

Eine analoge Verbindung, und zwar die ungesättigte Aminosäure 5-Hydroxy-leucenin (II), wurde von WIELAND und SCHÖN⁶ als Baustein des Knollenblätterpilz-Peptides Phalloidin festgestellt. Denkbar wäre, dass 5-Hydroxy-leucenin (II) und I biogenetisch miteinander verbunden sind (Decarboxylierung von II zu 4-Hydroxy-3-methyl-but-5-enyl-amin-(1) und Guanidierung dieser Verbindung zu I).

Papierchromatographisch konnten wir I in Blättern, Wurzeln, Blüten und Samen der Geissraute nachweisen; es war stets in geringerer Menge als Galegin vorhanden (Verhältnis etwa 1:4). Im alkoholischen Samenextrakt liessen sich noch drei weitere Guanidine (Sakaguchi-Reaktion) in weit geringeren Konzentrationen feststellen. Eine dieser Substanzen konnte mit Hilfe zweidimensionaler Papierchromatographie sowie authentischer Vergleichssubstanz als Arginin identifiziert werden⁷.

Bei I handelt es sich wahrscheinlich um die bereits früher in *G. officinalis* neben Galegin papierchromatographisch nachgewiesene zweite Sakaguchi-positive Substanz⁸. Ob die Verbindung jedoch mit der schon von

MÜLLER⁹ aus *Galega*-Samen isolierten, aber nicht näher untersuchten Base identisch ist, bleibt fraglich.

Über weitere Arbeiten zur Konstitution und Synthese von I wird an anderer Stelle berichtet.

Summary. A new guanidine derivative has been isolated from the seeds of *Galega officinalis* L., for which the structure 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-guanidine-(1) was proposed.

K. PUFAHL und K. SCHREIBER

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Pflanzenzüchtung, Quedlinburg (Deutschland), 24. April 1961.

⁶ TH. WIELAND und W. SCHÖN, Liebigs Ann. 593, 157 (1955).

⁷ Vgl. dagegen ⁸.

⁸ M. MOURGUE und R. DOKHAN, C. R. Soc. Biol. 148, 1434 (1954). - J. KOLOUŠEK, M. KUTÁČEK und J. BÍLEK, Sbornik českoslova. Akad. Zemědělské věd 28, 649 (1955).

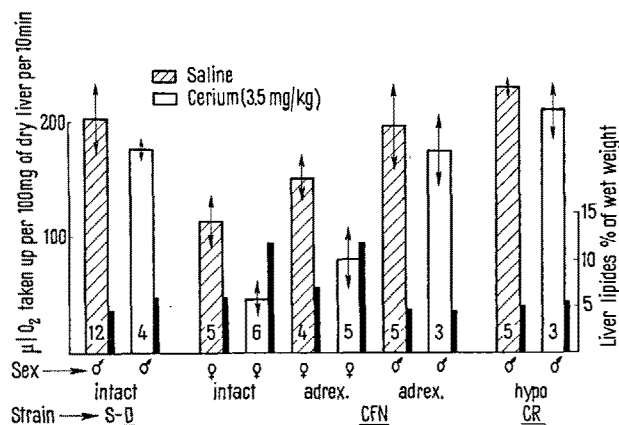
⁹ H. MÜLLER, Z. Biol. 83, 239 (1925).

Choline Oxidase in Fatty Livers Induced by Cerium¹

We have previously shown that lipotropic substances, including choline, have no effect in preventing the fatty liver degeneration caused by cerium², and in this respect the rare-earth fatty liver is different from the ethionine-fatty liver³. Since the choline result was negative in rare-earth injected rats, we wondered whether the metal in any way influenced choline oxidase. Furthermore, the possible correlation of the hepatic choline oxidase activity in various species to the ease with which fatty infiltration of liver occurs during dietary choline deficiency has been stressed by some investigators^{4,5}. SIDRANSKY and FARBER⁶ have re-emphasized the point that the choline pool varies inversely with the choline oxidase activity. Animals with a larger choline pool might thereby be expected to be more resistant to fatty infiltration brought about by a choline deficiency. We were especially concerned with the possible involvement of this enzyme in the development of fatty livers caused by certain members of the cerium rare earth group⁶; of seven species tested, the rat and mouse are most susceptible to the fatty infiltration induced by these elements. Both of these species have very high levels of choline oxidase and are extremely susceptible to fatty infiltration triggered by a choline deficiency. Under certain hormonal conditions² rats injected with cerium do not develop fatty livers; in this paper we have tried to determine whether this difference in lipide response of the rats injected with cerium could be related to the hepatic choline oxidase level and in turn to the ease with which choline deficiency can be induced under these hormonal conditions.

Rats weighing between 150 and 200 g were maintained on Rockland Rat Diet until 24 h before sacrifice, at which time all animals were fasted. Water was always available. The cerium-treated rats were injected intravenously with 2 mg of the metal/kg of body weight in the form of the chloride salt; control animals received an equivalent volume of saline. All rats were killed 48 h after the injections. Choline oxidase was determined in liver homogenates according to the technique of WILLIAMS⁷. Total lipides were extracted and determined as described before².

It is apparent from the data in the Figure that the animals eventually developing fatty livers always had a lower liver choline oxidase activity than those not developing the fatty infiltration. For example, this enzyme is significantly lower in the intact CFN female controls and the adrenalectomized CFN females, both of which get fatty livers if cerium is given intravenously. On the other



Liver choline oxidase 48 h after intravenous cerium. → represents ± 1 standard deviation from the mean value. SD = Sprague-Dawley; CFN = Carworth Farm Nelson; CR = Charles River; adrex. = adrenalectomized; hypo. = hypophysectomized. The large hatched bars (saline controls) and open bars (cerium-injected) represent $\mu\text{l O}_2/100 \text{ mg dry liver}/10 \text{ min}$. The solid bars represent the average of total liver lipides.

¹ Under contract with the United States Atomic Energy Commission.

² F. SNYDER, E. A. CRESS, and G. C. KYKER, J. Lipid Res. 1, 125 (1959).

³ E. FARBER, M. V. SIMPSON, and H. TARVER, J. biol. Chem. 182, 91 (1950).

⁴ P. HANDLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 70, 70 (1949).

⁵ H. SIDRANSKY and E. FARBER, Arch. Biochem. Biophys. 87, 129 (1960).

⁶ F. SNYDER, E. A. CRESS, and G. C. KYKER, Nature 185, 480 (1960).

⁷ J. N. WILLIAMS, JR., G. LITWACK, and C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. 192, 73 (1951).

hand, the controls of the Sprague-Dawley males, the adrenalectomized CFN males and the hypophysectomized Charles River males have significantly higher levels of hepatic choline oxidase and do not get fatty livers if given cerium intravenously. These results are exactly opposite to what one would reason from the theory concerning the relationship of choline oxidase and susceptibility of an animal to choline deficiency. These data indicate, then, that a choline deficiency is not an important causative factor in the fatty infiltration of liver induced by cerium. On the other hand, the liver choline oxidase activity is substantially reduced from control values in all animals that did develop the fatty livers. This inhibition is not completely explained by the diluent action of the fat, since the inhibition is still evident when the enzyme activities reported in the Figure are corrected to a fat free basis. The percentage of liver lipides on a wet and dry weight basis in CFN female rats for two controls were 4.78, 4.25 (wet); 15.86, 13.91 (dry) and for two cerium-injected rats percentages were 15.22, 16.47 (wet); 45.05, 47.75 (dry). The inhibition observed when the fat-free calculation is used is probably caused by the metabolic effect of lipides on this enzyme system^{8,9} and not caused

by the cerium *per se*, since choline oxidase activities measured 24 h after the cerium injection (about 70% of the cerium dose being in the liver and essentially no fatty infiltration) is in the same range as controls.

Zusammenfassung. Der Cholinoxidase-Spiegel in Rattenleberbrei wurde nach intravenöser Verabreichung von Cerium gemessen. Die experimentell erhaltenen Werte zeigen, dass die vom Cerium verursachte Fetteinlagerung weder von der Art der Ratten noch von ihrem hormonalen Zustande abhängt. In Fettlebern scheint die Enzymhemmung mehr von ihrem Lipoidgehalt als von ihrer Ceriumkonzentration bestimmt zu werden.

F. SNYDER and E. CRESS

Oak Ridge Institute of Nuclear Studies, Medical Division, Oak Ridge (Tenn.), March 20, 1961.

⁸ F. BERNHEIM, J. biol. Chem. **133**, 291 (1940).

⁹ F. L. HUMOLLER and H. J. ZIMMERMANN, Amer. J. Physiol. **174**, 199 (1953).

Reserpin und Glykogengehalt der Organe¹

Nach Reserpin ist der Glucose-² und Milchsäuregehalt³ des Blutes erhöht, der Grundumsatz steigt bei Ratten an⁴, es kommt zu einer Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung⁵. Es wäre deshalb zu erwarten, dass der Gehalt der Organe an Glykogen und energiereichen Phosphorsäureverbindungen abnimmt.

Versuche. Männliche weiße Mäuse (18–20 g) erhielten nach 24stündiger Nahrungskarenz 5 mg/kg Reserpin (50 mg/kg Reserpinascorbat), Kontrolltiere die entsprechende Menge Ascorbinsäure subcutan. Sämtliche Tiere wurden unter weiterem Nahrungsentzug bei 25°C gehalten.

1, 3, 12 und 18 h nach der Injektion von Reserpin wurden jeweils mindestens 6 Tiere durch Eintauchen in flüssige Luft getötet. Die Organe wurden in gefrorenem Zustand entnommen, gewogen und *einzel*n aufgearbeitet.

Glykogenbestimmung (Gehirn, Herz, quergestreifter Muskel, Leber): Extraktion nach CARROL, LONGLEY und ROE⁶ mit kalter 5%iger Trichloressigsäure («Labile Glykogenfraktion» nach STETTEN und STETTEN⁷). Der unlösliche Rückstand wurde mit 30%iger KOH im kochenden Wasserbad extrahiert («Gebundene Fraktion»). Das Glykogen beider Fraktionen wurde getrennt nach Fällung mit Äthanol 96%ig, in 1*N* HCl hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit NaOH neutralisiert. Die Glykogenbestimmung erfolgte enzymatisch nach HUGGET und NIXON⁸ («Wahre Glucose»). Die Glykogenwerte sind in μM Glucose/g Feuchtgewicht angegeben.

Milchsäurebestimmung (Gehirn): Extraktion mit *m*/3 HClO₄; enzymatische Bestimmung nach HORN und BRUNS⁹, modifiziert nach GERCKEN¹⁰. – Milchsäurewerte in μM Milchsäure/g Feuchtgewicht.

ATP, ADP, AMP Bestimmung (Gehirn): ATP nach THORN et al.¹¹; ADP und AMP nach LIPMANN¹² und BÜCHER¹³. Werte in μM /g Feuchtgewicht¹⁴.

Ergebnisse. (1) Glykogen. Aus den Figuren 1 und 2 ist zu ersehen, dass der Glykogengehalt/g Feuchtgewicht im Gehirn 2,05 μM , im Herzmuskel 8,59, in der quergestreiften Muskulatur 10,87 und in der Leber 13,24 μM /g beträgt. Diese Normalwerte erfuhren während der 18stündigen

Versuchsdauer bei den fastenden Kontrolltieren keine signifikante Änderung.

Schon 1 h nach der Injektion von 5 mg/kg Reserpin ist der Glykogengehalt des Gehirns (Figur 1) signifikant erhöht – von 2,05 auf 2,52 μM /g – und nimmt im Laufe des Versuches kontinuierlich zu. Nach 18 h beträgt er 4,14 μM /g. Das bedeutet eine Zunahme um 100%.

Im Herzmuskel (Figur 2) findet sich 1 und 3 h nach Reserpin eine Erhöhung des Glykogengehaltes um 43%, die jedoch nicht signifikant ist. Nach 12 h ist auch das Glykogen des Herzens signifikant erhöht: von 8,59 auf 16,8 μM /g. Das bedeutet eine Zunahme um 96%.

In der quergestreiften Muskulatur – gesamte Oberschenkelmuskulatur beider Hinterextremitäten – (Figur 2) ist der Anstieg des Glykogengehaltes schon 3 h nach Reserpin signifikant und erreicht, wie im Herzen, nach 12 h das Maximum. Die Zunahme beträgt 93%.

In der Leber (Figur 2) kommt es 1 h nach der Reserpininjektion zu einer geringfügigen – nicht signifikanten – Abnahme des Glykogengehaltes; nach 3 h ist er gegenüber den Kontrollen etwas erhöht (nicht signifikant); nach 12 h

¹ Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² H. J. KUSCHKE und J. FRANTZ, Arch. exp. Path. Pharmacol. **224**, 269 (1955).

³ K. F. GEY und A. PLETSCHE, Exper. **17**, 25 (1961).

⁴ R. A. HOFFMANN, Amer. J. Physiol. **195**, 755 (1958).

⁵ L. J. ABOOD und K. L. RAMANCHEK, Ann. N.Y. Acad. Sci. **66**, 812 (1957).

⁶ N. V. CARROL, R. W. LONGLEY und J. H. ROE, J. biol. Chem. **220**, 583 (1956).

⁷ W. DE STETTEN und M. R. STETTEN, Physiol. Rev. **40**, 505 (1960).

⁸ A. ST. G. HUGGET und D. A. NIXON, Biochem. J. **66**, 12 P (1956).

⁹ H. D. HORN und F. H. BRUNS, Biochim. biophys. Acta **21**, 378 (1956).

¹⁰ G. GERCKEN, Hoppe-Seyler's Z. **320**, 180 (1960).

¹¹ W. THORN, G. PFLEIDERER, R. A. FROWEIN und I. ROSS, Pflügers Arch. ges. Physiol. **261**, 334 (1955).

¹² F. LIPMAN, Adv. Enzymol. N.Y. **1**, 99 (1941).

¹³ Th. BÜCHER, Adv. Enzymol. N.Y. **14**, 1 (1953).

¹⁴ Die für die enzymatischen Tests verwendeten Fermente wurden von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen.