

franconite. Il est alors indispensable de multiplier les adsorptions par la méthode plombique, procédé qui ne présente, par ailleurs, aucune difficulté.

Paris, mai 1938.

Laboratoire de physiologie de M. le prof. *Portier*, Institut océanographique, et Laboratoire de Physiologie de la nutrition de l'Ecole des Hautes Etudes.

Genève, Laboratoires de Chimie technique, théorique et d'Electrochimie (Prof. *Briner*).

114. Phosphorylierung von Riboflavin durch Darmschleimhaut-extrakte und die Wirkung von Jodessigsäure darauf

von H. Hübner und F. Verzár.

(20. VII. 38.)

Untersuchungen dieses Institutes hatten seit 1933 betont, dass in der Darmschleimhaut Phosphorylierungen zustande kommen¹⁾. Das wurde für die Resorption von Glucose, ferner für die Fettsynthese gefolgert, aber es wurde auch schon 1935—36 für Lactoflavin angenommen²⁾. Diese Annahmen beruhten zum grössten Teil auf Resorptionsversuchen und auf Beobachtungen über die Wirkung von die Phosphorylierung hemmenden Giften. Schon 1934 wurde auch die Phosphorylierung von Zuckern mit Schleimhaut-extrakten versucht^{1) 3)} und ein Verschwinden von anorganischem Phosphat gesehen. Dann hat *Rudy*⁴⁾ in einer kurzen Mitteilung berichtet, dass ihm die Bildung von Flavin-phosphorsäure aus Lactoflavin mit Glycerin-Extrakten, welche nach der für die Phosphorylierung von Glucose bewährten Methode hergestellt wurden, gelungen sei. Der Befund konnte aber später weder von ihm⁵⁾ noch von *Emmerie* und *van Eekelen*⁶⁾ (1937) reproduziert werden.

Vor kurzem hat *Tauber* (1938)⁷⁾ mitgeteilt, dass er mit einem durch Extraktion mit Aceton gereinigten Trockenpulver der Darmschleimhaut regelmässig eine Phosphorylierung von Vitamin B₁ erhalten habe. Wir versuchten, ob 1. Darmschleimhaut-Trockenpulver Lactoflavin phosphoryliert und ob 2. jene Faktoren, welche im Lebenden diese Phosphorylierung hemmen, das auch in vitro können.

¹⁾ *W. Wilbrandt* und *L. Laszt*, *Bioch. Z.* **259**, 398 (1933).

²⁾ *F. Verzár* und *L. Laszt*, *Pflüger's Arch.* **236**, 693 (1935); **237**, 476 (1936).

³⁾ *L. Laszt*, *Bioch. Z.* **276**, 44 (1935).

⁴⁾ *H. Rudy*, *Naturwissenschaften* **23**, 286 (1935).

⁵⁾ Zitiert nach *Emmerie* und *van Eekelen*, l. c.

⁶⁾ *A. Emmerie* und *M. van Eekelen*, *Acta Brevia Neerlandica* **7**, 169 (1937).

⁷⁾ *H. Tauber*, *J. Biol. Chem.* **123**, 499 (1938).

Es wird deshalb dem Extrakt Jodessigsäure zugesetzt und deren Wirkung untersucht und 3. werden Ratten mit Jodessigsäure vergiftet und nach ihrem Tode die Darmschleimhaut auf ihre Fähigkeit zu phosphorylieren geprüft.

Methodik.

Herstellung des Schleimhautpulvers.

Diese geschieht in Anlehnung an die Vorschriften von *Tauber*. Während dieser nur Duodenal-Schleimhaut vom Schwein verwendet hat, haben wir uns überzeugt, dass auch die übrige Dünndarmschleimhaut wirksam ist.

Die Schleimhaut wird mit einem Schaber (bei kleinen Tieren Objektträger) von ganz frischem Darm, der vorher mit 40° C Wasser ausgewaschen wurde, abgeschabt und sogleich in Aceton gegeben, gut durchgeschüttelt, durch ein Faltenfilter dekantiert und dies 6 mal wiederholt. Hierdurch wird die Schleimhaut wasserfrei. Der Rückstand wird auf dem Filter gesammelt und dann bei Zimmertemperatur im evakuierten Exsikkator getrocknet, hierauf durch ein feines Drahtnetz gesiebt, zerrieben und im Eiskasten aufbewahrt. Aus einem Schweinedarm erhielten wir etwa 15 g, aus einem Rattendarm etwa 0,25 g Trockenpulver.

Phosphorylierung von Riboflavin mit Schleimhaut-Trockenpulver.

Wir benützen als Riboflavin „Lactoflavin Roche“¹⁾. 2 mg werden in 30 cm³ Phosphatpuffer p_H 6,8 gelöst. Hierzu wird 1 g Schleimhauttrockenpulver sorgfältig eingerührt und 20 Stunden im Brutschrank unter häufigem Schütteln gehalten. Sterilität und Schutz vor Licht sind wichtig.

Dann wird das Gemisch 5 Minuten gekocht, unter Zugabe von höchstens 2 Tropfen Octylalkohol, um das Schäumen zu verhindern, scharf abzentrifugiert und filtriert (*Berkefeld* Bakterienfilter oder *Schott*-Glasfilter G5).

Nachweis der Phosphorylierung durch Kataphorese.

Riboflavin wandert bei Kataphorese nicht, Flavin-phosphorsäure dagegen anodisch. Um auf Grund dieses Unterschiedes die Phosphorylierung nachzuweisen, wird die filtrierte Lösung mit einem 5-fach konzentrierten Phosphatpuffer p_H 7,2 auf genau p_H 7,2 gebracht. Ein dabei eventuell sich bildender Niederschlag wird durch ein Barytfilter abfiltriert. Wir benützten einen einfachen Kataphorese-Apparat von *Landauer* und *Pauli*, den wir so modifizierten, dass wir oben an den Hähnen Seitenröhren anbringen liessen, von

¹⁾ Wir danken der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Cie., A.G.*, Basel, für die Überlassung von Lactoflavin.

wo aus Proben der Flüssigkeit an den Polen entnommen werden konnten. Die obige Lösung war die Mittelflüssigkeit, während als Seitenflüssigkeit 5-fach konzentrierter Phosphatpuffer, 5-fach mit destilliertem Wasser verdünnt, verwendet wurde. Die Stromzuleitung geschah mit 10-proz. Kupfersulfatlösung in die blanke Kupferdrähte eintauchten. Die Verbindung der Elektroden zum Kataphoreseapparat geschah mit Agar-Kaliumchlorid-Elektroden. Die Kataphorese wurde im Eiskasten bei 0° ausgeführt. Es wurde pulsierender Gleichstrom von 220 Volt, 5—10 Milliamp. 8 Stunden bei p_H 7,2 verwendet.

Ist Phosphorylierung vorhanden, so findet man an der Anodenseite eine intensiv grüne Fluoreszenz, während an der Kathodenseite gar keine zu sehen ist.

Versuche.

I.

Unsere Versuche ergaben, dass das Trockenpulver aus Darmschleimhaut tatsächlich eine Phosphorylierung des Riboflavins verursacht. Als optimalen Bereich fanden wir p_H 6,7—7,2. Bei p_H 5,4, 5,8 und 8 war das Resultat negativ.

Nicht nur Duodenum, sondern auch Jejunum und Ileum des Schweinedarms und ebenso Trockenpulver aus Katzen- und Rattendarm waren wirksam. Es wurden drei verschiedene Schweinedärme, drei verschiedene Katzen- und drei Gruppen von normalen Rattendärmen aufgearbeitet und alle Trockenpulver als wirksam befunden.

Der Nachweis mit Kataphorese und mit Fluoreszenz an der Anode ist so einfach, dass man damit eine sehr bequeme Methode in der Hand hat, um die Phosphorylierungsfähigkeit der Darmschleimhaut zu demonstrieren.

Versuchsbeispiel: 10 γ „Lactoflavin“ in 10 cm³ Phosphatpuffer p_H 7,2 und hierzu 0,3 g Trockenpulver aus Schweinedarm in 3 cm³ Puffer; 20 Stunden im Thermostat, Aufarbeitung wie oben. Starke anodische Wanderung des Flavins.

II.

Wirkung der Jodessigsäure in vitro.

Die folgenden Versuchsbeispiele zeigen, dass Jodessigsäure in vitro diese Phosphorylierung hemmt.

Versuch 16: 2 mg „Lactoflavin“ + 30 cm³ Phosphatpuffer p_H 6,8 + 1 g Trockenpulver aus Schweinedünndarm + 10 cm³ 1-proz. Monojodessigsäure (1 : 400) und wieder auf p_H 6,8 eingestellt. 20 Stunden im Brutschrank. Keine anodische Wanderung.

Versuch 17: Dieselbe Zusammenstellung ohne Jodessigsäure zeigt starke anodische Wanderung.

Versuch 19: 0,3 g Trockenpulver aus Rattendünndarmschleimhaut in 3 cm³ Phosphat-Puffer von p_H 6,8 + 10 γ „Lactoflavin“ in 10 cm³ Puffer. 20 Stunden im Brutschrank. Starke anodische Wanderung.

Versuch 20: Dieselbe Zusammenstellung mit 1 : 1500 Jodessigsäure gibt keine Wanderung bei der Kataphorese.

Demnach hemmt Jodessigsäure die Phosphorylierung von Riboflavin durch Darmschleimhaut auch *in vitro* in denselben grossen Verdünnungen wie *in vivo* bei der Ratte.

III.

Weitere Versuche sollten nun zeigen, ob die Hemmung der Phosphorylierung auch dann nachweisbar wird, wenn man die Tiere *in vivo* vergiftet. Die Ratten Nr. 21—24 erhielten pro g Körpergewicht 80—100 γ und nach 5 Stunden nochmals 45—100 γ Jodessigsäure subcutan. Sie lebten danach 5—9½ Stunden. Sogleich nach dem Tod wurde die Schleimhaut des Darmes in der üblichen Weise abgeschabt und das Trockenpulver hergestellt. Das Resultat war in zwei Parallelversuchen, dass auch mit diesem Trockenpulver eine anodische Wanderung, d. h. eine Phosphorylierung des Riboflavins eintrat.

Demnach hemmt die tödliche Jodessigsäurevergiftung zwar die Phosphorylierung des Riboflavins *in vivo*, aber sie vernichtet die Phosphatase der Dünndarmschleimhaut nicht.

Diskussion.

Die hier beschriebenen Versuche zeigen, dass es gelingt, mit einem Trockenpulver der Darmschleimhaut Riboflavin regelmässig zu phosphorylieren. Zwar wurde der direkte Beweis durch Analyse nicht versucht, was bei den sehr geringen Mengen schwierig wäre, sondern es wurde das anodische Wandern des Farbstoffes als Beweis dafür betrachtet. Bekanntlich wandert Riboflavin nicht, dagegen Flavin-phosphorsäure anodisch. Trockenpulver von drei verschiedenen Tierarten wurden geprüft und als optimaler Reaktionsbereich p_H 6,8—7,2 gefunden.

Mit diesem System gelingt es nun, die bisher immer nur indirekt gefolgerte Hemmung der Phosphorylierung durch sehr verdünnte Jodessigsäure *in vitro* nachzuweisen. Aber es gelingt auch, bei den an Jodessigsäurevergiftung gestorbenen Tieren zu zeigen, dass ihre Darmschleimhaut auch weiterhin phosphoryliert, dass also nicht die Phosphatase zerstört, sondern nur durch die Jodessigsäure gehemmt war.

Zusammenfassung.

1. Mit Aceton behandeltes Trockenpulver der Dünndarmschleimhaut von Schwein, Katze und Ratte phosphoryliert Riboflavin intensiv *in vitro*. Die Bedingungen werden festgestellt.
2. Jodessigsäure hemmt diese Phosphorylierung *in vitro*.
3. Die Dünndarmschleimhaut von mit Jodessigsäure vergifteten Tieren hat die Fähigkeit zu phosphorylieren behalten.

Physiologisches Institut der Universität Basel.