

BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIFT

BEGRÜNDET VON
C. NEUBERG

HERAUSGEGEBEN
VON

TH. BÜCHER H. HOLZER M. KIESE

K. LANG F. LYNEN C. MARTIUS F. TURBA

K. WALLENFELS O. WESTPHAL TH. WIELAND

SCHRIFTFÜHRUNG: K. LANG

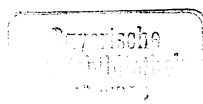
334. BAND

MIT 198 TEXTABBILDUNGEN



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1961



Inhalt des 334. Bandes

1. Heft

(Abgeschlossen am 6. Februar 1961)

	Seite
KLINGENBERG, M., und TH. BÜCHER, Glycerin-1-P und Flugmuskel-Mitochondrien. Mit 8 Textabbildungen	1
NETTER, H., und L. SACHS, Stoffwechselabhängige Magnesiumaufnahme bei Bäckerhefe. Mit 5 Textabbildungen	18
PLAGEMANN, P. G. W., K. F. GREGORY und F. WRÓBLEWSKI, Die elektrophoretisch trennbaren Lactat-dehydrogenasen des Säugetieres. III. Einfluß der Temperatur auf die Lactat-dehydrogenasen des Kaninchens. Mit 5 Textabbildungen	37
KIEFER, G., R. KIEFER, G. ZAHN und R. K. ZAHN, Über Desoxyribonucleinsäuren und Desoxyribonucleasen. Der Einfluß von DNS und Nucleotiden auf die DNase-Wirkung am Seeigelei	49
TAKAHASHI, S., und Y. SAITO, Ein manometrisches Verfahren zur Bestimmung von Hexuronsäuren. Mit 4 Textabbildungen	58
LANGEN, P., Die Gewinnung von Mononucleotiden aus hochpolymerer Desoxyribonucleinsäure mit Hilfe von Schlangengift. Mit 3 Textabbildungen	65
KETZ, H.-A., unter technischer Mitarbeit von H. WITT und M. MITZNER, Die Ausscheidung von neutralen und phenolischen Steroiden bei der Ratte	73

2. Heft

(Abgeschlossen am 10. April 1961)

BENDER, H., und K. WALLENFELS, Untersuchungen an Pullulan. II. Spezifischer Abbau durch ein bakterielles Enzym. Mit 9 Textabbildungen	79
SCHMITT, A., und G. SIEBERT, Optischer Test zur Bestimmung der Peptidaseaktivität. Mit 9 Textabbildungen	96
JAENICKE, L., und E. BRODE, Untersuchungen über Einkohlenstoffkörper. I. Die Tetrahydrofolatformylase aus Taubenleber. Reinigung und Mechanismus. Mit 6 Textabbildungen	108
ZAHN, H., und K. H. LEBKÜCHER, 4-Fluor-3-nitro-benzolsulfonsäure als Reagens zur Amino-Endgruppenbestimmung in Proteinen	133
RICHTERICH, R., und H. E. FRANZ, Das isolierte Glomerulum der Rattenniere. II. Enzymmuster des Energie-Stoffwechsels (C-Raum). Mit 6 Textabbildungen	149
RUIZ-AMIL, M., und A. SOLS, Hexokinase aus <i>Aspergillus oryzae</i> . Mit 2 Textabbildungen	168
WAGNER, H., L. HÖRHAMMER und P. WOLFF, Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. Mit 4 Textabbildungen	175
PFLEIDERER, G., und E. D. WACHSMUTH, Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe. Mit 7 Textabbildungen	185

Kurze Mitteilung

BERNHAEUER, K., und O. MÜLLER, Zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“ XIX. Über die Lichtspaltung des Cobalamin-Coenzyms zu B _{12r}	199
---	-----

3. Heft

(Abgeschlossen am 23. Mai 1961)

	Seite
NUMA, S., M. MATSUHASHI und F. LYNEN, Zur Störung der Fettsäuresynthese bei Hunger und Alloxan-Diabetes. I. Fettsäuresynthese in der Leber normaler und hungernder Ratten. Mit 1 Textabbildung	203
KATTERMANN, R., U. DOLD und H. HOLZER, D-Glycerat beim Fructoseabbau in der Leber. Mit 3 Textabbildungen	218
DECKER, K., H. EBERWEIN, F. A. GRIES und M. BRÜHMÜLLER, Über den Abbau des Nicotins durch Bakterienenzyme. IV. L-6-Hydroxy-nicotin als erstes Zwischenprodukt. Mit 9 Textabbildungen	227
GASSMANN, B., und H.-A. KETZ, Vitamin B ₁ im Magen-Darm-Trakt der Ratte. Resorption und Exkretion. Mit 6 Textabbildungen	245
FASOLD, H., G. GUNDLACH und F. TURBA, Carboxymethylierung der Sulfhydryle in Chymotrypsin und Chymotrypsinogen nach Spaltung der Disulfidbrücken durch Natriumborhydrid. Mit 4 Textabbildungen	255
KNOCHE, I., und F. HARTMANN, Einfluß von Hunger und Bestscher Mangelkost auf Adenosinphosphate und glycolytische Enzyme in der Rattenleber	269

Kurze Mitteilungen

BERNAUER, K., F. WAGNER und D. WAHL, Synthesen auf dem Vitamin B ₁₂ -Gebiet. VIII. Über die Kristallisation des Faktors V _{1a} und die Eigenschaften des kristallisierten Produktes. Mit 2 Textabbildungen	279
HEINRICH, H. C., W. FRIEDRICH und P. RIEDEL, Hochwirksame B ₁₂ -Antivitaminare aus der Reihe der Alkanolamin-Analoga des Vitamin B ₁₂ . Mit 3 Textabbildungen	284

4. Heft

(Abgeschlossen am 20. Juni 1961)

MÄRKI, F., und C. MARTIUS, Vitamin K-reduktasen aus Rinds- und Rattenleber. Mit 5 Textabbildungen	293
BILLETER, M., und C. MARTIUS, Über die Umwandlung von Vitamin K _{2(3C)} und K ₂₍₁₉₎ in Vitamin K ₂₍₂₀₎ im Organismus von Vögeln und Säugetieren. Mit 3 Textabbildungen	304
KRISCH, K., und HJ. STAUDINGER, Untersuchungen zur enzymatischen Hydroxylierung. Hydroxylierung von Acetanilid und deren Beziehungen zur mikrosomalen Pyridinnucleotidoxydation. Mit 2 Textabbildungen	312
BRODE, E., und L. JAENICKE, Untersuchungen über Einkohlenstoffkörper. II. Darstellung und Eigenschaften des Formiat-aktivierenden Enzyms aus Schafleber. Mit 4 Textabbildungen	328
JAENICKE, L., und E. BRODE unter Mitarbeit von B. RÜCKER, Untersuchungen über Einkohlenstoffkörper. III. Untersuchungen zum Mechanismus der Tetrahydrofolatformylase. Mit 7 Textabbildungen	342
HŁYŃCZAK, A. J., J. SYSA, T. TOCZYSKI und A. HORBACEWICZ, Chromatographische Mikromethode der quantitativen colorimetrischen Bestimmung höherer Fettsäuren mittels Dithizon. Mit 1 Textabbildung	357
HASSE, K., und H. SCHLEYER, Eine DPN-Nucleosidase der höheren Pflanze. Mit 2 Textabbildungen	360
SIEBERT, G., Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zellkernen. Mit 4 Textabbildungen	369
SIEBERT, G., K.-H. BÄSSLER, R. HANNOVER, E. ADLOFF und R. BEYER, Enzymaktivitäten in isolierten Zellkernen in Abhängigkeit von der mitotischen Aktivität	388

5. Heft

(Abgeschlossen am 20. Juli 1961)

	Seite
SEUBERT, W., und U. REMBERGER, Reinigung und Wirkungsweise der Pyruvatcarboxylase aus <i>Pseudomonas citronellolis</i> . Mit 5 Textabbildungen . . .	401
SCHWARZ, E., Abbau von Histidin zu Urocaninsäure in der Epidermis. Untersuchungen mit L-Histidin-2(Ring)- ¹⁴ C. Mit 3 Textabbildungen	415
ZIEGLER, I., Quantitative Bestimmung von gelbem Pterin und Riboflavin in der Haut des Feuersalamanders (<i>Salamandra salamandra</i>)	425
OERTEL, G. W., Über Steroid-konjugate in Plasma. I. Isolierung von Sulfat-, Phosphat- und Lipoid-haltigen 17-Ketosteroid-konjugaten aus menschlichem Blutplasma. Mit 3 Textabbildungen	431
FAWZI, M., H. OSMAN und G. H. SCHMIDT, Analyse der Körperfette von imaginalen Wanderheuschrecken der Art <i>Locusta migratoria migratorioides</i> L. (Orth.). Mit 1 Textabbildung	441
KALLER, H., Präparative Gewinnung von Sphingosinphosphorylcholin. Mit 1 Textabbildung	451
VOGELS, G. D., Intermediates in Anaerobic Allantoin Degradation by Bacteria	457
DEIMEL, M., und W. MAURER, Konzentration und Austauschrate des freien Methionins in Muskel und Leber der Ratte. Mit 2 Textabbildungen	462
SCRIBA, P., und H. HOLZER, Gewinnung von α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat mit Pyruvatocydase aus Schweineherzmuskel. Mit 8 Textabbildungen	473

6. (Schluß-)Heft

(Abgeschlossen am 11. August 1961)

TURBA, F., und H. HILPERT, Proteinsynthese in der Milchdrüse: Gewinnung und Vergleich der Funktion von Drüsenschnitten, Zellen und Zellfraktionen. Mit 8 Textabbildungen	487
TURBA, F., und H. HILPERT, Sekretion und Resorption von Proteinen durch isolierte Milchdrüsenzellen. Mit 3 Textabbildungen	501
TURBA, F., und H. HILPERT, Nettosynthese von β -Lactoglobulin in Milchdrüsenzellen und -schnitten. Mit 7 Textabbildungen	507
HOLT, C. VON, und H. SCHMIDT, Eine Meßordnung zur kontinuierlichen Bestimmung der ¹⁴ C-Aktivität und CO ₂ -Konzentration in der Ausatemungsluft. Mit 7 Textabbildungen	516
HOLT, C. VON, H. SCHMIDT, H. FELDMANN und I. HALLMANN, Der Umsatz der Blutglucose. Mit 4 Textabbildungen	524
SCHMIDT, H., K. GOETZ, I. HALLMANN und C. VON HOLT, Der Ablauf der Resynthese von Blutglucose. Mit 7 Textabbildungen	534
HOLT, C. VON, H. SCHMIDT und H. FELDMANN, Der Anteil der Glucoseoxydation an der Kohlendioxydproduktion der Ratte. Mit 5 Textabbildungen	545
HASCHEN, R. J., Charakterisierung und Bestimmung der Glycyl-L-leucin-di-peptidase der menschlichen Erythrocyten. Mit 5 Textabbildungen	560
HASCHEN, R. J., Charakterisierung und Bestimmung der Leucinaminopeptidase menschlicher Erythrocyten. Mit 5 Textabbildungen	569
Autorenverzeichnis	576

Gewinnung von α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat mit Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel*

Von

P. SCRIBA und H. HOLZER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg im Breisgau

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Mai 1961)

Einleitung

HETPP¹ wurde von HOLZER u. BEAUCAMP [7, 8] als Zwischenprodukt der Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Hefe, von CARLSON u. BROWN [4] bei der entsprechenden Reaktion mit Pyruvatdecarboxylase aus Weizenkeimlingen und von HOLZER u. Mitarb. [10] als Zwischenprodukt der Oxydation von Pyruvat mit Pyruvatoxydase aus Hefemitochondrien nachgewiesen. In Bestätigung des Strukturvorschlages von BRESLOW [3] und KRAMPITZ u. Mitarb. [13] konnte HETPP als in 2-Stellung am Thiazolring mit dem α -Hydroxyäthylrest substituiertes TPP identifiziert werden [6, 7, 8]. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Isolierung von ¹⁴C-HETPP aus Ansätzen von gereinigter Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel mit ¹⁴C-Pyruvat. Da den Ansätzen nur TPP, jedoch nicht α -Liponsäure, DPN und Coenzym A zugesetzt werden, vermag das in den ersten Stufen der Reaktion entstehende HETPP nicht weiter zu reagieren. Es häuft sich im Verlaufe der Inkubation in einer langsamen Sekundärreaktion an. Wir studierten die Eigenschaften dieses Systems, um günstige Bedingungen für die Gewinnung von HETPP festzulegen.

Methoden

Pyruvatoxydase-Test. Das bei der Oxydation von Pyruvat mit dem zu testenden Pyruvatoxydase-Präparat entstehende Acetyl-Coenzym A acetyliert am Hilfsenzym Arylamintansacetylase p-Nitroanilin. Die Acetylierung des Nitroanilins wird durch die Extinktionsabnahme bei 405 m μ gemessen [18]. Das bei der Pyruvatoxydation entstehende DPNH wird mit Lactatdehydrogenase und dem als Substrat eingesetzten Pyruvat reoxydiert. Arylamintansacetylase wurde nach TABOR u. Mitarb. [18] (ohne Geladsorption) angereichert und nach LYNNEN u. Mitarb. [15] getestet. Kristallisierte Lactatdehydrogenase, DPN und CoA bezogen wir von der Fa. Boehringer & Soehne (Mannheim). Für 99% TPP danken wir der Fa. E.

* Herrn Prof. Dr. JOACHIM KÜHNAU zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ *Abkürzungen:* CoA = Coenzym A; DPN = Diphosphopyridinnucleotid; DPNH = reduziertes Diphosphopyridinnucleotid; HETPP = α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat; IpM = Impulse pro Minute; TPP = Thiaminpyrophosphat.

Merck (Darmstadt). Im einzelnen waren die Bedingungen des Pyruvatoxydase-Testes folgende: 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan-HCl-Puffer p_H 7,4, $0,1 \cdot 10^{-3}$ M DPN, $0,5 \cdot 10^{-4}$ M CoA, $0,5 \cdot 10^{-3}$ M TPP, $0,75 \cdot 10^{-3}$ M $MgSO_4$, 10^{-3} M Cystein-HCl, 10^{-4} M p-Nitroanilin, 5 μg Lactatdehydrogenase, 1–3 mg Arylamintransacetylase. Gesamtvolumen 2,0 ml; Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 405 $m\mu$; $T = 21-23^\circ C$. Start mit $0,2 \cdot 10^{-2}$ M Pyruvat. Definition der Aktivitätseinheiten: 1 Einheit liegt vor, wenn die Extinktion (identisch mit „optical density“, da $d = 1$ cm) in 1 min um 1,0 abnimmt. Die spezifische Aktivität ist als Einheiten pro Milligramm Protein definiert. Zur Umrechnung auf den molaren Umsatz kann der von TABOR u. Mitarb. [18] angegebene molare Extinktionskoeffizient $1,2 \cdot 10^4$ verwendet werden.

Testversuche mit Ferricyanid als Oxydans waren negativ. Der Test mit Dichlorphenol-indophenol (siehe z. B. [9]) ergab wesentlich geringere Extinktionsänderungen als mit p-Nitroanilin. Der Pyruvatumsatz betrug etwa 10% des Umsatzes im Arylamintransacetylase-Test. Sowohl die Ammoniumsulfatfällung wie das durch Alkoholfraktionierung weiter gereinigte Enzym (vgl. Tabelle) ergaben in diesem Test mit α -Ketoglutarat als Substrat höhere Reaktionsgeschwindigkeit als mit Pyruvat. Der optische Test mit DPN war durch in der Pyruvatoxydase enthaltene Lactatdehydrogenase gestört. Ein Test, bei dem die Acetoin-Bildung nach Zusatz von Acetaldehyd (vgl. [5]) mit der von WESTERFELD [19] angegebenen Farbreaktion gemessen wurde, war zwar etwas zeitraubender als der Arylamintransacetylase-Test, ergab jedoch gute Proportionalität zur eingesetzten Pyruvatoxydase-Menge. Im einzelnen wurde das zu testende Enzympräparat 30 min in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml mit $2,5 \cdot 10^{-3}$ M Pyruvat, $2,5 \cdot 10^{-3}$ M Acetaldehyd, $1,8 \cdot 10^{-3}$ M $MgSO_4$, $0,67 \cdot 10^{-3}$ M TPP und 0,1 M Citronensäure/NaOH-Puffer p_H 6,0 bei $30^\circ C$ inkubiert. Danach wurde der Ansatz 5 min ins kochende Wasserbad gestellt, abgekühlt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Wasser auf 5,0 ml aufgefüllt und je 1,0 ml 0,5% Kreatin-Lösung und 5% α -Naphthol in 2,5 N NaOH wurden in Anlehnung an die Vorschrift von WESTERFELD [19] zugegeben. Nun wurde 10 min bei $70^\circ C$ inkubiert, 10 min zum Temperatenausgleich in ein Wasserbad von Zimmertemperatur gestellt und dann bei 546 $m\mu$ die Extinktion abgelesen.

Anreicherung von Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel (vgl. Tabelle). Die Anreicherung der Pyruvatoxydase lehnt sich in den ersten Schritten (bis zur Ammoniumsulfatfraktionierung) an die Vorschriften von KORKES u. Mitarb. [12] sowie DAWSON u. Mitarb. [5] an. Frische Schweineherzen wurden von Fett- und Bindegewebe sowie Blutgerinseln befreit, in Stücke geschnitten, 2 Std in die Tiefkühltruhe ($-20^\circ C$) gelegt (statt dessen kann auch auf $0^\circ C$ gekühlt werden) und halbgelagert durch den Fleischwolf gedreht. Der Brei wurde mit 5 Volumen kaltem H_2O fünfmal auf der Zentrifuge gewaschen (nach Suspendieren wird jeweils 20 min bei $5000 \times g$) zentrifugiert. Das Sediment ist, bei $-20^\circ C$ eingefroren, wochenlang haltbar. 100 g gefrorener Brei wurden in 350 ml kaltem 0,02 M Phosphatpuffer p_H 7,0 im Starmix homogenisiert. Das Homogenat ließ man 30 min im Eisbad stehen und zentrifugierte dann 20 min bei $3^\circ C$ und $4500 \times g$. Das Sediment wurde in 120 ml 0,02 M Phosphatpuffer p_H 7,0 im Starmix suspendiert und 20 min bei $4500 \times g$ und $3^\circ C$ zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und mit 24,5 g feingepulvertem Ammoniumsulfat pro 100 ml (35% Sättigung) versetzt. Das gefällte Protein wurde 30 min bei $4500 \times g$ und $3^\circ C$ abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 ml 0,02 M Phosphatpuffer p_H 7,0 aufgenommen und bei $-20^\circ C$ eingefroren. Nach 1–2 Tagen wurde das in diesem Zustand wochenlang haltbare Enzym aufgetaut und 30 min bei $22000 \times g$ und $0^\circ C$ zentrifugiert (stattdessen kann auch gleich nach der Ammoniumsulfatfällung 60 min bei $100000 \times g$

zentrifugiert werden). Der Überstand enthielt 60% der Pyruvatoxydase-Aktivität der vereinigten Phosphatextrakte. Die Enzymlösung wurde auf das Vierfache mit kaltem 0,02 M Phosphatpuffer p_H 7,0 verdünnt. Dann wurde bei -15°C 96%iges Äthanol (mit Benzin vergällt) bis 30 Vol.-% Endkonzentration schnell eingerührt („Plümpern“ nach BEISENHERZ u. Mitarb. [1]). Fällt man aus unverdünnter Pyruvatoxydase-Lösung, so werden 40 Vol.-% Äthanol benötigt. Die Suspension wurde sofort 30 min bei $22000 \times g$ und -10°C zentrifugiert. Man erhielt eine auf der klaren Lösung schwimmende Proteinhaut und gelegentlich ein am Boden sitzendes Sediment. Sediment und Haut wurden in 0,001 M Phosphatpuffer p_H 6,0 aufgenommen (1/10 des Volumens vor der Äthanol-fällung). Die gut geplümperte Suspension wurde 30 min bei $22000 \times g$ und 0°C zentrifugiert. Die Proteinhaut auf der Oberfläche und das Sediment wurden verworfen. Das opaleszierende Filtrat enthielt etwa ein Drittel der Pyruvatoxydase-Aktivität in der Ammoniumsulfatfällung. Das Pyruvatoxydase-Präparat ist bei 3°C einige Tage ohne wesentlichen Aktivitätsverlust haltbar. Zusatz von Äthylendiamintetraacetat (Trilon) verbessert die Haltbarkeit nicht; Einfrieren verschlechtert sie.

Papierchromatographische Isolierung von HETPP. 3–4 mg Pyruvatoxydase (spezifische Aktivität etwa 1,0) wurden in einem Gesamtvolumen von 1,4 ml mit 0,016 M Trishydroxymethylaminomethan-HCl-Puffer p_H 7,4, $0,8 \cdot 10^{-3}$ M TPP, $1,2 \cdot 10^{-3}$ M MgSO_4 und $1,8 \cdot 10^{-3}$ M $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat ($4 \mu\text{C }^{14}\text{C}$ pro Ansatz) 60 min bei 25°C inkubiert. Nun wurde das zehnfache Volumen etwa 60°C warmen Methanols zugesetzt und 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen wurde das denaturierte Protein bei $1200 \times g$ abzentrifugiert, das Sediment mit einem Gemisch von 6 ml Methanol und 0,3 ml Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum-Rotationsverdampfer eingengt und auf Schl. u. Sch.-Papier 2043 b Mgl aufgetragen. Nach etwa 36 Std absteigender Chromatographie mit n-Butanol:Eisessig:Wasser = 5:2:3 bei Zimmertemperatur und Lufttrocknung der Chromatogramme wurden unter der UV-Lampe die Stellen mit Fluoreszenzlöschung markiert. Die Dichte der Schraffierung in Abb. 4 gibt die Intensität der UV-Fluoreszenzlöschung wieder. Die Radioaktivität der Chromatogramme wurde mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 (Friescke & Hoepfner, Erlangen) registriert (vgl. Abb. 4). Die ^{14}C -HETPP enthaltende Stelle des Chromatogramms wurde mit Wasser eluiert und rechromatographiert (vgl. Teil B in Abb. 4).

Sollte die Ausbeute an Radioaktivität im papierchromatographisch abgetrennten HETPP bestimmt werden (vgl. Abb. 5 und 7), so wurde das aus dem ersten Chromatogramm eluierte HETPP rechromatographiert, mit Wasser eluiert und Proben auf Aluminium-Schälchen eingetrocknet (Massenbelegung im Bereich unendlich dünner Schicht). Gezählt wurde im Handprobenwechsler FH 411 mit dem Methandurchflußzählrohr FH 407 (Friescke & Hoepfner, Erlangen). Zur Berechnung der HETPP-Ausbeute in Mol wurde das zur HETPP-Gewinnung eingesetzte $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat unter denselben Bedingungen ausgezählt und der molare Gehalt des $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvats mit kristallisierter Lactatdehydrogenase und DPNH im optischen Test nach WARBURG ermittelt. Zu berücksichtigen ist, daß bei der Papierchromatographie unter unseren Bedingungen etwa 30% des eingesetzten ^{14}C -HETPP nicht mehr wiedergefunden wurden.

Isolierung von HETPP durch Ionenaustauschchromatographie. Zur Gewinnung von HETPP durch Ionenaustauschchromatographie wurden die vorstehend für die Papierchromatographie beschriebenen Ansätze verzehnfacht (Gesamtvolumen 14 ml). Im Unterschied zu den Ansätzen für die Papierchromatographie wurde jedoch die Endkonzentration der Puffer erniedrigt, um die Belastung der Austauschersäulen mit Ionen zu verringern. Arbeitet man mit höheren Ionen-Konzentrationen,

so werden die Pufferionen auf der Säule adsorbiert und TPP und HETPP werden nicht adsorbiert und finden sich im Waschwasser. Nach Stoppen mit heißem Methanol und Einengen wurden die Extrakte auf Ionenaustauscher-Säulen gegeben. Die Säulen enthielten bei einem Durchmesser von 1 cm 16 ml Dowex 2-Cl x 10, 200—400 mesh. Zuerst wurde mit 100 ml Wasser gewaschen, dann ließen wir 10^{-3} N HCl in ein Mischgefäß mit 250 ml Wasser zulaufen, um mit steigendem HCl-Gradienten zu eluieren. Nach Erscheinen des HETPP wurde das unveränderte $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat durch Einfließenlassen von 3 N HCl in das Mischgefäß eluiert. Die Elution erfolgte mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 ml pro Minute. Das Volumen der automatisch gesammelten Fraktionen betrug 4 ml. In Abb. 8 sind die Extinktionen ($d = 1$ cm) der Fraktionen bei der Wellenlänge des isobestischen Punktes für TPP (272,5 μ), sowie die im automatischen Probenwechsler FH 448 mit dem Methandurchflußzählrohr FH 407 (mit Endfenster) bei Impulsvorwahl 10^3 gezählten IpM von je 0,2 ml der Fraktionen aufgetragen. Die Proben wurden auf Polyvinylchlorid-Scheiben, die in Aluminiumschälchen gelegt waren, aufgetragen und im Luftstrom getrocknet. Es hat sich gezeigt, daß die Verwendung von 10^{-3} N HCl bei der Gradienten-Elution eine bessere Trennung von HETPP und TPP ermöglicht als die früher von uns [10] verwendete $2 \cdot 10^{-2}$ N HCl.

Die Kapazität des von uns verwendeten Austauschers beträgt für Pyruvat etwa 1 Millival pro Milliliter, während die Kapazität für TPP weniger als 1% davon beträgt. Da die meisten Pufferanionen ähnliche Affinitäten zum Austauscher wie Pyruvat aufweisen, muß deren Konzentration möglichst klein sein, um noch ausreichende Bindungskapazität für TPP und HETPP zu haben. Erscheinen TPP und HETPP auf Grund der Überlastung des Austauschers mit Anionen bereits im Waschwasser, so können sie nach ihrer Identifizierung durch Radiopapierchromatographie erneut der Ionenaustauschchromatographie unterworfen werden. Bei dem im unteren Teil von Abb. 8. dargestellten Versuch, der die Auftrennung eines Pyruvatoxydase-Ansatzes bei p_{H} 5 darstellt, wurde die Austauschermenge auf das Doppelte (30 ml) gegenüber den sonstigen Versuchen erhöht, um vollständige Bindung von TPP und HETPP trotz höherer Ionenkonzentration des Ansatzes zu gewährleisten.

Besprechung der Ergebnisse

1. Anreicherung und Eigenschaften von Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel

Mit dem im Abschnitt „Methoden“ angegebenen Test mit Arylamintransacetylase wurde Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel angereichert. Wir erzielten 10—15fache Reinigung bei einer Ausbeute von 20% (vgl. Tabelle).

Im Arylamintransacetylase-Test beträgt die Aktivität des gereinigten Enzyms ohne Zusatz von TPP 50—60% der Aktivität bei Sättigung mit TPP. Durch dreistündige Dialyse einer auf p_{H} 8,5 eingestellten Enzymlösung in 10^{-3} M Na-phosphatpuffer (5 ml mit 10 mg Protein) gegen 5 l 0,1% Äthylendiamintetraacetat-Lösung vom p_{H} 8,5 bei 4°C geht die Aktivität ohne TPP auf weniger als 10% der Aktivität mit $5 \cdot 10^{-4}$ M TPP zurück. Die spezifische Aktivität mit TPP-Sättigung geht hierbei auf ein Viertel des Ausgangswertes zurück. Die Abhängigkeit der Aktivität der dialysierten Pyruvatoxydase bei Pyruvatsättigung von der Konzentration an TPP ist in Abb. 1 wiedergegeben. Als Michaelis-

konstante für TPP ergibt sich $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mole/l. Neuerdings [11] führen wir die Abspaltung von TPP folgendermaßen durch: die vereinigten Extrakte in 0,02 M Na-phosphatpuffer p_H 7,0 (siehe Kapitel „Methoden“ bei „Anreicherung von Pyruvatoxydase“) werden mit 2,5% NH_4OH auf p_H 8,5 gebracht und 30 min bei $0^\circ C$ stehen gelassen. Dann werden langsam 24,5 g Ammoniumsulfat pro 100 ml hinzugegeben, wobei das p_H durch laufenden Zusatz von 2,5% NH_4OH auf 8,5 gehalten wird. Nach Zentrifugieren wird das Sediment in 1,9 M Ammoniumsulfatlösung vom p_H 8,5 (mit NH_4OH eingestellt) suspendiert und erneut zentrifugiert. Nun wird in 0,02 M Phosphatpuffer p_H 7,0 aufgenommen und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Falls notwendig, kann nach Klarzentrifugieren durch Alkoholfraktionierung weiter gereinigt werden, wie im Kapitel „Methoden“ angegeben. Die Aktivität derartiger Präparate mit TPP-Sättigung (ca. $5 \cdot 10^{-4}$ Mole/l) ist dieselbe wie bei der Aufarbeitung des Phosphatextraktes ohne alkalische Behandlung; die Aktivität ohne TPP beträgt weniger als 3% der Aktivität bei TPP-Sättigung.

Tabelle. Anreicherung von Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel

Der zur Verfolgung der Anreicherung benutzte Arylamintransacetylase-Test und die Definition der Einheiten sind bei „Methoden“ angegeben

Reinigungsstufe	spezifische Aktivität (Einheiten pro mg Protein)	Einheiten im Gesamtansatz	Ausbeute %
Phosphatextrakt ¹	0,07—0,09	172	100
Ammoniumsulfatfällung	0,25—0,35	104	60
Äthanol-fällung	0,8—1,3	34	20

¹ Der Wert für die Aktivität des Rohextraktes ist unsicher.

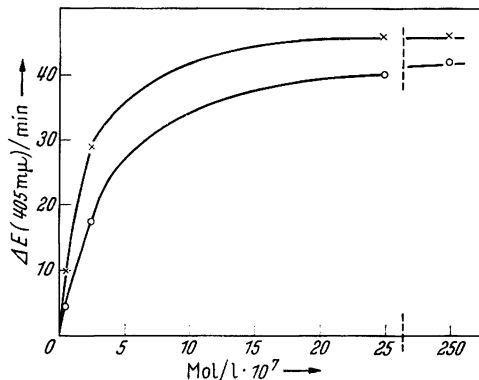


Abb.1. Reaktionsgeschwindigkeit von Apopyruvatoxydase mit verschiedenen Konzentrationen an TPP mit dem im Abschnitt „Methoden“ beschriebenen Pyruvatoxydasetest. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt nach Start durch Pyruvat-Zusatz bis zum Erreichen einer konstanten Endgeschwindigkeit zu (vgl. Abb.2). Die Ringe geben den Mittelwert der Reaktionsgeschwindigkeit vom Start mit Pyruvat bis zur Einstellung einer konstanten Reaktionsgeschwindigkeit wieder. Die Kreuze geben die konstante Endgeschwindigkeit wieder

In Abb.2 ist die Kinetik der Rekombination des Apoenzymsystems mit TPP wiedergegeben. Hierzu wurde im sonst kompletten Testsystem der Pyruvatumsatz durch Zusatz verschiedener TPP-Konzentrationen

gestartet. Die Rekombination findet nicht unmeßbar schnell statt, wie dies beispielsweise beim Start von Dehydrierungsreaktionen mit DPN oder von Kinasereaktionen mit ATP der Fall ist, sondern die Rekombination, d. h. das Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit,

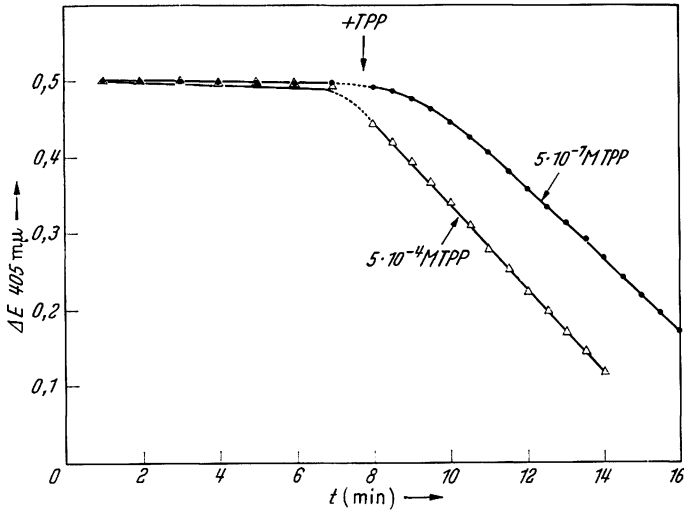


Abb. 2. Kinetik der Rekombination von Apopyruvatoxydase mit verschiedenen Konzentrationen TPP. Zusammensetzung des Pyruvatoxydase-Testsystems siehe bei „Methoden“

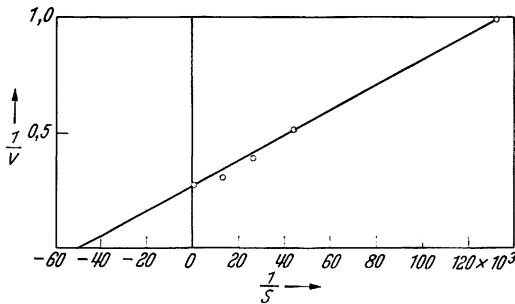


Abb. 3. Michaelis-Konstante der Pyruvatoxydase mit Pyruvat. Die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit V (Einheiten im Arylamtransacetylase-Test pro ml Enzym) und der Substratkonzentration S (Mole Pyruvat pro Liter) wurden nach LINEWEAVER und BURK¹⁴ aufgetragen. $T = 26^\circ\text{C}$. Spezifische Aktivität der Pyruvatoxydase (gereinigt bis einschließlich Äthanol-fällung) 0,90. Als Michaelis-Konstante ergibt sich $K_M = 2,1 \cdot 10^{-6}$ Mole/l

benötigt mehrere Minuten. Die Geschwindigkeit der Rekombination ist von der Konzentration an TPP abhängig. Eine ähnliche Rekombinationskinetik haben wir früher beim Zusatz von TPP zu gereinigter Apopyruvatdecarboxylase aus Bierhefe beobachtet.

Eine Auswertung der Abhängigkeit der Aktivität bei TPP-Sättigung von der Konzentration an Pyruvat nach LINEWEAVER u. BURK [14] ist

in Abb. 3 wiedergegeben. Als Michaeliskonstante für Pyruvat ergibt sich $2,1 \cdot 10^{-5}$ Mole pro Liter.

2. Papierchromatographische Isolierung von HETPP

Aus Ansätzen von gereinigter Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat läßt sich nach Abstoppen mit heißem Methanol, ebenso wie früher für Ansätze mit Pyruvatoxydase aus Hefemito-

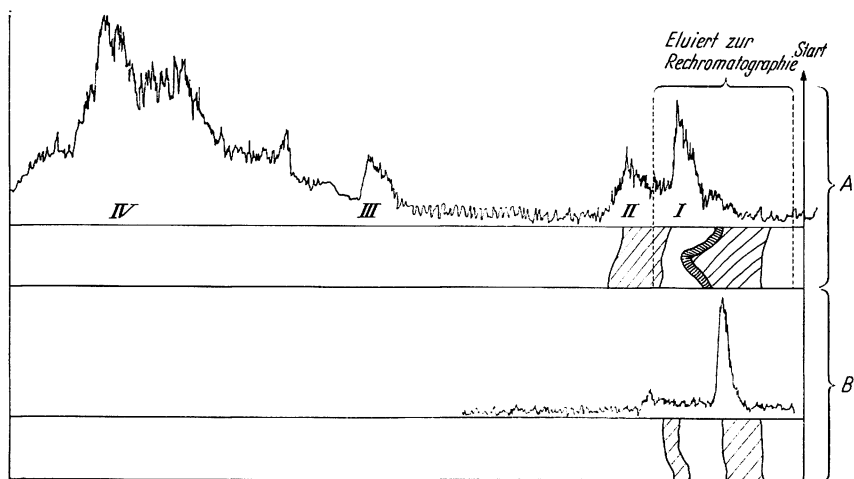


Abb. 4. Radiopapierchromatogramm (Teil A) und Rechromatogramm (Teil B) eines Ansatzes von Pyruvatoxydase mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat. Über den Chromatogrammen (die Schraffierung gibt die Intensität der UV-Absorption wieder) ist die im Radiopapierchromatographen FH 452 registrierte Radioaktivität eingetragen. Weitere Einzelheiten siehe unter „Methoden“ bei „Papierchromatographische Isolierung von HETPP“. Gipfel I ist HETPP, Gipfel II ist uneinheitlich und besteht zum Teil aus HETP (α -Hydroxyäthylmonophosphat) und eventuell HETPP sowie weiteren unbekanntem Substanzen. Durch Versuche mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat ist gesichert, daß Gipfel II kein HCETPP (siehe Legende Abb. 6) enthält. Gipfel III ist eine im $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat enthaltene Verunreinigung. Gipfel IV ist nicht umgesetztes $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat

chondrien beschrieben [10], ^{14}C -HETPP durch Ionenaustauschchromatographie isolieren (vgl. Abschnitt 5. dieses Kapitels). Für bestimmte Fragestellungen verwendeten wir jedoch die mühelosere papierchromatographische Auftrennung der Methanolextrakte unserer Ansätze mit anschließender Radiochromatographie, wie sie früher für die Isolierung von ^{14}C -HETPP aus Pyruvatdecarboxylase-Ansätzen beschrieben wurde [7, 8]. Ein Beispiel ist in Abb. 4 wiedergegeben. Bei derartigen Chromatogrammen von Ansätzen mit hohem Salzgehalt darf den R_F -Werten zur Identifizierung von Substanzen keine Bedeutung beigelegt werden. ^{14}C -HETPP wird jedoch leicht als Radioaktivitätsgipfel erkannt, der sich an der vorderen Front der TPP-Zone (lokalisiert durch UV-Fluoreszenzlöschung und Thiochrom-Sprühtest) befindet. Nach der Elution wird ^{14}C -HETPP endgültig durch Nachweis der Freisetzung von

^{14}C -Acetaldehyd bei der Inkubation mit Apopyruvatdecarboxylase identifiziert (vgl. [8, 16]). Bei den im Abschnitt 3 und 4 dieses Kapitels dargestellten Versuchen wurde die in Abb.4 wiedergegebene Papierchromatographie mit anschließender Rechromatographie und Auszählung der Radioaktivität des eluierten ^{14}C -HETPP als Routinemethode verwendet.

Ohne Erfolg versuchten wir aus Ansätzen von Pyruvatoxydase mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat in Phosphatpuffer vom pH 5,0 oder in Trishydroxymethylaminomethan-HCl-Puffer vom pH 7,4 die früher in Ansätzen von Pyruvatdecarboxylase mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat beschriebene [7, 8] Pyruvat-TPP-Verbindung („aktives Pyruvat“ = α -Hydroxy- α -carboxy-äthyl-TPP) zu isolieren¹. Auch in Ansätzen mit Pyruvatoxydase aus Hefemitochondrien und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat [10] konnten wir kein „aktives Pyruvat“ nachweisen.

3. Kinetik der Anhäufung von ^{14}C -HETPP bei der Inkubation von Pyruvatoxydase mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat

Mit der papierchromatographischen Methode (vgl. Abb.4) wurden Ansätze von Pyruvatoxydase mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat unter Variation der Inkubationsdauer aufgearbeitet. Man sieht aus Abb.5, daß die Ausbeute an HETPP bei mehrstündiger Inkubation laufend zunimmt. Völlig andere Verhältnisse hatten wir bei der Inkubation von gereinigter Pyruvatdecarboxylase aus Hefe mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat beobachtet [7, 8]. Bei diesen Versuchen wurden die Ansätze 7–10 sec nach Zusatz von Pyruvat abgestoppt und auf ^{14}C -HETPP aufgearbeitet; längere Inkubation führte zu keiner Vergrößerung der Ausbeute an ^{14}C -HETPP. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die ^{14}C -HETPP-Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge, bei Verwendung von Pyruvatoxydase und langer Inkubationszeit, um mehrere Zehnerpotenzen größer ist als bei unseren früheren Versuchen mit Pyruvatdecarboxylase. Eine Erklärung für diese Unterschiede sehen wir im folgenden: Bei der Inkubation von Pyruvatdecarboxylase mit Pyruvat läuft die sehr rasche Bilanz-Reaktion $\text{Pyruvat} \rightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{CO}_2$ ab, die nach wenigen Minuten beendet ist bzw. durch den angestauten Acetaldehyd gehemmt wird. Beim Abstoppen mit heißem Methanol wird die sehr kleine stationär im reagierenden System vorhandene Konzentration an

¹ Wir haben die Pyruvat-TPP-Verbindung früher [7, 8] als α -Lactyl-TPP bezeichnet. Dieser Name ist irreführend, da man eine Bindung über die Carboxylgruppe der Milchsäure vermutet. SHUSTER u. LYNEN verwenden deshalb die Bezeichnung α -Pyrophosphoryl-thiaminyl-lactat [17]. Wir schlagen in Anlehnung an die Bezeichnung des „aktiven Acetaldehyds“ als α -Hydroxy-äthyl-TPP [3, 13] für die Pyruvatverbindung die Bezeichnung α -Hydroxy- α -carboxy-äthyl-TPP mit der Abkürzung HCETPP vor.

^{14}C -HETPP fixiert. Bei den Versuchen mit Pyruvatoxydase kann dagegen keine komplette Reaktion ablaufen, da wir dem System weder DPN noch Coenzym A als Acceptoren für den Dehydrierungswasserstoff und den bei der oxydativen Decarboxylierung entstehenden Acetylrest zusetzen. Es kommt nach Zusatz von Pyruvat sehr schnell zu einer Überführung des vorhandenen TPP in HETPP, dessen Konzentration ebenso wie bei den Versuchen mit Pyruvatdecarboxylase sehr klein ist. Diese kleine ^{14}C -HETPP-Konzentration beobachten wir in den ersten Minuten nach Beginn der Inkubation (vgl. Abb. 5: Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate bei etwa $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mole HETPP pro Ansatz}$).

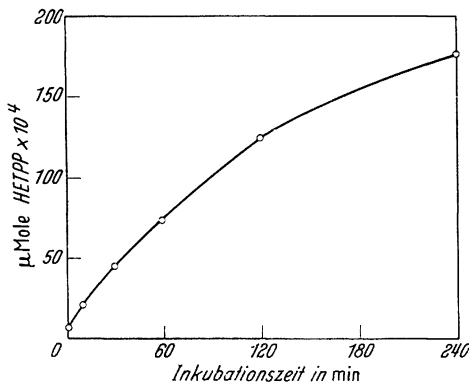


Abb. 5

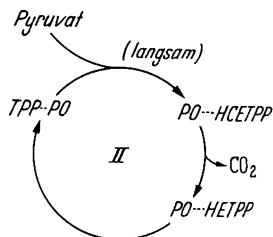
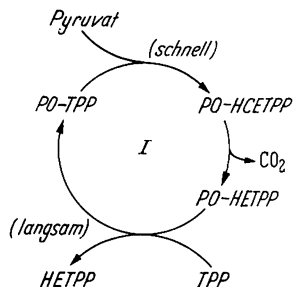


Abb. 6

Abb. 5. Kinetik der Anhäufung von ^{14}C -HETPP bei der Inkubation von Pyruvatoxydase mit 2- ^{14}C -Pyruvat bei $\text{pH } 7,4$. Die Zusammensetzung und Aufarbeitung der Ansätze durch Papierchromatographie und Rechromatographie, die Auszählung des eluierten HETPP auf Aluminiumschälchen und die Berechnung der molaren HETPP-Ausbeute sind im Abschnitt „Methoden“ unter „Papierchromatographische Isolierung von HETPP“ angegeben

Abb. 6. Zwei Möglichkeiten für den Mechanismus der „langsamen“ Anhäufung von HETPP mit Pyruvatoxydase (PO) und Pyruvat. PO-TPP = PO mit fest gebundenem, nicht dissoziierbarem TPP; PO...TPP = PO mit dissoziierbarem TPP; HCETPP = α -Hydroxy- α -carboxyäthyl-TTP („aktives Pyruvat“)

Daneben entsteht in einer relativ zur kompletten Pyruvatoxydase-Reaktion um etwa sechs Zehnerpotenzen langsameren Reaktion weiteres HETPP, das sich im Verlauf von Stunden anhäuft (vgl. Abb. 5). Limitierend für die langsame Anhäufung von HETPP ist nicht ein Zwischenschritt der Pyruvatoxydase-Reaktionsfolge, sondern ein außerhalb dieser Reaktionsfolge liegender 10^6 mal langsamerer Reaktionsschritt. Die Ausbeute an HETPP ist der eingesetzten Aktivität an Pyruvatoxydase proportional. Zum Beispiel erhielten wir mit 1,3 bzw. 2,6 Aktivitätseinheiten (Arylamintransacetylasetest) pro Ansatz nach 60 min Inkubation

$38 \cdot 10^{-4}$ bzw. $74 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mole}$ HETPP. Vergleicht man die Anhäufung von HETPP unter sonst gleichen Bedingungen mit und ohne Zusatz von TPP, so findet man nach 60 min Inkubation mit TPP eine etwa zehnfach höhere HETPP-Ausbeute. Da die Aktivität der in diesem Versuch verwendeten Pyruvatoxydase im Arylamintransacetylasetest nur um ca. 50% durch TPP-Zusatz zu erhöhen ist, zeigt dieses Ergebnis, daß der dissoziierbare Anteil des TPP entscheidend an der im Verlauf von Stunden erfolgenden Anhäufung von HETPP beteiligt ist. Ein weiteres Argument für die entscheidende Beteiligung von dissoziierbarem TPP an der HETPP-Anhäufung ergibt sich aus den Mengenverhältnissen HETPP:Pyruvatoxydase. Wir fanden 1 Mol HETPP pro 23000 g Pyruvatoxydase-Protein. Da das Molekulargewicht der Pyruvatoxydase mit 1—2 Millionen angegeben wird, müßten pro Mol Pyruvatoxydase 40—80 aktive HETPP-bildende Stellen vorhanden sein, um eine stöchiometrische HETPP-Bildung zu erklären. Da dieses äußerst unwahrscheinlich ist, schließen wir, daß dissoziierendes TPP eine wesentliche Rolle bei der HETPP-Anhäufung spielt.

Wir diskutieren auf Grund dieser Versuche für den Mechanismus der langsamen HETPP-Anhäufung die beiden in Abb. 6 dargestellten Möglichkeiten. Bei der unter I angeführten Möglichkeit besteht die „langsame“ HETPP anhäufende Reaktion in einer Übertragung des an fest gebundenem TPP angehängten Acetaldehydrestes auf dissoziierendes, nicht gebundenes TPP. Bei der Möglichkeit II erfolgt die „langsame“ HETPP-Anhäufung durch langsame Reaktion des dissoziierenden TPP am Coenzym-freien Anteil der Pyruvatoxydase. Experimente, die diese Frage klären sollen, sind geplant.

4. p_{H} -Abhängigkeit der HETPP-Anhäufung

Das p_{H} -Optimum der mit dem Arylamintransacetylasetest gemessenen Oxydation von Pyruvat zu Acetyl-CoA liegt bei 8,0. Bei diesem p_{H} findet nur eine geringe Anhäufung von HETPP bei der Inkubation ohne DPN und Coenzym A statt. Dagegen ist bei p_{H} 4,5—5 die HETPP-Anhäufung um ein vielfaches größer, obwohl in diesem p_{H} -Bereich keine Aktivität des kompletten Pyruvat-Oxydase-Systems mehr vorliegt (vgl. Abb. 7). Eine Erklärung hierfür sehen wir in der verschiedenen p_{H} -Abhängigkeit der geschwindigkeitsbegrenzenden Reaktionsschritte der beiden Reaktionsfolgen. Bei der HETPP-Anhäufung ist die Beladung des dissoziierenden TPP mit dem Aldehydrest nach einer der beiden in Abb. 6 dargestellten Möglichkeiten geschwindigkeitsbegrenzend. Das Optimum dieses Reaktionsschrittes dürfte bei p_{H} 4,5—5 liegen. Im Gegensatz dazu ist das p_{H} -Optimum des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der um sechs Zehnerpotenzen rascher erfolgenden Pyruvatoxydase-Reaktion im schwach alkalischen Bereich.

Bei pH 5 nimmt ebenso wie bei pH 7,4 die Ausbeute an HETPP annähernd proportional zur Inkubationszeit zu. Wir erhielten in einem Ansatz, der prinzipiell gleich, wie in Abb. 5 für die Inkubation bei pH 7,4 angegeben, zusammengesetzt war, nach 15 min Inkubationszeit 0,025 μ Mole und nach 60 min 0,074 μ Mole ^{14}C -HETPP. Die Steigerung der Ausbeute an HETPP durch Anwendung eines schwach sauren Milieus bei der Inkubation gestattet, bis 10% des eingesetzten ^{14}C -Pyruvats in ^{14}C -HETPP überzuführen. Beispielsweise wurden bei dem im unteren

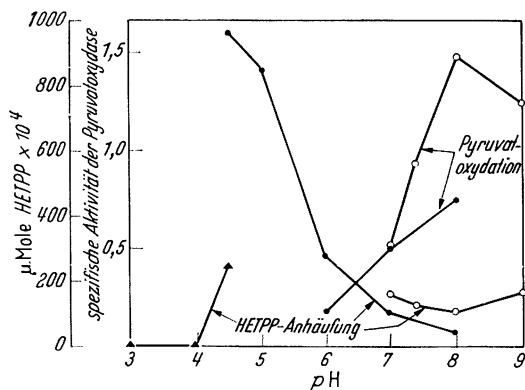


Abb. 7. Abhängigkeit der Pyruvatoxydase-Aktivität und der HETPP-Anhäufung vom pH . Für die Versuche wurden folgende Puffer verwendet: Citrat-HCl (\blacktriangle — \blacktriangle), Sörensen-Phosphat (\bullet — \bullet), Trishydroxymethylaminomethan-HCl (\circ — \circ). Die Endkonzentration der Puffer war in den Versuchen zur HETPP-Anhäufung 0,016 M und beim Pyruvatoxydase-Test mit Arylamintransacetylase 0,1 M. Der Pyruvatoxydase-Test mit Arylamintransacetylase und die Ansätze zur HETPP-Anhäufung mit Aufarbeitung durch Papierchromatographie und Ausbeute-Bestimmung durch Radioaktivitätsmessung sind im Abschnitt „Methoden“ beschrieben

Teil von Abb. 8 wiedergegebenen Versuch 18 μ Mole 2- ^{14}C -Pyruvat eingesetzt und 1,8 μ Mole ^{14}C -HETPP chromatographisch isoliert. Kontrollversuche mit dem kompletten System, jedoch ohne Pyruvatoxydase, ergaben keine ^{14}C -HETPP-Bildung. Nach 5 min Erhitzen einer Pyruvatoxydase-Lösung im 0,016 M Phosphatpuffer vom pH 5,0 auf 96°C erhielten wir noch 10%, nach 15 min Erhitzen noch etwa 1% der Ausbeute an HETPP, bezogen auf das nicht vorbehandelte Enzym.

5. Isolierung von HETPP durch Ionenaustausch-Chromatographie

Ionenaustausch-Chromatogramme (Einzelheiten siehe unter „Methoden“) je eines Ansatzes von Pyruvatoxydase mit 2- ^{14}C -Pyruvat bei pH 7,4 bzw. 5,0 sind in Abb. 8 wiedergegeben. Die papierchromatographische Untersuchung der verschiedenen UV-Gipfel des pH 7,4-Ansatzes ergab für I Thiamin und eventuell weitere unbekannte Substanzen, für II Thiamin-monophosphat, für III Thiamin-pyrophosphat,

für IV unbekannte Substanzen. Die entsprechenden Radioaktivitätsgipfel sind I = Hydroxyäthylthiamin (HET) und eventuell weitere unbekannte Substanzen, II = Hydroxyäthylthiaminmonophosphat

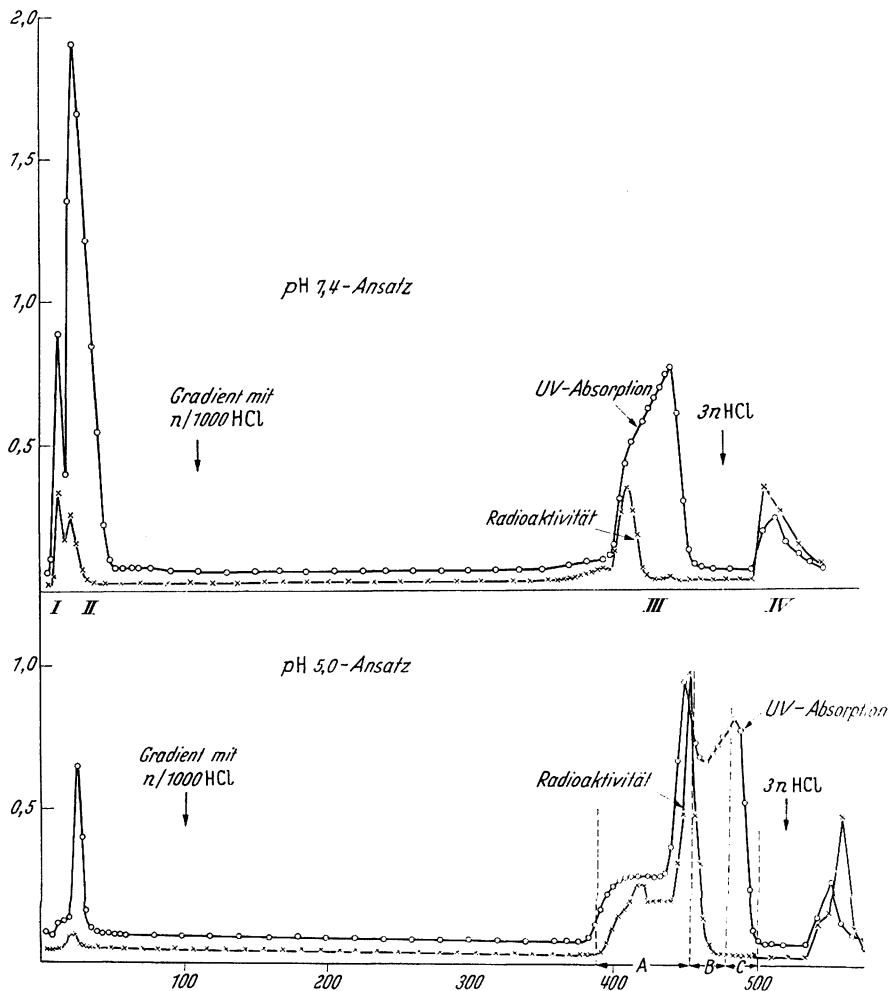


Abb. 8. Isolierung von HETPP mittels Ionenaustausch-Chromatographie aus Ansätzen von Pyruvat-oxydase mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat bei pH 7,4 (oberer Teil der Abbildung) bzw. pH 5,0 (unterer Teil der Abbildung). Auf der Abszisse sind die ml Eluat aufgetragen (es wurden Fraktionen von je 4 ml aufgefangen). Auf der Ordinate ist die Ultraviolettabsorption bei $272,5\text{ m}\mu$ und Schichtdicke 1 cm aufgetragen (Ringe), sowie die Radioaktivität von je 0,2 ml der Fraktionen in $\text{IpM} \cdot 10^{-4}$ (Kreuze). Inkubiert wurde, wie im Abschnitt „Methoden“ unter „Isolierung von HETPP durch Ionenaustausch-Chromatographie“ beschrieben

(HETP), III = HETPP, IV = Pyruvat und eventuell weitere unbekannte Substanzen. Die Radioaktivität des Pyruvats ist nur teilweise erfaßt, da

saurer Proben zur Zählung der Radioaktivität auf Schälchen eingetrocknet wurden und hierbei durch Zersetzung von Pyruvat starke Verluste auftraten. Während beim p_H 7,4-Ansatz HETPP nur als Schulter beim UV-Gipfel III auftritt, ist wegen der wesentlich größeren HETPP-Menge des p_H 5-Ansatzes der Ultraviolett-Gipfel III deutlich zweigeteilt. Fraktion A (vgl. Abb. 8 unten) enthält den Hauptteil des HETPP neben wenig TPP; Fraktion C enthält den Hauptteil des TPP neben Spuren HETPP. Die in den Gipfeln I und II enthaltenen dephosphorylierten TPP-Derivate entstanden wahrscheinlich durch chemisch Dephosphorylierung am Ionen-Austauscher. In der von uns verwendeten Pyruvat-oxydase konnten wir keine nennenswerte TPP-dephosphorylierende Aktivität nachweisen.

In den Fraktionen A, B und C des p_H 5-Ansatzes wurden Analysen des Gehaltes an HETPP neben TPP durchgeführt. Hierzu wurde die Summe TPP + HETPP durch Messung der Extinktion bei $272,5\text{ m}\mu$ (molarer Extinktionskoeffizient für TPP = $7,0 \cdot 10^6$) und durch den Thiochromtest (2) bestimmt (im Thiochromtest reagiert HETPP ebenso wie TPP). Beide Methoden ergaben für die Summe TPP + HETPP auf $\pm 10\%$ übereinstimmende Werte. ^{14}C -HETPP wurde durch Auszählung der Radioaktivität und Vergleich mit der bekannten spezifischen Aktivität des eingesetzten 2- ^{14}C -Pyruvats ermittelt. Für Fraktion A ergaben sich 55% , für Fraktion B 34% und für Fraktion C weniger als 1% HETPP, bezogen auf die Summe HETPP + TPP = 100% . Da TPP den enzymatischen Umsatz von HETPP konkurrierend hemmt, ist die weitgehende Befreiung des HETPP von TPP Voraussetzung für optimalen enzymatischen Umsatz. Dies konnten wir bei der enzymatischen Freisetzung von Acetaldehyd aus der vorstehend beschriebenen Fraktion A mit und ohne Zusatz von TPP zeigen [16].

Zusammenfassung

1. Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel wurde 10–15fach angereichert. Die Michaeliskonstante mit Pyruvat ist $2,1 \cdot 10^{-5}$ Mole/l, mit TPP $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mole/l.

2. Bei der Inkubation von gereinigter Pyruvatoxydase mit Pyruvat und TPP (ohne Zusatz von CoA und DPN) häuft sich α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat (HETPP = „aktiver Acetaldehyd“) an. Die p_H -Abhängigkeit dieser Reaktion, bei der bis 10% des eingesetzten Pyruvats in HETPP überführt werden konnten, wird beschrieben. Der Mechanismus der Reaktion wird diskutiert.

3. Die Reinigung von HETPP aus Pyruvatoxydase-Ansätzen mit Papierchromatographie und Ionenaustauschchromatographie wird angegeben.

Summary

1. Pyruvate oxidase from pig heart muscle has been purified 10 to 15-fold. The Michaelis constants are $2.1 \cdot 10^{-5}$ moles per liter for pyruvate and $2.5 \cdot 10^{-7}$ moles per liter for TPP.

2. On incubation of purified pyruvate oxidase with pyruvate and TPP (without the addition of CoA and DPN) α -hydroxyethyl-2-thiamine pyrophosphate (HETPP = "active acetaldehyde") accumulates. The p_H dependency of this reaction is described. Up to 10 per cent of the pyruvate incubated could be transformed into HETPP. The reaction mechanism is discussed.

3. The purification of HETPP from pyruvate oxidase experiments by means of paper chromatography and ion exchange chromatography is described.

Fräulein SILKE SCHNEIDER danken wir für sorgfältige Mitarbeit. Dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen.

Literatur

- [1] BEISENHERZ, G., H.-J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-AHRENDT u. G. PFLEIDERER: Z. Naturforsch. S b, 555 (1953).
- [2] BESSEY, O. A., O. H. LOWRY and E. B. DAVIS: J. biol. Chem. **195**, 453 (1952).
- [3] BRESLOW, R.: J. Amer. chem. Soc. **80**, 3719 (1958).
- [4] CARLSON, G. L., and G. M. BROWN: J. biol. Chem. **235**, PC 3 (1960).
- [5] DAWSON, J., R. P. HULLIN and M. WALKER: Biochem. J. **67**, 456 (1957).
- [6] HOLZER, H.: V. Intern. Biochemiekongreß Moskau, Abstracts of Papers, 1961.
- [7] HOLZER, H., u. K. BEAUCAMP: Angew. Chem. **71**, 776 (1959).
- [8] HOLZER, H., u. K. BEAUCAMP: Biochim. biophys. Acta **46**, 225 (1961).
- [9] HOLZER, H., u. H. W. GOEDDE: Biochem. Z. **329**, 192 (1957).
- [10] HOLZER, H., H. W. GOEDDE, K.-H. GÖGGEL u. B. ULRICH: Biochem. biophys. Res. Comm. **3**, 599 (1960).
- [11] HOLZER, H., u. G. KOHLHAW: Unveröffentlichte Versuche.
- [12] KORKES, S., A. DEL CAMPILLO and S. OCHOA: J. biol. Chem. **195**, 541 (1952).
- [13] KRAMPITZ, L. O., G. GREULL, CH. S. MILLER, J. B. BICKING, H. R. SKEGGS and J. M. SPRAGUE: J. Amer. chem. Soc. **80**, 5893 (1958).
- [14] LINEWEAVER, H., u. D. BURK: J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).
- [15] LYNEN, F., K. DECKER, O. WIELAND u. D. REINWEIN: In: Biochemical Problems of Lipids, Butterworths Scientific Publications, S. 142. London 1955.
- [16] SCRIBA, P., S. SCHNEIDER u. H. HOLZER: Biochim. biophys. Acta (im Druck).
- [17] SHUSTER, C. W., u. F. LYNEN: Biochem. biophys. Res. Comm. **3**, 350 (1960).
- [18] TABOR, H., A. H. MEHLER and E. R. STADTMAN: J. biol. Chem. **204**, 127 (1953).
- [19] WESTERFELD, W. W.: J. biol. Chem. **161**, 495 (1945).

Professor Dr. H. HOLZER,
 Physiologisch-chemisches Institut der Universität
 Freiburg i. Br., Hermann Herder-Straße 7