

**Nachweis und Charakterisierung
von Zwischenprodukten der Decarboxylierung
und Oxydation von Pyruvat:
„aktiviertes Pyruvat“ und „aktivierter Acetaldehyd“**

Von Prof. Dr. H. HOLZER und Dr. K. BEAUCAMP
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg/Brsg.

Inkubiert man ^{14}C -markierte BTS* mit gereinigter Pyruvat-Decarboxylase aus Bierhefe¹⁾, stoppt die Reaktion nach wenigen Sekunden durch Zusatz von heißem Methanol und chromatographiert nach Abtrennung des denaturierten Proteins den eingegangenen Extrakt mit Butanol-Eisessig- H_2O (50:20:30) auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 b ragt, so zeigt die ^{14}C -Aktivität (Radiopapierchromatograph FH 452) 4 Maxima (I, II schwach, III mittelstark, IV sehr stark; Zählung vom Startpunkt aus). Die Fluoreszenzlösung im UV lässt zwei Maxima erkennen, die mit den Aktivitätsmaxima I ($R_{\text{BTS}} = 0,1$) und II ($R_{\text{BTS}} = 0,2$) zusammenfallen. Die Hauptmenge der Radioaktivität ist auf Grund vergleichender Chromatogramme freier BTS zuzuordnen (Gipfel IV), das langsamer wandernde Aktivitätsmaximum III ($R_{\text{BTS}} = 0,8$) haben wir bisher nicht näher untersucht. Freier AcA verflüchtigt sich unter den Bedingungen der Chromatographie vollständig, wie Kontrollversuche mit ^{14}C -AcA ergaben. Die Aktivitätsgipfel I und II weisen einen ähnlichen R_f -Wert wie TPP auf. Bei den für diese Gipfel verantwortlichen Verbindungen handelt es sich um eine AcA-TPP-Verbindung („aktivierter AcA“, Gipfel I) und um eine BTS-TPP-Verbindung („aktivierter BTS“, Gipfel II). Wir können dies durch folgende Beobachtungen belegen:

1. Nach der Elution von I und II wandern beide Fraktionen bei der Rechromatographie mit Butanol-Eisessig- H_2O , sowie mit Isopropanol-HCl- H_2O^2) einheitlich.

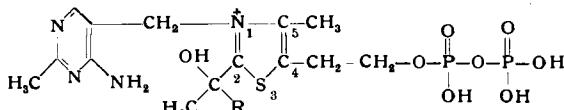
2. Bei Einsatz von C_1 -markiertem Pyruvat tritt nur der Radioaktivitätsgipfel II auf, während bei Einsatz von C_2 -markiertem Pyruvat die Gipfel I und II radioaktiv sind.

3. Eluiert man Fleck I und inkubiert mit TPP-freier Apo-Carboxylase und inaktivem Pyruvat, so wird radioaktiver AcA freigesetzt, der als Dinitrophenylhydrazone abgefangen und durch Chromatographie identifiziert wird. In Kontrollversuchen ohne Pyruvat bzw. ohne Apo-Carboxylase findet geringe bzw. keine Freisetzung von ^{14}C -AcA statt.

4. Eluiert man Fleck II, der durch Chromatographie eines Ansatzes von Carboxylase mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat gewonnen wurde, so findet man mit Apo-Carboxylase, wie unter 3. beschrieben, ^{14}C -AcA. Eluiert man Fleck II aus einem Ansatz mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat, so findet man nach Inkubation mit Apo-Carboxylase keinen ^{14}C -AcA, jedoch wird jetzt $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt, das in NaOH aufgefangen und durch Übertragen in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ identifiziert werden kann. Wenn ein Ansatz aus Carboxylase und $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat aufgearbeitet wird, lässt sich aus Fleck II kein $^{14}\text{CO}_2$ freisetzen. Ebenso wenig kann in einem Ansatz mit $1.2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat nach Elution von Fleck I und Inkubation des Eluats mit Apocarboxylase $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden.

Die unter 3. und 4. aufgeführten Befunde sprechen für Freisetzung von AcA aus AcA-TPP durch Austauschreaktion mit BTS, da so die Beschleunigung der Freisetzung von ^{14}C -AcA aus ^{14}C -AcA-TPP durch Pyruvat-Zusatz verständlich wird.

5. Nach Elution von I, Gefrier-trocknung des Eluats und Sulfat-Spaltung³⁾ des Rückstandes findet man bei der Papierchromatographie der Reaktionsmischung mit Butanol-Eisessig- H_2O (50:20:30) neben dem weiter wandernden Pyrimidin-Teil einen Fleck, der Fluoreszenzlösung im UV zeigt, positive Phosphatreaktion gibt und die gesamte auf das Chromatogramm gebrachte Radioaktivität enthält. Diesem Fleck ist nach vergleichender Chromatographie der Thiazol-Teil des TPP zuzuordnen. Behandelt man diesen Thiazol-Teil, in dem nach Breslow⁴⁾ und Krampitz⁵⁾ an C_2 die Struktur eines Thiomilchsäure-imids vorliegen sollte, mit Jodwasserstoffsäure, so erhält man (wenn auch in schlechter Ausbeute) radioaktiv markierte Propionsäure, die wir chromatographisch identifizierten⁶⁾. Nach diesen Befunden sind dem „aktivierten Acetaldehyd“ und der „aktivierten Brenztraubensäure“ folgende Strukturen zuzuschreiben:



$\text{R} = \text{H}$: aktivierter AcA (α -Hydroxyäthyl-2-TPP)

$\text{R} = \text{COOH}$: aktivierte BTS (α -Lactyl-2-TPP)

Verantwortlich für den wissenschaftl. Inhalt: Dipl.-Chem. Fr. Boschke, (17a) Heidelberg; für den Anzeigenteil: W. Thiel, Verlag Chemie GmbH, (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage), Weinheim/Bergstr., Pappelallee 3 · Fernsprecher 3635 · Fernschreiber 0465516 chemieverl wnh; Telegramm-Adresse: Chemieverlag Weinheimbergstr. — Druck: Druckerei Winter, Heidelberg

Auch bei der Chromatographie von Ansätzen mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -BTS und Pyruvatoxydase aus Bäckerhefemitochondrien⁶⁾ bzw. Schweinerherzmuskel⁷⁾ erhält man den Radioaktivitätsgipfel I^{8,9)}. Da mit einem Eluat von I die unter 3. und 5. genannten Reaktionen positiv ausfallen, enthält auch dieses „aktivierten AcA“. Gipfel II („aktivierte BTS“) tritt bei dem Versuchen mit Pyruvatoxydase nicht oder nur sehr gering auf. Vermutlich findet hier der weitere Umsatz des „aktivierten AcA“ nicht durch Austauschreaktion mit Pyruvat, wie bei der Pyruvat-Decarboxylase, sondern durch direkte Reaktion mit α -Liponsäure statt.

Der mit Pyruvat-Decarboxylase oder Oxydase gewonnene ^{14}C -markierte „aktivierte AcA“ liefert nach Inkubation mit Apo-Carboxylase und freiem, nicht markiertem AcA radioaktives Acetoin, das papierchromatographisch identifiziert wurde.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft danken wir für Sachbeihilfen, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben.

Eingegangen am 16. November 1959 [Z 845]

* Abkürzungen: TPP = Thiaminpyrophosphat; AcA = Acetaldehyd; BTS = Brenztraubensäure; UV = Ultraviolet. — ¹⁾ H. Holzer, G. Schultz, C. Villar-Palasi u. J. Jürgen-Sell, Biochem. Z. 327, 331 [1956]. — ²⁾ L. O. Krampitz u. G. Greul, J. Amer. chem. Soc. 80, 5893 [1958]. — ³⁾ R. R. Williams, R. E. Waterman, J. C. Keresztesy u. E. R. Buchman, ebenda 57, 536 [1935]. — ⁴⁾ R. Breslow, ebenda 80, 3719 [1958]. — ⁵⁾ Prof. Dr. G. Ehrensvärd danken wir für den Rat, mit dieser Methode die Struktur des Thiazol-Derivates zu klären. — ⁶⁾ H. Holzer u. H. W. Goedde, Biochem. Z. 329, 175 [1957]. — ⁷⁾ S. Korkes, A. del Campillo u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 195, 541 [1952]. — ⁸⁾ Versuche mit H. W. Goedde. — ⁹⁾ Versuche mit P. Scriba.

**Zur Zuschrift von H. Funk und W. Hanke:
„Über eine Wolfram-organische Verbindung“**

Funk und Hanke haben kürzlich¹⁾ über die Umsetzung von Wolframpentabromid mit Lithiumphenyl unter Stickstoff und die dabei erhaltene Verbindung $\text{W}(\text{C}_6\text{H}_5)_3 \cdot 3\text{LiC}_6\text{H}_5 \cdot 3(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ berichtet. Dabei ist leider versäumt worden zu erwähnen, daß die als Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchung genannten Versuche zur Darstellung von Schwermetall-Wasserstoff-Verbindungen von mir²⁾ — z. T. gemeinsam mit W. Hanke³⁾ — ausgeführt bzw. angeregt worden sind. Dadurch entsteht der Eindruck, es handele sich um Untersuchungen aus dem Arbeitskreis H. Funk, was jedoch nicht der Fall ist.

Priv.-Doz. Dr. Brigitte Sarry

Anorganisch-Chemisches Institut
der Technischen Universität Berlin

Eingegangen am 6. Oktober 1959

Zu der vorstehenden Bemerkung von Frau Dr. Sarry möchte ich feststellen, daß ich bei meinem Vortrag auf dem IUPAC-Kongreß in München bereits erwähnt habe, daß der äußere Anlaß zur Durchführung dieser Untersuchung darin bestand, daß ich — wegen des unerwarteten Ausscheidens von Frau Dr. Sarry aus meinem Institut — die von ihr mit Herrn Hanke begonnene Arbeit über Schwermetall-Wasserstoff-Verbindungen übernehmen mußte.

Aber erst die von uns vorgenommene Änderung der Zielsetzung und Arbeitsweise führte zu dem von uns veröffentlichten Ergebnis.

Prof. Dr. H. Funk
Institut für Anorganische Chemie der Universität Halle

Eingegangen am 28. Oktober 1959 [Z 848]

¹⁾ Diese Ztschr. 71, 408 [1959]. — ²⁾ B. Sarry, Naturwissenschaften 47, 115 [1954]; Z. anorg. allg. Chem. 280, 65, 78 [1955]; 286, 211 [1956]; 288, 41, 48 [1956]. — ³⁾ B. Sarry u. W. Hanke, ebenda 296, 229 [1958].

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in dieser Zeitschrift berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht als solche gekennzeichnet sind.

Redaktion: (17a) Heidelberg, Ziegelhäuser Landstr. 35; Ruf 24975
Fernschreiber 0461855 Foerst Heidelberg.

© Verlag Chemie, GmbH., 1959. Printed in Germany.

Alle Rechte — auch die der Übersetzung sowie der photomechanischen Wiedergabe — sind vorbehalten. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photostat, microfilm or any other means, without written permission from the publishers.