

140. Reaktivierung der Fettsäuresynthese beim Biotinmangelhühnchen durch Biotinzugabe *in vitro*

von F. v. Schulthess und F. Leuthardt

(20. IV. 63)

Wie wir früher mitgeteilt haben¹⁾ wird radioaktives Biotin bei Inkubation mit Leberextrakten von Biotinmangelhühnchen in Anwesenheit von Adenosintriphosphat in das Eiweiss eingebaut. Man kann annehmen, dass es sich bei den Proteinen, an welche unter diesen Bedingungen das Biotin angelagert wird, um die Apoenzyme von Biotinenzymen handelt. In den letzten Jahren wurden mehrere derartige Fermente bekannt, so die β -Methylcrotonyl-Coenzym-A-Carboxylase²⁾, die Propionyl-Coenzym-A-Carboxylase³⁾, die Methylmalonyl-Coenzym-A-Oxalacetat-Transcarboxylase⁴⁾ und die Pyruvat-Carboxylase⁵⁾. Daneben wurden aber auch Enzyme gefunden, deren Aktivitäten beim Biotinmangelhühnchen herabgesetzt sind, so das «malic enzyme» von OCHOA⁶⁾ und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase⁷⁾, die jedoch kein Biotin enthalten⁸⁾. WAKIL und Mitarbeiter haben den Nachweis erbracht, dass die Fettsäuresynthese vom Biotin abhängig ist⁹⁾; der Reaktionsmechanismus des Biotins wurde von LYNEN u. Mitarb. aufgeklärt²⁾. Das an der Fettsäuresynthese beteiligte biotinhaltige Enzym ist die Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase, welche die Carboxylierung des Acetyl-Coenzym A zu Malonyl-Coenzym A ermöglicht¹⁰⁾. Bei Biotinmangeltieren liegt ein Teil der Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase wahrscheinlich in Form des inaktiven Apoferments vor; damit ist die Bildung von Malonyl-Coenzym A und, da diese Carboxylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese ist¹¹⁾, die Bildung der höheren Fettsäuren gehemmt. Es stellt sich nun im Hinblick auf unsere früheren Versuche¹⁾ die Frage, ob durch Zugabe von Biotin *in vitro* die Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase reaktiviert

¹⁾ A. GILGEN, M. BETTEX & F. LEUTHARDT, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **18**, C 31 (1960); A. GILGEN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **45**, 1833 (1962).

²⁾ F. LYNEN, J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING & E. RINGELMANN, *Angew. Chem.* **71**, 481 (1959).

³⁾ H. A. LARDY & R. PEANASKY, *Physiol. Rev.* **33**, 560 (1953).

⁴⁾ R. W. SWICK & H. A. WOOD, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **46**, 28 (1960); R. STJERNHOLM, H. G. WOOD, S.H.G. ALLEN & B. JAKOBSON, *Fed. Proc.* **21**, 244 (1962).

⁵⁾ M. F. UTTER & D. B. KEECH, *J. biol. Chemistry* **235**, PC 17 (1960).

⁶⁾ S. OCHOA, A. MEHLER & A. KORNBURG, *J. biol. Chemistry* **167**, 871 (1947).

⁷⁾ M. F. UTTER & K. KURAHASHI, *J. biol. Chemistry* **207**, 787, 821 (1954).

⁸⁾ S. OCHOA, A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, TH. H. HUHER, C. E. HOFFMANN & M. REGAN, *J. biol. Chemistry* **170**, 413 (1947); M. BETTEX-GALLAND, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **17**, 175 (1959); G. SEMENZA, L. S. PRESTIDGE, D. MÉNARD-JEKER & M. BETTEX-GALLAND, *Helv.* **42**, 669 (1959).

⁹⁾ S. J. WAKIL, E. B. TITCHENER & D. M. GIBSON, *Biochim. biophysica Acta* **29**, 225 (1958).

¹⁰⁾ S. J. WAKIL, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 6465 (1958).

¹¹⁾ J. GANGULY, *Biochim. biophysica Acta* **40**, 110 (1960); S. NUMA, M. MATSUHASHI & F. LYNEN, *Biochem. Z.* **334**, 203 (1961).

und damit die Bildung von Malonyl-Coenzym A und der höheren Fettsäuren normalisiert werden kann. Wir haben darüber in einer kurzen Mitteilung berichtet¹²⁾. Für unsere Versuche haben wir im wesentlichen das von WAKIL & TIETZ beschriebene System der Fettsäuresynthese benützt¹³⁾.

Material und Methoden

1. *Versuchstiere*: Frisch geschlüpfte Kücken wurden mit einem üblichen Kückenfutter (Carnogen Kückenfutter, NEUMÜHLE Baar, ZG) und einer Zulage von 20% rohem Hühnereiweiss aufgezogen. Nach 4–6 Wochen zeigten die Tiere ausgesprochene Symptome der Biotinhypovitaminose: Wachstumsverzögerung, Dermatitis, struppiges Federkleid, Parakeratose des Schnabels und der Füsse, subepidermale Hämorrhagien, Diarrhoe usw.

2. *Herstellung der Extrakte*: Die Tiere wurden dekapitiert, die Lebern sofort entnommen und auf 4°C gekühlt. Das Lebergewebe wurde dann mit einem eisgekühlten Phosphat-Hydrogencarbonat-Puffer¹⁴⁾ im Verhältnis 1:1,5 (Gewicht/Volumen) versetzt und während einer Minute im Turmix homogenisiert. Zur Entfernung der Zellkerne und Mitochondrien wurde das Homogenat 15 Min. bei 3000 g zentrifugiert. Das Überstehende wurde zur Entfernung der Mikrosomen 30 Min. bei 104000 g zentrifugiert (SPINCO Ultrazentrifuge, Modell L). Alle diese Operationen wurden bei einer Temperatur unter 4° ausgeführt. Das Überstehende des Ultrazentrifugates, im folgenden Gesamtextrakt genannt, wurde als solches verwendet oder fraktioniert.

3. *Fraktionierung des Gesamtextraktes*: Das Gesamtextrakt wurde durch Zusatz von festem Ammoniumsulfat bei 0° fraktioniert, und es wurden die Fraktionen von 0–30% (Fraktion 1), von 30–40% (Fraktion 2) und von 50–65% (Fraktion 3) verwendet¹⁵⁾. Die bei einer Sättigung von 40–50% Ammoniumsulfat ausgefallenen Proteine wurden nicht verwendet. Die ausgefallenen Proteine wurden nach 30 Min. ständigem Umrühren bei 10000 g sedimentiert und der Niederschlag in einem 0,02M K-Phosphatpuffer von pH 7,0 unter Zusatz von 0,005 Mol/l reduziertem Glutathion aufgenommen. Die Fraktionen wurden schliesslich während ungefähr 4 Stunden gegen einen 0,005M K-Phosphatpuffer von pH 7,0 dialysiert und anschliessend verwendet. Alle diese Schritte wurden bei Temperaturen unter 4° vorgenommen. Die Proteinbestimmungen wurden nach der Biuretmethod¹⁶⁾ ausgeführt.

4. *Ansätze*. 1 ml des Inkubationsgemisches enthielt: 8 µMol Na-Acetat (0,5 µCurie), 0,4 µMol Coenzym A, 8 µMol Adenosintriphosphat, 1 µMol MnCl₂, 30 µMol reduziertes Glutathion, 0,5 µMol Diphosphopyridinnucleotid, 0,6 µMol Triphosphopyridinnucleotid, 40 µMol Glucose-1-phosphat, 20 µMol tertiäres Natriumisocitrat, 60 µMol K-Phosphat pH 7,0, 16 µMol KHCO₃, und je nach Versuchsordnung 10 γ d-Biotin und 1 µMol MgCl₂. Das pH des Ansatzes wurde auf 7,0 eingestellt. Die Ansätze enthielten je nach Versuch pro ml 20 mg Protein des Gesamtextraktes oder 2 mg Protein der Fraktion 1, 1,2 mg Protein der Fraktion 2 und 2,5 mg Protein der Fraktion 3.

5. *Inkubation*: Alle Ansätze wurden aerob bei 37° inkubiert.

6. *Aufarbeitung*: Die Reaktionen wurden durch einen Zusatz von 1 ml frisch hergestellter alkoholischer Kalilauge unterbrochen und das Gemisch 30 Min. im siedenden Wasserbad verseift. Nach Ansäuern mit 1 ml 3,6N HCl wurden die Fettsäuren mit 3mal 5 ml Pentan extrahiert und die vereinigten Extrakte dreimal mit 5 ml 0,05-proz. Schwefelsäure gewaschen. Die Pentanphase wurde schliesslich in Probengläschen der «Liquid Scintillation counters» (PACKARD Instr.) zur Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 10 ml Szintillatorlösung gelöst und gezählt. Die Szintillatorlösung enthielt pro Liter Toluol *p. a.* 4 g 2,5-Diphenyloxazol und 100 mg 1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol. Die Zählhausbeute lag zwischen 55 und 60%.

¹²⁾ F. v. SCHULTHESS & F. LEUTHARDT, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 20, C 38 (1962).

¹³⁾ J. W. PORTER, S. J. WAKIL, A. TIETZ, M. J. JAKOB & D. M. GIBSON, *Biochim. biophysica Acta* 25, 35 (1957); A. TIETZ, *ibid.* 25, 303 (1957).

¹⁴⁾ R. O. BRADY & S. GURIN, *J. biol. Chemistry* 199, 421 (1952).

¹⁵⁾ O. BRENNER-HOLZACH & M. STAERHELIN, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 11, 212 (1953).

¹⁶⁾ G. BEISENER, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).

Acetateinbau in die Fettsäuren von Hühnchen

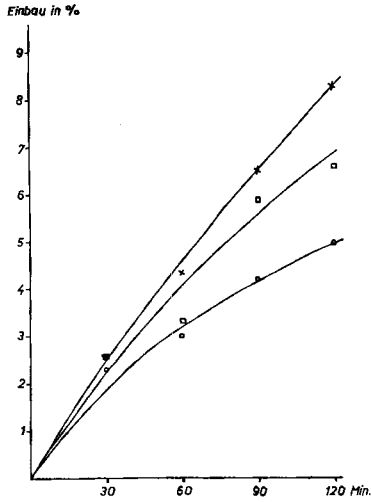


Fig. 1

Abszisse: Zeit in Minuten.

Ordinate: Acetateinbau in die Fettsäuren.

x Normaltiere; □ Mangeltiere + Biotin,

○ Mangeltiere.

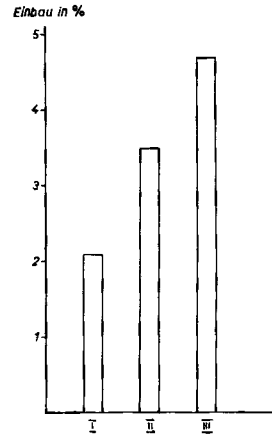


Fig. 2

I = Mangeltierfraktionen 1, 2 und 3

II = Mangeltierfraktionen 1, 2 und 3 + 10 γ Biotin

III = Normaltierfraktionen 1, 2 und 3
Inkubation 2 Stunden bei 37°

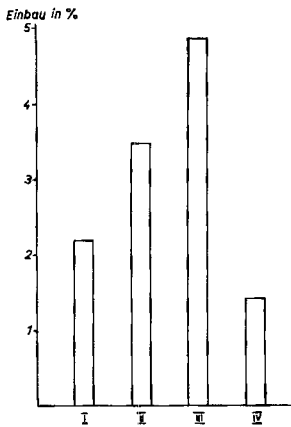


Fig. 3

I = Mangeltierfraktion 1, Normaltierfraktionen 2 und 3

II = Mangeltierfraktion 2, Normaltierfraktionen 1 und 3

III = Mangeltierfraktionen 2 und 3, Normaltierfraktion 1

IV = Mangeltierfraktionen 1 und 2, Normaltierfraktion 3

Inkubation 2 Stunden bei 37°

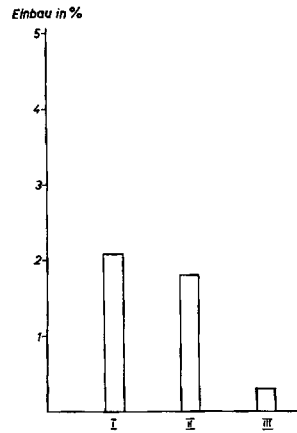


Fig. 4

I = Mangeltierextrakt

II = Mangeltierextrakt

+ denaturiertes Avidin

III = Mangeltierextrakt + Avidin

Inkubation 2 Stunden bei 37°

Ergebnisse

Auf Grund der als Acetat zugegebenen und als Fettsäuren wieder extrahierten Radioaktivität liess sich die Grösse des Einbaus resp. der Fettsäuresynthese berechnen. Die Zeitkurve in Fig. 1 zeigt, dass die Fettsäuresynthese im Gesamtextrakt der Mangelhühnchen stark reduziert ist gegenüber der Synthese im Gesamtextrakt des Normaltieres. Nach zwei Stunden Inkubation betrug der Einbau beim Normalhuhn 8,3% der zugesetzten Aktivität, beim Mangelhuhn jedoch nur 5,0%. Ein Zusatz *in vitro* von 10 γ Biotin je ml des Ansatzes verbessert die Synthese eindeutig, nämlich nach zwei Stunden Inkubation auf 6,5% der zugesetzten Aktivität. Wird mit dem Biotin noch 1 μ Mol $MgCl_2$ zugefügt, so bleibt die erwähnte Steigerung vollständig aus. Dies erklärt sich durch die Hemmung der Propionyl-Coenzym-A-Carboxylase durch Mg^{++} , wie sie von KOSOW & LANE¹⁷⁾ beobachtet worden ist. Wir haben dieses Problem aber nicht weiter verfolgt.

Figur 2 zeigt, dass sich das gleiche Resultat mit dem fraktionierten und rekombinierten Gesamtextrakt reproduzieren liess: Während die Fraktionen des Normaltieres nach 2 Stunden Inkubation 4% der zugesetzten Aktivität eingebaut hatten, betrug der Einbau bei den entsprechenden Fraktionen der Mangeltiere nur 2,1%. Das *in vitro* den Fraktionen der Mangeltiere zugesetzte Biotin steigerte den Einbau auf 3,5%.

Durch die Kombination der Mangeltier- und Normaltier-Fraktionen untereinander liess sich zusätzlich zeigen, dass die für die erniedrigte Synthese wahrscheinlich verantwortliche Fraktion die Fraktion 1 ist. Denn in den Ansätzen, bei welchen die Fraktion 1 von Mangeltieren stammt, ist der Einbau gegenüber der Norm wesentlich reduziert, während der Einbau wenig verändert ist, wenn die Fraktion 1 vom Normaltier stammt. Diese Feststellung stimmt mit der Beobachtung von WAKIL überein, nach der die biotinhaltige Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase in der Fraktion 1 enthalten ist. In Fig. 3 sind diese Resultate zusammengefasst, auf deren eingehendere Interpretation aber vorläufig verzichtet wird.

Dass die Fettsäuresynthese beim Mangeltierextrakt nur reduziert, aber nicht auf Null abgesunken ist, lässt schliessen, dass trotz dem Biotinmangel noch eine gewisse Menge aktiver Biotinenzyme gebildet werden kann. Wurde *in vitro* Avidin (hergestellt nach¹⁸⁾) zum Mangeltierextrakt zugesetzt, so liess sich der Einbau noch weiter senken, während denaturiertes Avidin keinen Einfluss auf die Fettsäuresynthese beim Mangeltierextrakt zeigte (Fig. 4).

SUMMARY

Liver extracts of Biotin-deficient chicken, compared with extracts from normal chicken, show a reduced rate of synthesis of fatty acids. This reduced synthesis can be normalized by an *in vitro* addition of *d*-biotin. We may conclude that the synthesis of active acetyl-CoA-carboxylase from the inactive apoenzyme is possible *in vitro*.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich

¹⁷⁾ D. P. KOSOW & M. D. LANE, Res. Commun. 5, 191 (1961).

¹⁸⁾ D. W. WOLLEY & L. G. LONGSWORTH, J. biol. Chemistry 142, 285 (1942).