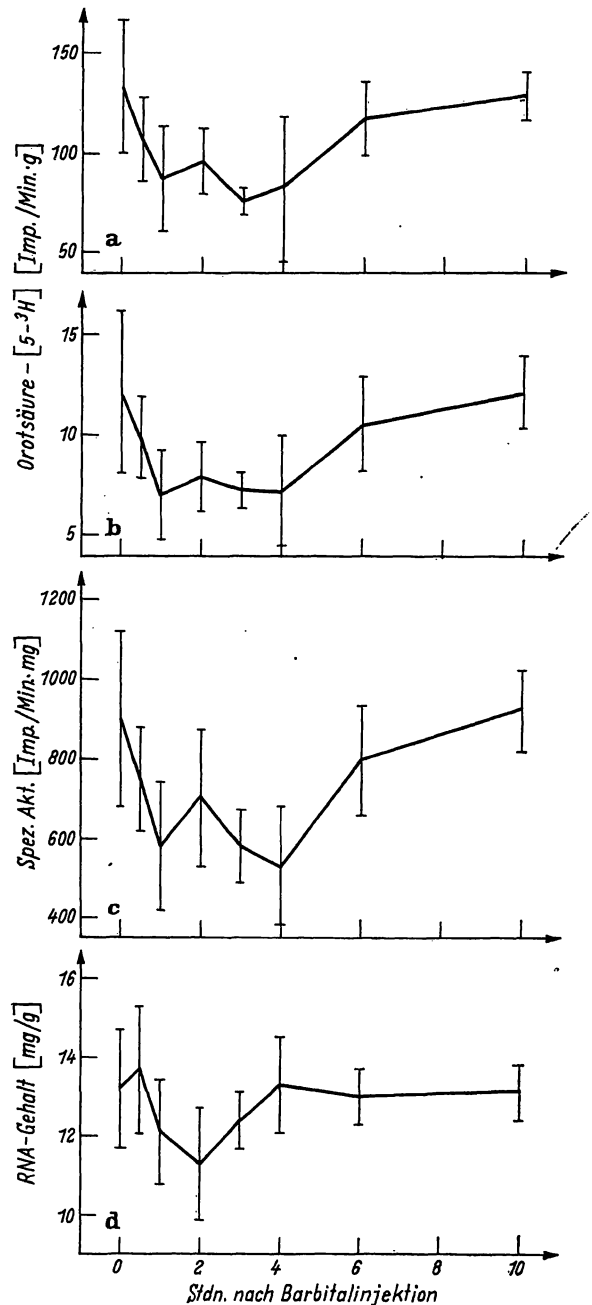


Abb. 3

RNA-Gehalt und Einbaureate von Orotsäure $[5-^3H]$ in Rattenlebern in vivo nach Gabe von Barbitol-Na, 150 mg/kg. Orotsäure $[5-^3H]$, 60 $\mu C/kg$ i. p. 30 Min. vor der Tötung

- a: Einbau von Orotsäure $[5-^3H]$ in die säurelösliche Fraktion, Imp./Min./g Leber
 - b: Einbau von Orotsäure $[5-^3H]$ in die Leber-RNA, Imp./Min./g Leber
 - c: Einbau von Orotsäure $[5-^3H]$ in die Leber-RNA, spezifische Aktivität, Imp./Min./mg RNA
 - d: RNA-Gehalt der Leber in mg/g Frischgewicht
- Mittelwerte von mindestens 5 Einzelwerten \pm Standardabweichung

Beide Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,02$). Beim Wiederanstieg der Einbaurrate zur 2. Std. nach der Barbitalgabe ist nur der auf den Proteingehalt der Leber bezogene Wert schwach signifikant ($p < 0,05$). Der Abfall der Einbaurrate zu einem zweiten Minimum 3 Std. nach der Barbitalgabe, sowie der folgende Anstieg bis 6. Std. sind jeweils mit $p < 0,02$ signifikant.

Die ^{14}C -Aktivität im säurelöslichen Überstand (Extrakt I) verhält sich fast reziprok zur ^{14}C -Aktivität im Protein. Sie steigt nach einer Std. signifikant an um nahezu 50% ($p < 0,01$). Der Abfall der säurelöslichen ^{14}C -Aktivität fällt zeitlich genau mit dem endgültigen Wiederanstieg der ^{14}C -Aktivität im Protein zusammen. Er ist ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) zwischen 4. und 6. Std. 10 Std. nach der Barbitalgabe fanden wir eine unerklärliche erhöhte ^{14}C -Aktivität im säurelöslichen Überstand. Die säurelösliche ^{14}C -Aktivität verhielt sich dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Systemen wie freies Leucin (13). Der Proteingehalt der Leber, bezogen auf Frischgewicht, ändert sich nach Barbitalgabe nur relativ geringfügig. Die Abnahme bis zur 2. Std. nach der Injektion beträgt 8%, sie ist nicht signifikant.

Der RNA-Gehalt der Leber (Abb. 3) nimmt stärker ab als der Proteingehalt. Das Minimum 2 Std. nach der Barbitalgabe liegt um 15% unter dem Kontrollwert ($p < 0,02$). Der Abnahme des RNA-Gehaltes geht eine verminderte Einbaurrate von Tritium markierter Orotsäure in die RNA voraus. Zwischen der 30. und 60. Min. nach Barbitalinjektion wird etwa 40% weniger Orotsäure eingebaut ($p < 0,01$) als ohne Barbitalgabe. Parallel zu dem verminderten Einbau in die RNA geht eine Abnahme der Aktivität im säurelöslichen Überstand (Extrakt I) ($p < 0,05$). Da sich diese säurelösliche Fraktion dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Systemen anders verhielt als Orotsäure, dürfte es sich im wesentlichen um Nucleotide handeln. Es ist also der Einbau von Orotsäure in Mononucleotide ebenfalls kurzfristig vermindert. Später, im wesentlichen 4 bis 6 Std. nach der Barbitalgabe, steigt die Tritiumaktivität im säurelöslichen Überstand parallel zum Anstieg der Einbaurrate in die RNA wieder an. Letzterer ist schwach signifikant ($p < 0,05$).

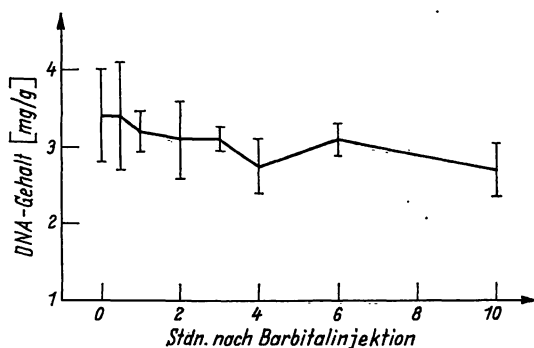


Abb. 4

DNA-Gehalt der Leber in mg/g Frischgewicht nach Gabe von Barbitalgabe, 150 mg/kg, Mittelwerte von mindestens 5 Einzelwerten \pm Standardabweichung

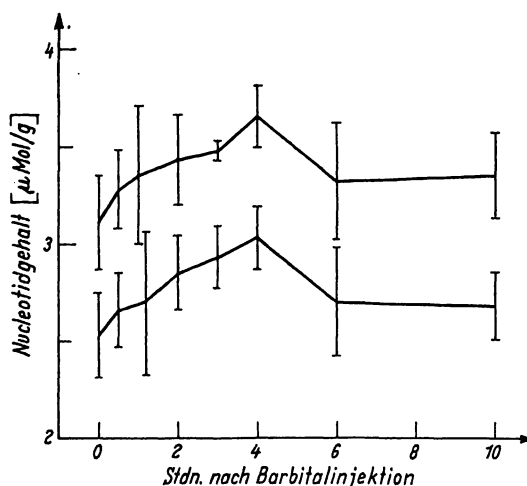


Abb. 5

Adeninnucleotide der Leber in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht nach Gabe von Barbitalgabe, 150 mg/kg. Obere Kurve: Summe der Adeninnucleotide, untere Kurve: ATP in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Mittelwerte von 6 Einzelwerten \pm Standardabweichung

Der DNA-Gehalt der Leber bezogen auf Feuchtgewicht (Abb. 4) nimmt nahezu kontinuierlich während der 10 Std. ab. Die Differenz beträgt 20%, ist jedoch gegenüber dem Ausgangswert nicht statistisch signifikant. Legt man andererseits die DNA-Werte als über 10 Std. konstant zugrunde und bezieht darauf z. B. den Protein- und RNA-Gehalt, so ergibt sich für diesen im Endeffekt eine 25proz. Zunahme.

Die Bestimmung der Adeninnucleotide (Abb. 5) ergab eine absolute Zunahme des ATP-Gehaltes, der schon nach 2 Std. statistisch signifikant ist ($p < 0,02$). Der 3- und 4-Stunden-Wert unterscheidet sich mit $p < 0,01$ von den Kontrollen. Die maximale Zunahme beträgt +20% nach 4 Std. Die Gehalte an ADP und AMP verändern sich dem gegenüber kaum, so daß auch das Verhältnis der Adeninnucleotide nur unwesentlich verschoben ist. Zwischen der 4. und der 10. Std. nach Barbitalinjektion fällt der ATP-Gehalt signifikant ab ($p < 0,01$) und liegt dann nur noch unwesentlich über dem Niveau der Kontrollen.

Diskussion

Der Effekt einer einmaligen Barbitalinjektion auf die Leberenzyme Tryptophanpyrrolase und Threonindehydratase und den in der Leber synthetisierten Gerinnungsfaktor V entspricht in wesentlichen Punkten der früher beschriebenen Barbitalgabe auf die Leber-Uridindiphosphatglucose-Dehydrogenase und der Aminophenazonwirkung auf die Leber-Uridindiphosphat-Glucuronyltransferase (3). Die Aktivität aller 5 Enzyme fällt zunächst akut ab, steigt danach an, weist ein zweites Minimum auf und pendelt sich danach in etwa auf das Ausgangsniveau ein. Zum Teil recht unterschiedlich verhalten sich dagegen die Zeiträume für Aktivitätsabnahmen und Aktivitätszunahmen. Eine wesentliche Ursache dafür dürften die unterschiedlichen Halbwertszeiten der Enzymproteine sein (5, 6, 7).

Verglichen mit der Halbwertszeit des Gesamtleberproteins (18, 19) und der Plasmaproteine (20) von 2—3 Tagen handelt es sich um Enzyme mit relativ kurzer Halbwertszeit, was die Bedeutung der letzteren für die beobachteten Phänomene unterstreicht. Die zeitliche Verschiebung der Aktivitätsmaxima und Minima dürfte ferner durch die Halbwertszeit der m-RNA beeinflusst werden. Diese Halbwertszeit der m-RNA beträgt nach JOHN und MILLER (21) für Serumalbumin im Mittel 2—4 Std., für Leberprotein weniger als 6 Std. Die Halbwertszeit der m-RNA einzelner Proteine kann natürlich von diesem Mittelwert abweichen, sie beträgt z. B. für Fibrinogen 1,5 bis 2 Std. (21).

Die Tatsache, daß die zuletzt untersuchten Enzyme nicht mikrosomal sind und auch in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem Abbau von Arzneimitteln stehen, weist darauf hin, daß die Barbitalkwirkung sehr unspezifisch ist und die gesamte Leberzelle betrifft. So konnten HOLZ und Mitarbeiter (22) nachweisen, daß die cytoplasmatische DOPA-Decarboxylase durch Phenobarbital induziert wird. GELBOIN (23) konnte zeigen, daß in die durch Phenobarbital stimulierte Proteinsynthese auch cytoplasmatische Proteine einbezogen sind.

Die von uns durchgeführte kinetische Analyse des gesamten Leberproteins ergibt ein dem Verhalten der Enzymaktivitäten entsprechendes Bild. Dem Abfall der Enzymaktivität entspricht hier eine verminderte Einbaurrate von markiertem Leucin in das Protein. Dieser verminderte Leucineinbau beginnt sofort nach der Barbitalinjektion. In Kombination mit dem Anstieg des nicht eingebauten Leucin-[¹⁴C] fassen wir die verminderte Einbaurrate als Hemmung der Proteinsynthese auf, zumal Vorgänge, die zu einem Isotopenverdünnungseffekt führen könnten, aus zeitlichen Gründen nicht in Frage kommen. Mit einer gewissen Verzögerung folgt der Synthesehemmung ein geringer, allerdings nicht signifikanter Abfall des Proteingehaltes der Leber. Das zweite Minimum des Leucin-[¹⁴C]-Einbaues möchten wir ebenfalls als Ausdruck einer gehemmten Proteinsynthese auffassen, obwohl hier ein Isotopenverdünnungseffekt nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Allerdings spricht der Abfall des nicht eingebauten Leucin-[¹⁴C] gleichzeitig mit dem Wiederanstieg der Einbaurrate für die Annahme einer zweiten Proteinsynthesehemmung.

Auch auf die RNA-Synthese der Leber übt Barbitalk eine Hemmwirkung aus. Der Einbau von Orotsäure in die gesamte Leber-RNA ist vermindert, allerdings parallel dazu auch der Einbau in die Nucleotidfraktion. Diese Parallelität läßt daran denken, daß die Barbitalkhemmung schon auf der Stufe der Nucleotidsynthese angreift. Die Hemmung kann sich jedoch nicht auf die Nucleotidfraktion beschränken, indem eine verminderte Radioaktivität der Nucleotide bei an sich normaler RNA-Syntheserate eine Hemmung der RNA-Synthese vortäuschte. Der verminderte Einbau von Orotsäure-[5-³H] in die RNA muß auch Ausdruck einer

RNA-Synthesehemmung sein, da mit einer Verzögerung von etwa ½ Std. der RNA-Gehalt der Leber signifikant abfällt.

Es erscheint paradox, daß zunächst der RNA-Gehalt wieder ansteigt und sich erst später die Einbaurrate für Orotsäure-[5-³H] in RNA- und Nucleotidfraktion normalisiert. Die RNA-Synthese kann nach der 2. Std. nicht mehr gehemmt sein, wenn der RNA-Gehalt zwischen der 2. und 4. Std. nach der Barbitalinjektion wieder ansteigt. Der verminderte Einbau von markierter Orotsäure in die RNA kann zu diesem Zeitpunkt daher nur die Folge eines Isotopenverdünnungseffektes und ferner einer verminderten Nucleotidsynthese aus der angebotenen Orotsäure-[5-³H] sein. Das setzt einen Anstieg der Pyrimidinnucleotide voraus, der über Feedback den Einbau von Orotsäure hemmt (24) und andererseits die durch eingebaute Orotsäure-[5-³H] markierten Nucleotide verdünnt. Der postulierte Anstieg der Pyrimidinnucleotide dürfte die Folge der vorausgegangenen RNA-Synthesehemmung sein. Derzeitig laufende Untersuchungen sollen diese Hypothese bestätigen. Eine wesentliche Stütze erfährt sie schon jetzt durch das Verhalten der untersuchten Adeninnucleotide. 4 Std. nach der Barbitalinjektion, wenn der RNA-Gehalt schon wieder angestiegen ist, die Einbaurrate der Orotsäure-[5-³H] aber noch weitgehend gehemmt ist, weisen die Adeninnucleotide ein deutliches Maximum auf. Ein entsprechendes Verhalten der Pyrimidinnucleotide erscheint uns sehr wahrscheinlich, es würde die zunächst paradox erscheinenden Veränderungen im RNA-Stoffwechsel erklären.

Die RNA-Synthese erfährt also nur eine einmalige Hemmung, die mindestens eine, höchstens aber 2 Std. dauert. Wir möchten annehmen, daß die daraus resultierende Abnahme der RNA die Ursache für die Hemmung der Proteinsynthese zwischen der 2. und 3. Std. nach der Barbitalinjektion ist. Der primäre Abfall der Proteinsynthese innerhalb der ersten 30 Min. nach Barbitalinjektion liegt unseres Erachtens zeitlich zu früh, als daß er Folge der RNA-Synthesehemmung sein könnte. Zudem wäre es dann schwierig, einen Grund für den zwischenzeitlichen Anstieg der Proteinsynthese zu finden.

Die Frage nach der Ursache für die primäre Hemmung der Protein- und RNA-Synthese muß zunächst noch offenbleiben. Sie liegt sicher nicht, wie aus den Werten der Adeninnucleotide ersichtlich, im Energiestoffwechsel. Das entspricht Befunden, bei denen von verschiedenen Barbitursäurederivaten Barbitalk (Veronal) mit Abstand die geringste Hemmwirkung auf die Zellatmung aufweist (25). Die Bedeutung der primären Hemmwirkung eines „induzierenden“ Pharmakons wird durch Befunde anderer Autoren unterstrichen, die eine sekundäre „Induktionswirkung“ primär hemmender Pharmaka wie z. B. Cycloheximid und Actinomycin D nachweisen konnten (8, 26, 27, 28).

Wir danken Fräulein URSULA GNEIST für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

1. KATO, R., W. R. JONDORF, L. A. LOEB, T. BEN und H. V. GELBOIN, *Mol. Pharmacol.* 2, 171 (1966). — 2. HOLLMANN S. und O. TOUSTER, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 62, 338 (1962).
3. HOLLMANN, S. und J. NEUBAUER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 877 (1967). — 4. HOFERT, J. F. und R. K. BOUTWELL, *Arch. Biochem. Biophysics* 103, 338 (1963). — 5. SCHIMKE, R. T., E. W. SWEENEY und C. M. BERLIN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 15, 214 (1964). — 6. PITOT, H. C. und C. PERAINO, *J. biol. Chemistry* 239, 1783 (1964). — 7. SCHOEN, R. und H. SÜDHOF, *Biochemische Befunde in der Differentialdiagnose innerer Krankheiten*, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1965). — 8. JONDORF, W. R. und D. C. SIMON, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 22, 644 (1966). — 9. GREENBERG, D. M., in *Methods in Enzymology*, Edit. S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Academic Press New York, London (1962). — 10. KNOX, W. E. und V. H. AUERBACH, *J. biol. Chemistry* 214, 307 (1955). — 11. KRÖNER, H. und W. STAIB, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 575 (1967). — 12. HUTCHISON, W. C., E. D. DOWNIE und H. N. MUNRO, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 55, 561 (1962). — 13. FLECK, A. und H. N. MUNRO, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 55, 571 (1962). — 14. KRÖNER, H. und W. STAIB, *Acta Endocr. K'havn* 59, 193 (1968). — 15. WEICHSELBAUM, T. E., *Amer. J. Clin. Path.* 16, 40 (1946). — 16. BURTON, K., *Biochem. J.* 62, 315 (1956). — 17. HERBERG, R. J., *Analyt. Chem.* 32, 42 (1960). — 18. SWICK, R. W., *J. biol. Chemistry* 231, 751 (1958). — 19. NIKLAS, A., E. QUINDA, W. MAURER und H. NEYEN, *Biochem. Zschr.* 330, 1 (1958). — 20. FRIEDBERG, F., H. TARVER und D. M. GREENBERG, *J. biol. Chemistry* 173, 355 (1948). — 21. JOHN, D. W. und L. L. MILLER, *J. biol. Chemistry* 241, 4817 (1966). — 22. PALM, D., C. ERNZERHOFF und P. HOLTZ, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 258, 352 (1967). — 23. GELBOIN, H. N., *Drugs and Proteinsynthesis Expl. Med. Surg. Suppl. Issue 1965*, 85. — 24. STADTMAN, E. R., *Advances in Enzymol. N. Y.*, 28, 41 (1966). — 25. SCHOLZ, R., F. SCHWARZ und TH. BÜCHER, *diese Z.* 4, 179 (1966). — 26. FIALA S., *Science* 157, 159 (1967). — 27. ROSEN, F., P. N. RAJNA, R. J. MILLHOLLAND und CH. A. NICHOL, *Science Washington* 146, 661 (1964). — 28. MACKINTOSH, F. R. und EUGENE BELL, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 27, 425 (1967).

Prof. Dr. S. Hollmann
4000 Düsseldorf 1
Witzelstr. 111