

## 61. Die Aktivität der Cholinoxydase bei $B_2$ -Avitaminose.

6. Mitteilung über das Verhalten der essentiellen Fettsäuren im Tierkörper<sup>1)</sup>

von G. Viollier.

(24. I. 48.)

In der Rattenleber findet sich ein Enzym, die Cholinoxydase, welches bei  $p_H$  6,7 Cholin zu Betainaldehyd zu oxydieren vermag, während bei  $p_H$  7,8 Betain entsteht. Das Enzym ist imstande, Cytochrome c (und unter anaeroben Bedingungen Ferricyanid) zu reduzieren und wird durch hochmolekulare Fettsäuren sehr deutlich gehemmt<sup>2)</sup><sup>3)</sup>. Nach diesen Befunden könnten die hochmolekularen Fettsäuren den oxydativen Abbau des Cholins in der Leber derart steuern, dass bei ihrer Anreicherung in der Leber jeweils eine grössere Menge von Cholin für den Aufbau der Phosphatide übrig bliebe.

In Fortsetzung der in der vorangehenden Mitteilung begonnenen Fermentstudien wurde das Verhalten der Cholinoxydase bei fettfreier Diät und nach Zusatz von Linolsäure (Sonnenblumenöl) untersucht. Die Versuche haben die Annahme, dass die Cholinoxydase durch ungesättigte Fettsäuren *in vivo* beeinflusst werden könne, nicht bestätigt. Hingegen wurde eine ausgesprochene Abhängigkeit der Cholinoxydaseswerte vom  $B_2$ -Gehalt der Nahrung beobachtet.

### Methodik.

Der Sauerstoffverbrauch wurde im *Warburg*-Apparat gemessen. Temperatur 37,8°. Flüssigkeitsvolumen 3,2 cm<sup>3</sup>. Substrat: Cholinchlorid „Roche“ als ca. 2-proz. Lösung in Phosphatpuffer  $p_H$  7,8. Von dieser Lösung wurden 0,5 cm<sup>3</sup> pro Ansatz verwendet. Im inneren Einsatz der *Warburg*-Gefässen befanden sich 0,2 cm<sup>3</sup> 1,0-n. NaOH, im Gasraum  $O_2$ . Versuchsdauer 1 Stunde, Ablesungen nach 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Werte für die Leeratmung (Enzym ohne Substrat) wurden nicht abgezogen.

Gewinnung der Lebersuspension: 4 g Rattenleber werden in einem Mörser mit etwas Quarzsand und Phosphatpuffer  $p_H$  7,8 verrieben, der Brei durch ein Multtuch gepresst, hierauf das Tuch mit Puffer nachgewaschen. Im ganzen wurden 20 cm<sup>3</sup> Puffer gebraucht. Diese Lebersuspension wurde 24 Stunden im Eisschrank gegen destilliertes Wasser dialysiert (wobei 3mal das Wasser gewechselt wurde), darauf zentrifugiert und der Niederschlag in 5 cm<sup>3</sup> glasdestilliertem Wasser suspendiert, dann noch einmal zentrifugiert und das Zentrifugat schliesslich in das doppelte Volumen Phosphatpuffer  $p_H$  7,8 suspendiert. Als Ansätze wurden entweder 0,5 oder 1,0 cm<sup>3</sup> dieser Lebersuspension (entsprechend 0,4 bzw. 0,8 g Frischleber) verwendet.

Untersucht wurden 2 Serien von  $B_2$ -avitaminotischen Ratten aus einer homogenen Zucht, die während 9—10 Wochen Lactoflavin-frei ernährt wurden. Die erste Serie erhielt kein Nicotinsäureamid zum Grundfutter zugeführt, während die zweite Serie wöchentlich mit 1 mg Nicotinsäureamid versorgt wurde. Die fettlöslichen Vitamine waren dem Grundfutter in Form von Lebertran beigemischt. Als Kontrolltiere dienten gleiche Ratten, die aber zu der  $B_2$ -Mangelkost wöchentlich 70 γ Lactoflavin erhielten.

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung: *Helv.* **31**, 331 (1948).

<sup>2)</sup> *F. Bernheim und M. L. C. Bernheim*, *Am. J. Physiol.* **121**, 55 (1938).

<sup>3)</sup> *F. Bernheim*, *J. Biol. Chem.* **133**, 291 (1940).

## Ergebnisse.

Aus den Zahlen der Tabelle 1 sieht man, dass beim Fehlen von Vitamin B<sub>2</sub> die Cholinoxydasewerte der Leber stark herabgesetzt sind. Bei den Tieren, die Nicotinsäureamid erhielten, sind zwar die Resultate durchwegs höher. Dies röhrt jedoch z. T. daher, dass bei diesen Tieren für den einzelnen Versuch nicht 0,4 sondern 0,8 g Leber verwendet wurden. Berechnet man den Sauerstoffverbrauch pro g Leber und Stunde ( $Q_{O_2}$ ), so ist der Unterschied zwischen den Ratten mit Nicotinsäureamid und denjenigen ohne Nicotinsäureamid deutlich erkennbar. Die Werte sind in Fig. 1 graphisch gegenübergestellt. In dieser Darstellung ist der Einfluss des Lactoflavin auf die Cholinoxydase auch bei Zufuhr von Nicotinsäureamid beträchtlich.

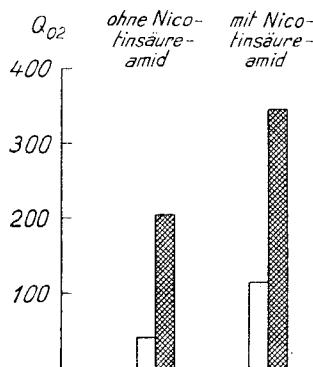


Fig. 1.

Cholinoxydasewirkung, gemessen am Sauerstoffverbrauch in mm<sup>3</sup> pro g Leber und Stunde, bei B<sub>2</sub>-Mangelratten (weisse Flächen) und bei Kontrolltieren mit 70 γ Lactoflavin pro Woche (schräffierte Flächen). 1. Serie ohne Nicotinsäureamid, 2. mit Nicotinsäureamid ernährt.

**Tabelle 1.**  
Verhalten der Cholinoxydase bei B<sub>2</sub>-Avitaminose.  
(mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> pro Stunde.)

Art der Tierfütterung und Enzymmenge	Zahl der Tiere	B <sub>2</sub> -Mangelratten		Zahl der Tiere	Kontrolltiere (70 γ Lactoflavin pro Woche)	
		Enzym + Cholin	Leeratmung		Enzym + Cholin	Leeratmung
ohne Nicotinsäureamid 0,4 g Leber	7	17 ± 6,3 (0—33)		7	86 ± 14,9 (38—147)	
mit Nicotinsäureamid 0,8 g Leber	8	94 ± 15,6 (52—161)	12 (0—28)	6	275 ± 37,3 (170—374)	9 (0—21)

Die mittleren Abweichungen  $\varepsilon$  der Mittelwerte wurden aus der Differenza media  $\Delta$  von Corrado Gini (zitiert nach H. Schorer, Statistik, Bern 1946, S. 157) nach der Formel  $\varepsilon = \frac{\Delta}{\sqrt{n}}$  berechnet.

### Diskussion.

Die mitgeteilten Resultate weisen darauf hin, dass mindestens eine oder evtl. mehrere der Komponenten des Cholinoxydasesystems durch den Lactoflavingehalt der Nahrung beeinflusst werden. Zu der Annahme, daß die Cholinoxydase ein Flavinferment ist, berechtigen aber diese Befunde noch keineswegs. Der endgültige Beweis, dass die Cholinoxydase Flavinnatur besitzt, wird wohl erst nach der weiteren Reinigung und Aufspaltung des Enzyms in seine verschiedenen Bestandteile geliefert werden können. Erwähnt sei, dass nach den Angaben von *Bernheim* und *Bernheim*<sup>1)</sup> das dialysierte Enzympräparat ausser Cholin Bernsteinsäure, *d*-Prolin, Tyramin und in geringem Ausmass auch Xanthin zu oxydieren vermag. Unbehandelte Leberemulsion baut auch Äthylalkohol ab; das dialysierte Leberpräparat vermag hingegen Äthylalkohol nicht mehr zu oxydieren, obschon es das Cholin an der Alkoholgruppe angreift.

*Axelrod, Potter* und *Elvehjem*<sup>2)</sup> haben in der Leber von  $B_2$ -Mangelratten eine deutliche Abnahme der Bernsteinsäuredehydrase festgestellt, die nach Zufuhr von Lactoflavin wieder annähernd normalisiert wurde. Aus diesen Befunden und aus der Tatsache, dass in den Organen von  $B_2$ -Mangelratten die Konzentrationen von zwei typischen Flavinproteiden — der *d*-Aminosäureoxydase und der Xanthinoxydase<sup>3)4)</sup> — vermindert sind, nahmen die genannten Autoren an, dass die Bernsteinsäuredehydrase möglicherweise ebenfalls ein Flavinferment sein könnte. Ob für die Cholinoxydase diese Annahme berechtigt ist, kann nicht entschieden werden. Man könnte die verminderte Geschwindigkeit des Cholinabbaues in der Leber von  $B_2$ -Mangelratten ebenso gut durch den Mangel an Proteinkomponenten wie durch das Fehlen der prosthetischen Gruppe eines (hypothetischen) Flavinfermentes erklären, wie dies z. B. *Shack*<sup>5)</sup> zur Erklärung der Abnahme der *d*-Aminosäureoxydaseaktivität in der Leber von  $B_2$ -avitaminotischen Tieren getan hat.

### Zusammenfassung.

Bei  $B_2$ -Mangelratten ist die Cholinoxydase der Leber gegenüber Kontrolltieren, denen Lactoflavin (70  $\gamma$  pro Woche) zugeführt wurde, deutlich herabgesetzt. Die Bedeutung dieses Befundes im Hinblick auf die Struktur der Cholinoxydase wird diskutiert.

Medizinische Universitätsklinik, Basel.

<sup>1)</sup> *F. Bernheim* und *M. L. C. Bernheim*, Am. J. Physiol. **121**, 55 (1938).

<sup>2)</sup> *A. E. Axelrod*, *V. R. Potter* und *C. A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **142**, 85 (1942).

<sup>3)</sup> *A. E. Axelrod* und *C. A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **140**, 725 (1941).

<sup>4)</sup> *A. E. Axelrod*, *H. A. Sober* und *C. A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **134**, 749 (1940).

<sup>5)</sup> *J. Shack*, zitiert nach *J. P. Greenstein*, Adv. in Enzymol. **3**, 315 (1943).