

Fettsäure-Coenzym-A-Verbindungen in der Mäuseleber nach Ganzkörperbestrahlung

Das Endprodukt der Fettsäurebiosynthese, die Fettsäure-CoA-Ester, zeichnet sich durch eine spezifische Hemmwirkung gegenüber einigen Enzymen aus: die Acetyl-CoA-Carboxylase¹⁻⁴, die Citratsynthetase⁵⁻⁷ sowie die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase^{4,8} werden durch langketige Fettsäure-CoA-Ester gehemmt. Dabei sind die für die In-vitro-Hemmung erforderlichen Hemmstoffkonzentrationen von derselben Größenordnung wie die in vivo gemessenen. Die genannten Enzyme stehen an Verzweigungsstellen des Stoffwechsels, und man darf annehmen, dass die Fettsäure-CoA-Verbindungen bei der Regulation dieser Enzyme eine wesentliche Rolle spielen.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Fettsäuresynthese in der Leber verschiedener Säugetiere nach Ganzkörperbestrahlung erheblich gestört ist⁹⁻¹². Da diese Veränderungen der Fettsäuresynthese ihre Ursache in einem Anstieg oder Abfall des Gehaltes an Fettsäure-CoA-Verbindungen haben können, war es wünschenswert, den Einfluss einer Ganzkörperbestrahlung mit Röntgenstrahlen auf den Gehalt dieser Verbindungen in der Leber zu messen. In der Literatur sind derartige Untersuchungen bisher nicht beschrieben.

Männliche weisse Mäuse stammten aus einem institutseigenen Auszuchttamm, die Tiere waren mit Altromin ernährt. Hungertiere wurde 24 h vor dem Abtöten das Futter entzogen. Die Bestrahlungsbedingungen waren dieselben, wie bereits früher beschrieben⁹, die Dosis betrug 690 R (148 R/min, LD 80/30 Tage). Zur Bestimmung des Fettsäure-CoA-Gehaltes wurde den Mäusen nach der Gefrierstoppmethode die Leber entnommen und das Organ im vierfachen Volumen mit 5% Trichloressigsäure zermörsert, nach dem Auftauen 2 min im Potter-Homogenisator homogenisiert und bei 10 000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde der Niederschlag (»Partikeln«) mit wenig Wasser verrührt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Partikeln wurden mit 2 ml Wasser verrührt und mit konz. NH₃ auf pH 11-12 gebracht nach 30 min mit 6N HCl pH 3-4 eingestellt und die Partikeln abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein definiertes Volumen eingestellt, und in 2 verschiedenen Aliquoten wurde das aus den Fettsäure-CoA-Verbindungen in Freiheit gesetzte CoASH nach der Methode von STADTMAN¹³ mit Phosphotransacetylase (Boehringer, Mannheim) gegen eine Lösung mit bekanntem CoASH-Gehalt gemessen. Es werden also mit der hier beschriebenen Methode die CoA-Derivate als »säureunlösliches CoA« gefällt (vgl. ¹⁴).

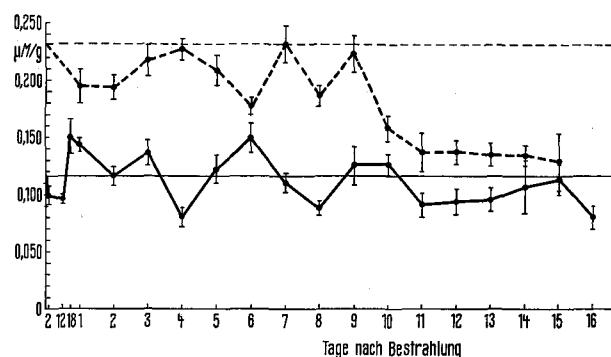
In der Leber gefütterter Mäuse betrug der Gehalt an Fettsäure-CoA-Verbindungen 116 ± 5 nmole/g Feuchtgewicht (40 Tiere), in 24 h hungernden Mäusen 231 ± 8 nmole/g (48 Tiere). Der Gehalt an Fettsäure-CoA-Verbindungen ist in der Mäuseleber höher als in der Rattenleber^{4,13}, der durch den Hunger bedingte Anstieg scheint bei Mäusen jedoch geringer zu sein als bei Ratten, allerdings werden für Ratten sehr unterschiedliche Werte angegeben (vgl. ⁴). Die Konzentration der in der Mäuseleber gemessenen Fettsäure-CoA-Verbindungen ist ca. 10^{-4} molar und damit etwas höher als die für die In-vitro-Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase erforderliche Konzentration^{1,3}.

In der Figur ist der Einfluss einer Röntgen-Ganzkörperbestrahlung auf den Gehalt an Fettsäure-CoA-Verbindungen in der Mäuseleber dargestellt. Bei gefütterten Mäusen (ausgezogene Kurve) sind die Veränderungen nach der Bestrahlung nicht sehr stark. Da gefütterte Tiere über mehrere Tage nach der Bestrahlung sehr unterschiedlich Nahrung aufnehmen, können Schwan-

kungen des Fettsäure-CoA-Gehaltes von einem strahlenbedingten »Hungereffekt« herrühren, da die Ernährungslage der Tiere den Fettsäure-CoA-Spiegel stark beeinflusst. Um diese unregelmässigen Schwankungen auszuschalten, haben wir in einer zweiten Versuchsreihe den Tieren 24 h vor dem Abtöten das Futter entzogen. Die Mäuse befinden sich dann zur Zeit der Messung alle im selben Ernährungszustand.

Unter diesen Bedingungen findet man, insbesondere vom 10.-15. Tag nach der Bestrahlung, eine deutliche Abnahme des Fettsäure-CoA-Gehaltes (gestrichelte Kurve in der Figur).

Diese Abnahme der Fettsäure-CoA-Ester muss z. B. für die Regulation der eingangs erwähnten Acetyl-CoA-Carboxylase bei der Fettsäurebiosynthese erhebliche Konsequenzen haben: unter Bedingungen wie Hunger, Fettfütterung oder Diabetes ist der Gehalt an Fettsäure-CoA-Verbindungen normalerweise erhöht und die Fettsäuresynthese vermutlich infolge eines »feed back«-



Gehalt an langketigen Fettsäure-CoA-Verbindungen in der Mäuseleber nach 690 R. Ausgezogene Kurve: gefütterte Tiere, gestrichelte Kurve: 24 h hungernde Tiere. Jeder Messpunkt ist das Mittel aus 8 Lebern. Die Balken sind Standardabweichungen vom Mittelwert. Experimentelle Einzelheiten siehe Text.

1. M. BORTZ und F. LYNEN, Biochem. Z. 337, 505 (1963).
2. S. NUMA, E. RINGELMANN und F. LYNEN, Biochem. Z. 343, 243 (1965).
3. S. NUMA, W. M. BORTZ und F. LYNEN, in *Advances in Enzyme Regulation* (Ed. G. WEBER, Pergamon Press, Oxford 1965), vol. 3, S. 407.
4. O. WIELAND, L. WEISS, I. EGER-NEUFELDT, A. TEINZER und B. WESTERMANN, Klin. Wschr. 43, 645 (1965).
5. O. WIELAND und L. WEISS, Biochem. biophys. Res. Commun. 13, 26 (1963).
6. O. WIELAND, L. WEISS und I. EGER-NEUFELDT, Biochem. Z. 339, 501 (1964).
7. G. K. TURBS, Biochim. biophys. Acta 70, 608 (1966).
8. I. EGER-NEUFELDT, A. TEINZER, L. WEISS und O. WIELAND, Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 43 (1965).
9. J. BERNDT, O. ULRICH und R. GAUMERT, Biochim. biophys. Acta 137, 43 (1967).
10. J. G. CONIGLIO, D. B. McCORMICK und G. W. HUDSON, Am. J. Physiol. 185, 577 (1956).
11. M. G. MOREHOUSE und R. L. SEARCY, Fedn Proc. 13, 267 (1954).
12. H. J. M. HANSEN, L. G. HANSEN und M. FABER, Int. J. Radiat. Biol. 9, 25 (1965).
13. E. R. STADTMAN, in *Methods of Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1955), Vol. 1, S. 596.
14. W. M. BORTZ und F. LYNEN, Biochem. Z. 339, 77 (1963).

Mechanismus erniedrigt^{4,13,15}. Wenn jedoch nach einer Strahlenbelastung der Gehalt dieser Verbindungen absinkt, wie es in der Figur gezeigt ist, dann ist der «feed back» zur Regulation der Acetyl-CoA-Carboxylase teilweise aufgehoben. Damit wären aber im Hinblick auf den Hemmstoff die Voraussetzungen für eine erhöhte Fettsäuresynthese gegeben. Es sei darauf hingewiesen, dass ein enger zeitlicher Zusammenhang besteht zwischen dem Abfall der Fettsäure-CoA-Verbindungen und einem erhöhten Fettgehalt in der Leber bestrahlter, hungernder Mäuse.

Man darf annehmen, dass sich die Konzentrationsänderungen der Fettsäure-CoA-Verbindungen nach der Strahleneinwirkung auch auf die Aktivitäten der beiden anderen eingangs erwähnten Enzyme in ähnlicher Weise auswirken¹⁶.

Summary. The contents of fatty acid CoA derivatives were measured in mouse liver after whole-body X-irradiation with 690 R. While the contents are almost unchanged in fed mice, a decrease occurs in 24 h starved mice after the irradiation. The results are discussed with respect to fatty acid synthesis.

J. BERNDT und R. GAUMERT

*Radiologisches Institut der Universität
Freiburg i. Br. (Deutschland), 19. Juli 1968.*

¹⁵ P. K. TUBBS und P. B. GARLAND, Biochem. J. 93, 550 (1964).

¹⁶ Dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung sowie der Stiftung Volkswagenwerk sei für Sachbeihilfen bestens gedankt.

Studies on Phytohemagglutinins II. Phytohemagglutinins of *Pisum sativum* L. and *Lens esculenta* Moench: Specific Interactions with Carbohydrates

The specific interaction of concanavalin A, the phytohemagglutinin of *Canavalia ensiformis* L., with some polysaccharides has been known for several years^{1,2} and studied by some workers in detail³⁻⁶. Recently, ASPBERG et al.⁷ reported that the non-specific phytohemagglutinin of *Vicia cracca* exhibited some similar properties. In our work dealing with isolation and characterization of phytohemagglutinins of leguminous plants, we have found that substances with hemagglutinating activity, contained in seeds of the pea (*Pisum sativum* L., var. Pyram) and the lentil (*Lens esculenta* Moench., var. Hrotovická), precipitate some polysaccharides and are strongly adsorbed to the Sephadex matrix. We have also found that monosaccharides and oligosaccharides, which inhibit the hemagglutinating activity of these phytohemagglutinins, likewise influence their rate of flow by electrophoresis on starch gel. As a rule, the inhibitory power of these sugars is directly proportional to the acceleration they impart to phytohemagglutinins when applied with them in solution to the starch gel.

The isolation of the crude phytohemagglutinin was carried out as described by LIENER⁸ up to the ammonium sulphate fractionation. For further purification adsorption on Sephadex G-200 was used in a simple procedure which will be described in detail later. Desorption was effected with either HCl gradient or glycine-HCl buffer pH 2.0. As shown in Figure 1, the capacity of different Sephadex types decreases in the order G-200 > G-100 > G-50 > G-25. The amount of protein mixture used in this experiment corresponds approximately to the capacity of the Sephadex G-200 column of given size so that part of the active substance appears in the normal saline eluate from G-100 and G-50 columns (Figure 1B, C).

Homogeneity of the isolated phytohemagglutinins was checked by vertical starch gel electrophoresis according to SMITHIES⁹. In short runs (3 h), agglutinins appeared as 1 homogeneous band, but on prolonged electrophoresis (7-8 h), these bands could be resolved into 2 distinct fractions (Figure 2). When electrophoresis was run on gels prepared in 0.03 M acetate buffer pH 5.0 (using 0.1 M buffer of the same pH as the bridge solution)¹⁰, agglutinins of both the pea and the lentil invariably showed only 1 band, even on prolonged runs. The main difference in the electrophoretic behaviour of phytohemagglutinins of

these 2 species resides in the direction of their migration in borate buffer. While pea agglutinins migrate to the positive pole, lentil agglutinins move to the negative one (Figure 2). Comparative electrophoretic analysis of phytohemagglutinin fractions from different pea and lentil varieties showed quantitative and (in lentil) also qualitative differences in the pattern of active components.

Inhibition of type O red blood cell agglutination by sugars^a

Sugar	Hemagglutinin from pea	lentil
D-Glucose	128	256
D-Galactose	0	0
D-Mannose	512	128
D-Fructose	16	8
D-Arabinose	1	0
Maltose	32	32
Sucrose	32	8

^a Numbers indicate last degree of 2-fold serial dilution of 2% sugar solution (= 1) which causes perceptible inhibition of hemagglutination by a 0.004% phytohemagglutinin solution¹³.

¹ J. B. SUMNER and D. J. O'KANE, Enzymologia 12, 251 (1948).

² H. O. J. OLSON and I. E. LIENER, Biochemistry 6, 105 (1967).

³ I. J. GOLDSTEIN, C. E. HOLLERMAN and J. M. MERRICK, Biochim. biophys. Acta 97, 68 (1965).

⁴ I. J. GOLDSTEIN, C. E. HOLLERMAN and E. E. SMITH, Biochemistry 4, 876 (1965).

⁵ I. J. GOLDSTEIN and L. L. SO, Archs Biochem. Biophys. 111, 407 (1965).

⁶ L. L. SO and I. J. GOLDSTEIN, J. biol. Chem. 243, 2003 (1968).

⁷ K. ASPBERG, H. HOLMÉN and J. PORATH, Biochim. Acta 160, 116 (1968).

⁸ I. E. LIENER, J. Nutr. 49, 527 (1953).

⁹ O. SMITHIES, Biochem. J. 71, 585 (1959).

¹⁰ Chromatographic and Electrophoretic Techniques (Ed. I. SMITH, William Heineman, London and Interscience, New York 1960), vol. 2, p. 133.