

MECHANISMUS DER ENZYMATISCHEN FREISETZUNG VON
ACETALDEHYD AUS "AKTIVEM ACETALDEHYD"
(α -HYDROXYÄTHYL-2-THIAMINPYROPHOSPHAT)

P. SCRIBA, S. SCHNEIDER UND H. HOLZER

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg
im Breisgau (Deutschland)*

(Eingegangen am 20 März 1961)

SUMMARY

*The mechanism of the enzymic production of acetaldehyde from "active acetaldehyde"
(α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate)*

1. The enzymic formation of acetaldehyde from α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate with purified apopyruvate decarboxylase from yeast is inhibited by thiamine pyrophosphate. This inhibition explains (at least partly) the slow enzymic production of acetaldehyde from α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate preparations containing a considerable amount of thiamine pyrophosphate.

2. The enzymic formation of acetaldehyde from α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate with apocarboxylase does not take place in form of an exchange reaction with pyruvate, as discussed earlier, but in form of the direct reaction:
 α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate \rightarrow acetaldehyde + thiamine pyrophosphate.

EINLEITUNG

1958 konnten BRESLOW¹ und KRAMPITZ *et al.*² auf Grund von chemischen und enzymatischen Modellversuchen am C₂ des Thiazolteiles mit dem Hydroxyäthylrest substituiertes TPP (HETPP = "aktiver Acetaldehyd") als Zwischenprodukt der TPP-abhängigen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd wahrscheinlich machen. 1959 beschrieben wir³ (vgl. auch ref. 4) die Isolierung sowie die chemische und enzymatische Charakterisierung von HETPP aus Ansätzen von gereinigter Bierhefe-Pyruvatdecarboxylase mit Pyruvat. 1960 berichteten CARLSON UND BROWN⁵ in einer vorläufigen Mitteilung über den Nachweis von HETPP in Hefe und Ansätzen von Pyruvatdecarboxylase aus Weizenkeimlingen mit Pyruvat. Vor kurzem teilten wir^{6,7} die Isolierung von HETPP aus Pyruvatoxydase-Ansätzen und die Identifizierung dieser Substanz mit dem früher als Zwischenprodukt der anaeroben Pyruvat-Decarboxylierung erhaltenen HETPP mit. Wir konnten weiter zeigen, dass HETPP bei der Inkubation mit Pyruvatoxydase aus Hefemitochondrien den Acetylrest von Acetyl-Coenzym A liefert⁸.

Abkürzungen: TPP = Thiaminpyrophosphat; HETPP = α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat.

In der vorliegenden Arbeit studieren wir die Kinetik und den Mechanismus der Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP mit Apopyruvatdecarboxylase aus Hefe. Wir können zeigen, dass TPP die Freisetzung von Acetaldehyd aus HETPP stark hemmt (vermutlich durch Konkurrenz um die Wirkungsstelle am Enzymprotein). Weiter zeigen wir, dass Zusatz von Pyruvat zur Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP nicht, wie früher diskutiert^{3,4}, auf Grund einer Austauschreaktion notwendig ist, sondern um Träger-Acetaldehyd zu liefern. Dieser ermöglicht die Erfassung des enzymatisch freigesetzten radioaktiven Acetaldehyds als Dinitrophenylhydrazon.

METHODEN UND PRÄPARATE

HETPP

[^{14}C] α -Hydroxyäthyl-2-thiaminpyrophosphat wurde aus Ansätzen von [$2\text{-}^{14}\text{C}$]Pyruvat und TPP mit Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel mittels Papierchromatographie bzw. Ionenaustauschchromatographie isoliert⁷.

Apocarboxylase

Von gereinigter Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe^{4,9} wurde, wie früher beschrieben^{4,10} durch Alkalibehandlung TPP abgespalten.

Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP mit Apocarboxylase

Unter teilweiser Abänderung der früher beschriebenen Methode^{3,4} inkubierten wir im Hauptraum von Warburg-Gefäßen mit 2 Birnen (Gesamtvolumen 1.5 ml) 0.01 μMole durch Ionenaustauschchromatographie gereinigtes [$2\text{-}^{14}\text{C}$]HETPP, welches noch etwa 45% TPP enthielt (vgl. ref. 7) in 0.11 *M* Na-Citrat Puffer pH 6.35 mit $0.33 \cdot 10^{-3}$ *M* Trilon (Aethylendiamintetraacetat) und 0.001 *M* MgSO_4 .

Die Temperatur war 25°. Die Reaktion wurde durch Hinzukippen der in der ersten Birne befindlichen Apocarboxylase (6–8 mg) gestartet. Nach 20 min Inkubation für die Rekombination von HETPP bzw. TPP und Mg^{2+} mit der Apocarboxylase gaben wir aus der zweiten Birne 5 μMole Pyruvat bzw. Acetaldehyd hinzu. Der Ansatz wurde, falls nicht anders angegeben, weitere 12 Stunden langsam geschüttelt. Im Einsatz des Warburg-Gefäßes befanden sich 25 μMole 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0.5 ml 2 *N* HCl, die vollständig in fächerförmig gefaltetes Filterpapier¹¹ aufgesogen waren. Nach der Inkubation entnahmen wir die Filterpapiere dem Einsatz und extrahierten die getrockneten Papiere mit heissem Aethylacetat. Vom Extrakt wurden Proben auf Aluminiumschälchen getrocknet und im Handprobenwechsler FH 411 mit dem Methandurchflusszählrohr FH 407 (Frieske u. Hoepfner, Erlangen) gezählt. Alle Imp./min-Angaben der vorliegenden Arbeit wurden in dieser Anordnung gemessen. Es kommen hierbei etwa 60% der wahren Impulse zur Zählung. Die Chromatographie des [$2\text{-}^{14}\text{C}$]Acetaldehyd-dinitrophenylhydrazons auf mit Dimethylformamid imprägniertem Papier (Schleicher und Schüll 2043b Mgl) mit Cyclohexan¹² ergab den gleichen R_F -Wert wie authentisches Acetaldehyd-dinitrophenylhydrazon. Die Messung des eingesetzten [^{14}C]Pyruvats, bzw. [^{14}C]HETPP, sowie der im Hauptraum nach der Inkubation verbliebenen Radioaktivität erfolgte nach Auftragen auf Aluminiumschälchen wie vorstehend angegeben. Ein Kontrollversuch zeigte, dass ohne Apocarboxylase in einem sonst vollständigen Ansatz kein [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP freigesetzt wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Tabelle I sind Daten zur Kinetik der Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP zusammengestellt. Man sieht, dass in den ersten 2 Stunden die Acetaldehyd-Freisetzung (gemessen an der Radioaktivität im Einsatz mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin) etwa proportional zur Zeit erfolgt, während in den anschliessenden 10 Stunden nur noch eine Verdoppelung der Ausbeute zu erzielen ist. Da im Verlauf der Inkubation eine Trübung durch denaturiertes Eiweiss sichtbar wird, dürfte dies auf Inaktivierung der Apocarboxylase zurückzuführen sein. Der Hauptteil der eingesetzten Radioaktivität findet sich nach Versuchsende im Hauptraum der Warburg-Gefässe wieder. Früheren Versuchen zufolge⁴ handelt es sich hierbei um unverändertes HETPP, das nach erneutem Einsatz in obige Versuchsanordnung dieselbe prozentuale

TABELLE I

ABHÄNGIGKEIT DER FREISETZUNG VON ACETALDEHYD AUS HETPP MIT
APOCARBOXYLASE VON DER INKUBATIONSZEIT

Ansätze und Bestimmung des [^{14}C]Acetaldehyds siehe METHODEN UND PRÄPARATE. Nach 20 min Inkubation für die Rekombination von HETPP, Mg^{2+} und Apocarboxylase wurden aus der zweiten Birne des Warburg-Gefässes 5 μMole Acetaldehyd hinzugegeben.

Inkubationszeit (Stunden):	1	2	12
Imp./min des eingesetzten HETPP	30 700	30 700	30 700
Imp./min des als Dinitrophenylhydrazon im Einsatz abgefangenen Acetaldehyds	1 390	3 280	6 980
Ausbeute an freigesetztem [^{14}C]Acetaldehyd	4.5 %	11 %	23 %
Im Hauptraum wiedergefundene Imp./min	21 130	17 790	12 700
Insgesamt wiedergefundene Imp./min	22 520	21 060	19 660

Ausbeute an freiem [^{14}C]Acetaldehyd liefert wie beim ersten Versuch. Die Bestimmung von [^{14}C]Acetoin im Inhalt des Hauptraumes nach HAPOLD UND SPENCER¹³ (siehe auch ref. 4, 14) ergab Werte von weniger als 1% der insgesamt vorhandenen ^{14}C -Aktivität.

Die Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP erfolgt diesen Versuchen zufolge wesentlich langsamer als die durch das gleiche Enzympräparat unter denselben Bedingungen mögliche Überführung von Pyruvat in freien Acetaldehyd. Einen Grund hierfür sehen wir in der Hemmung des HETPP-Umsatzes durch das in unseren Präparaten in beträchtlichem Prozentsatz enthaltene TPP. Belegversuche für eine derartige Konkurrenzhemmung sind in Tabelle II zusammengestellt. Welchen Anteil die TPP-Hemmung am Zustandekommen des langsamen Umsatzes von HETPP hat, wird erst zu entscheiden sein, wenn reines HETPP für quantitative Versuche zur Verfügung steht. Als weitere Ursache für den langsamen Umsatz von HETPP muss die geringe Konzentration des HETPP in unseren Versuchen berücksichtigt werden. Bei dem in Tabelle I niedergelegten Versuch lagen etwa $7 \cdot 10^{-6}$ Mole HETPP/l vor. Die Michaeliskonstante⁴ der Apopyruvatdecarboxylase mit TPP beträgt $2 \cdot 10^{-5}$ Mole/l. Sollte die Michaeliskonstante von HETPP gleich gross sein, so wären unter unseren Bedingungen mit HETPP 15–20% der Reaktionsgeschwindigkeit bei TPP-Sättigung zu erwarten. Quantitative Aussagen zu diesem Problem werden erst möglich sein, wenn die Michaeliskonstante von HETPP bekannt ist.

Ein geschwindigkeitsbegrenzendes langsames Übertreten des im Hauptraum freigesetzten [^{14}C]Acetaldehyd in die Dinitrophenylhydrazin-Lösung des Einsatzes konnte durch Kontrollversuche mit KOHLHAW¹⁴ ausgeschlossen werden. Diese Versuche zeigten, dass in genau derselben Anordnung, wie sie bei den Versuchen von Tabellen I, II und III verwendet wurde, 0,001 μMol [^{14}C]Acetaldehyd (dies entspricht der bei den Versuchen in Tabelle I nach 2 Stunden im Einsatz gefundenen Menge [^{14}C]Acetaldehyd) bei Zugabe von 5 μMol Träger-Acetaldehyd bereits nach 1 Stunde aus dem Hauptraum quantitativ in das mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin getränkte Filterpapier des Einsatzes übergetreten waren. Ein Kontrollversuch ohne Zugabe von Träger-Acetaldehyd zeigte wie zu erwarten, dass nach 4 Stunden weniger als 10 % der eingesetzten 0,001 μMol [^{14}C]Acetaldehyd im Einsatz mit Dinitrophenylhydrazin zu finden waren.

TABELLE II

HEMMUNG DER ENZYMATISCHEN FREISETZUNG VON ACETALDEHYD AUS HETPP
DURCH ZUSATZ VON TPP

Ansätze und Bestimmung des [^{14}C]Acetaldehyds siehe METHODEN UND PRÄPARATE. Nach 20 min Inkubation für die Rekombination von HETPP, Mg^{2+} und Apocarboxylase wurden aus der zweiten Birne des Warburg-Gefäßes 5 μMole Acetaldehyd hinzugegeben.

Eingesetzte μMole [^{14}C]HETPP*	0,01	0,01
Eingesetzte Imp./min	30 700	30 700
Zugesetzte μMole TPP	—	1,0
HETPP-Gehalt in % der Summe HETPP + TPP*	55 %	1 %
Imp./min des als Dinitrophenylhydrazon im Einsatz abgefangenen Acetaldehyds	6 980	1 230
Ausbeute an freigesetztem [^{14}C]Acetaldehyd	23 %	4 %
Im Hauptraum wiedergefundene Imp./min	12 700	21 900
Insgesamt wiedergefundene Imp./min	19 680	23 130

* Ein Vergleich des im eingesetzten HETPP-Präparat durch Thiochromtest bzw. Ultraviolette-Absorptionsmessung bestimmten TPP + HETPP mit dem durch Radioaktivitätsmessung bestimmten HETPP ergab 55 % HETPP neben 45 % TPP.

Aus Tabelle II sieht man, dass zugesetztes TPP die Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP stark hemmt. Bei diesem Versuch wurde das reinste, uns zur Zeit zur Verfügung stehende HETPP-Präparat eingesetzt. Es war durch Ionenaustauschchromatographie und Papierchromatographie aus Ansätzen von Pyruvatoxydase mit [^{14}C]Pyruvat und TPP gereinigt worden und enthielt 55 % HETPP neben 45 % TPP. Erhöht man den Gehalt an TPP von 45 % auf 99 %, so wird unter sonst gleichen Bedingungen die Ausbeute an freigesetztem Acetaldehyd von 23 % auf 4 % erniedrigt (vgl. Tabelle II). Man kann nun verstehen, weshalb wir in früheren Versuchen, bei denen HETPP-Präparate mit mehr als 95 % TPP verwendet wurden, nur sehr geringe Ausbeuten bei der enzymatischen Freisetzung von Acetaldehyd und bei der enzymatischen Bildung von Acetoin aus HETPP und Acetaldehyd erhielten. Quantitative Versuche über die Konkurrenzhemmung sollen durchgeführt werden, wenn uns reines HETPP und eine einfachere Testmethode für die Freisetzung von Acetaldehyd zur Verfügung stehen.

In einer früheren Arbeit⁴ hatten wir gezeigt, dass man bei der Inkubation von [^{14}C]HETPP mit Apopyruvatdecarboxylase und Mg^{2+} im Hauptraum von Warburg-

Gefäßen nur dann [^{14}C]Acetaldehyd im Dinitrophenylhydrazin-Einsatz nachweisen kann, wenn den Ansätzen Pyruvat zugesetzt wird. Als Ursache für die Notwendigkeit des Pyruvat-Zusatzes hatten wir eine Austauschreaktion nach folgender Gleichung diskutiert:

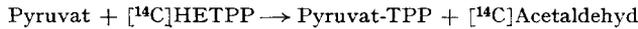


Tabelle III bestätigt unsere früheren Versuche, wonach die Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP nach Zusatz von Pyruvat wesentlich erhöht ist (vgl. die Kolonnen I und III). Wie die Kolonnen IV und VI zeigen, gilt dies jedoch nicht nur für die Freisetzung von [^{14}C]Acetaldehyd aus [^{14}C]HETPP, sondern auch aus [^{14}C]Pyruvat. Es kann sich demnach nicht um die früher diskutierte Austauschreaktion handeln, sondern, wie die in den Kolonnen II und V wiedergegebenen Versuche zeigen, ist lediglich die Anwesenheit von Träger-Acetaldehyd notwendig, um die geringen Mengen freigesetzten radioaktiven Acetaldehyds im Einsatz als Dinitrophenylhydrazon nachweisbar zu machen. Der Zusatz von inaktivem Pyruvat bewirkt ebenso wie der Zusatz von Acetaldehyd eine hohe Ausbeute an [^{14}C]Acetaldehyd im Einsatz,

TABELLE III

AUSBEUTE BEI DER ENZYMATISCHEN FREISETZUNG VON ACETALDEHYD MIT UND OHNE ZUSATZ VON TRÄGER-ACETALDEHYD BZW. PYRUVAT

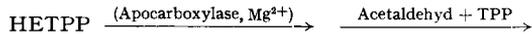
Ansätze und Bestimmung von [^{14}C]Acetaldehyd siehe METHODEN UND PRÄPARATE. Die manometrische Verfolgung der CO_2 -Entwicklung in den 5 μMole Pyruvat enthaltenden Gefäßen ergab dass nach 20 min (I), bzw. 5 min (IV) 4.5 μMole CO_2 gebildet waren.

Warburggefäß Nr.	I	II	III	IV	V	VI
Eingesetzte μMole [^{14}C]HETPP	0.01	0.01	0.01	—	—	—
Eingesetzte μMole [^{14}C]Pyruvat	—	—	—	0.01*	0.01*	0.01*
Eingesetzte Imp./min	30 700	30 700	30 700	30 000	30 000	30 000
Zusatz von 5 μMol Träger-Pyruvat	+	—	—	+	—	—
Zusatz von 5 μMol Träger-Acetaldehyd	—	+	—	—	+	—
Imp./min des als Dinitrophenylhydrazon im Einsatz abgefangenen Acetaldehyds	7 530	6 980	1 780	22 020	19 530	4 000
Ausbeute an freigesetztem [^{14}C]Acetaldehyd	25 %	23 %	5.8 %	73 %	65 %	13 %
Im Hauptraum wiedergefundene Imp./min	9 960	12 690	12 240	730	630	1 020
Insgesamt wiedergefundene Imp./min	17 490	19 670	14 020	22 750	20 160	5 020

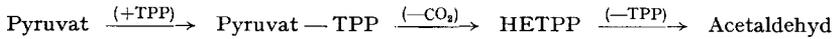
* Im Hauptraum zusätzlich 0.1 μMol TPP.

da Pyruvat an dem zugesetzten bzw. als Verunreinigung im [^{14}C]HETPP enthaltenen TPP zu Acetaldehyd decarboxyliert wird, der als Träger-Acetaldehyd dient. Tatsächlich beobachtet man an den Manometern der Warburg-Gefäße bereits 5 min nach Zusatz des Pyruvats bei dem in Kolonne IV wiedergegebenen Versuch mit viel TPP eine 99%ige Decarboxylierung des zugesetzten Pyruvats, und im Versuch mit HETPP, das etwa 50 % TPP enthielt (Kolonne I) waren nach etwa 20 min 90 % des Pyruvats zu Acetaldehyd decarboxyliert. Wir müssen demnach auf Grund der in Tabelle III wiedergegebenen Versuche unseren früher zur Diskussion gestellten Vorschlag einer

Austauschreaktion zurückziehen und formulieren die Freisetzung von Acetaldehyd jetzt folgendermassen:



Für die Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Hefe ergibt sich damit zusammen mit unseren früheren Befunden^{3,4} folgende Sequenz:



Die vorliegende Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesministeriums für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Freisetzung von Acetaldehyd aus "Aktivem Acetaldehyd" mit gereinigter Apopyruvatdecarboxylase aus Bierhefe wird durch Thiaminpyrophosphat gehemmt. Diese Konkurrenzhemmung erklärt (zumindest teilweise) die langsame Freisetzung von Acetaldehyd beim enzymatischen Umsatz von Präparaten, die viel Thiaminpyrophosphat enthalten.

2. Die Freisetzung von Acetaldehyd aus "Aktivem Acetaldehyd" mit Apocarboxylase erfolgt nicht in einer früher von uns^{3,4} diskutierten Austauschreaktion mit Pyruvat, sondern in einer direkten Reaktion: Aktiver Acetaldehyd \rightarrow Acetaldehyd + TPP.

LITERATUR

- ¹ R. BRESLOW, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 3719.
- ² L. O. KRAMPITZ, G. GREULL, C. S. MILLER, J. B. BICKING, H. R. SKEGGS UND J. M. SPRAGUE, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 5893.
- ³ H. HOLZER UND K. BEAUCAMP, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 776.
- ⁴ H. HOLZER UND K. BEAUCAMP, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1961) 225.
- ⁵ G. L. CARLSON AND G. M. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) PC 3.
- ⁶ H. HOLZER, H. W. GOEDDE, K.-H. GÖGGEL UND B. ULRICH, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 3 (1960) 599.
- ⁷ P. SCRIBA UND H. HOLZER, *Biochem. Z.*, im Druck.
- ⁸ H. W. GOEDDE, H. INOUE UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 41.
- ⁹ H. HOLZER, G. SCHULTZ, C. VILLAR-PALASI UND J. JÜNTGEN-SELL, *Biochem. Z.*, 327 (1956) 331.
- ¹⁰ E. HOLZER, H. D. SÖLING, H. W. GOEDDE UND H. HOLZER, in BERGMAYER, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie Weinheim (Bergstrasse), im Druck.
- ¹¹ A. B. PARDEE, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 1085.
- ¹² L. HORNER UND W. KIRMSE, *Ann. Chem.*, 597 (1955) 48.
- ¹³ F. C. HAPPOLD UND C. P. SPENCER, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 18.
- ¹⁴ G. KOHLHAW, unveröffentlichte Versuche.