

CAUSERET, Compt. rend. Acad. Sc. **227**, 399 (1948). — 19. RANDOIN, L. et J. CAUSERET, Compt. rend. Acad. Sc. **227**, 486 (1948). — 20. RANDOIN, L. et J. CAUSERET, J. physiol. (Paris) **41**, 259 A (1949). — 21. RANDOIN, L. et J. CAUSERET, Compt. rend. Acad. Sc. **228**, 504 (1949). — 22. RANDOIN, L. et J. CAUSERET, Compt. rend. Acad. Sc. **229**, 855 (1949). — 23. RANDOIN, L. et J. CAUSERET, Compt. rend. Acad. Sc. **231**, 369 (1950).

Adresse des auteurs:

Dr. SRETEN PAVLOVIĆ et Dr. MIRJANA CANIĆ,
Institut de physiologie pathologique à Niš (Yougoslavie)

*Aus dem Institut für Ernährung in Potsdam-Rehbrücke (Direktor: Prof. Dr. H. Haenel)
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*

Über eine Thiaminpyrophosphokinase im Pankreassaft der Ratte

Von E. SANDNER und B. GASSMANN

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 3. März 1967)

Entgegen der auf Untersuchungen von STOCKHOLM, ALTHAUSEN und BORSON (17) beruhenden allgemeinen Auffassung hat sich in vorangegangenen Versuchen gezeigt, daß bei Ratten mit der Nahrung aufgenommenes Thiamin nicht nur in der Darmwand, sondern auch im Darmlumen phosphoryliert wird (10). Durch Unterbinden des Gallen- und Pankreasganges wird die Thiaminresorption gehemmt. Gleichzeitig ist die Thiaminphosphorylierung im Darminhalt herabgesetzt. Ursache dafür ist die Ausschaltung einer im Pankreassaft enthaltenen Thiaminpyrophosphokinase, die in Inkubationsversuchen mit isolierten Dünndarmschleifen durch die Zunahme des TPP-Gehalts im Darminhalt nach Zusatz von Pankreassaft, Mg^{++} und ATP nachgewiesen worden ist (10). Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, sie zu charakterisieren.

Methodik

Zur Pankreassaftgewinnung unterbinden wir bei ausgewachsenen Albinoratten vom Wistar-Typ (Zucht „Rehbrücke“) nach Laparotomie unmittelbar hinter der Leber den Gallengang, binden in den Pankreasgang einen Polyäthylenschlauch (1,2 mm \varnothing) ein und führen ihn durch die wieder geschlossene Bauchdecke nach außen. Die Tiere werden anschließend in einem engen Drahtkäfig gehalten, in dem sie sich zwar nicht bewegen können, aber freien Zugang zum gewohnten Zuchtfutter haben. Die ersten 3–5 ml der austretenden Pankreasflüssigkeit werden verworfen. Der dann aufgefangene wasserklare Saft wird zu Inkubationsversuchen verwendet, bei denen in der Regel eine 6 mg N entsprechende Menge zum Ansatz kommt.

Das Endvolumen der Ansätze beträgt stets 10 ml, die Inkubationszeit 60 min. Jedem Ansatz werden gleichbleibend $5 \cdot 10^{-8}$ Mol ^{35}S -TBr-HBr (600 μCi)/l zugegeben. Lediglich zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten werden zunehmende Mengen (10^{-6} – 10^{-3} Mol/l) angesetzt. Die pro Ansatz beigefügten ATP- (2 – $12 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) und Mg^{++} -Mengen ($MgCl_2$;

Abkürzungen: ATP Adenosintriphosphat; T Thiamin; TBr-HBr Thiaminbromid-Hydrobromid; TPP Thiaminpyrophosphat; TCl-HCl Thiaminchlorid-Hydrochlorid.

$1-8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) sowie die Inkubationstemperaturen ($17-57^\circ\text{C}$) variieren je nach Versuchszweck. Zur Untersuchung der Abhängigkeit von TPP-Bildung und Enzymkonzentration werden steigende Mengen Pankreassaft (entsprechend $1-6$ mg N/10 ml) eingesetzt. Zur Feststellung des pH -Optimums werden im pH -Bereich $3,0-12,0$ folgende Puffergemische verwendet: Natriumcitrat/Salzsäure; Essigsäure/Natronlauge; Natriumcitrat/Natronlauge; Trispuffer; Borsäure + Kaliumchlorid/Natriumcarbonat und Glycin/Natronlauge. Die Konzentration ist mit Ausnahme des Boratpuffers ($0,2$ M) stets $0,1$ M.

Am Versuchsende wird jeder Ansatz mit 1 ml 10 N Salzsäure versetzt und kurz aufgekocht. $0,01$ ml des Filtrats werden als $2,5$ cm breiter Strich auf die Mitte eines 30 cm langen und $3,5$ cm breiten Papierstreifens (Schleicher & Schüll 2045b) aufgetragen. Die nachfolgende Elektrophorese wird in Anlehnung an das Verfahren von SILIPRANDI (15) durchgeführt:

$0,075$ M Essigsäure/Acetat-Puffer pH $5,5$; $I = 1,2$; $4,5$ -Std.; $9,2$ V/cm; $3-8$ mA.

Das Pherogramm wird mit alkalischer Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung (1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 2% NaOH, methanolisch, $1:20$) besprüht und TPP an Hand eines Vergleichspherogramms, das durch Elektrophorese eines nach VISCONTINI, KARRER und BONETTI (19) dargestellten Gemisches von T und T-Phosphorsäureestern gewonnen wird, als Thiochrom im UV-Licht identifiziert. Die dem TPP entsprechende Thiochromfraktion wird im 45°C warmen Wasserbad mit 50% igem Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Feststellung der Radioaktivität auf Metallschälchen eingedampft und im Methan-Durchflußzähler ausgezählt. Aus der gemessenen Radioaktivität wird die gebildete TPP-Menge berechnet.

Ergebnisse

Die pH -Abhängigkeit der Thiaminpyrophosphokinaseaktivität ist in der Abb. 1 dargestellt. Unter den Reaktionsbedingungen werden zwei Optimalbereiche gefunden, einer um pH $5,3$ ($4,5-6,0$) und einer um pH $9,0$ ($8,5-10,5$). Die TPP-Bildung ist bei pH 9 am größten. Sie wird durch ATP-Zusatz zum Reaktionsgemisch erheblich intensiviert.

Bei pH 9 beträgt die optimale Temperatur $42,5^\circ\text{C}$ (Abb. 2); bei pH $5,3$ hat sich ein Temperaturoptimum von $41,0^\circ\text{C}$ ergeben. Die Q_{10} -Werte betragen bei pH 9 und ATP-Zusatz für die Temperaturintervalle $22-32$ und $32-42^\circ\text{C}$ $1,16$ und $1,14$.

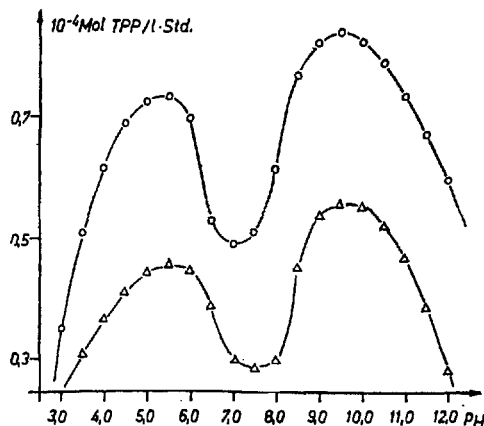


Abb. 1. Die pH -Abhängigkeit der Thiaminpyrophosphokinase-Aktivität (10 ml Endvolumen, 6 mg Pankreassaft-N, Pufferlösungen s. Text, $5 \cdot 10^{-4}$ M T, $2 \cdot 10^{-4}$ M Mg^{++} , 60 min, $37,5^\circ\text{C}$; --- Δ --- Δ --- ohne ATP, --- \bigcirc --- \bigcirc --- $2 \cdot 10^{-4}$ M ATP).

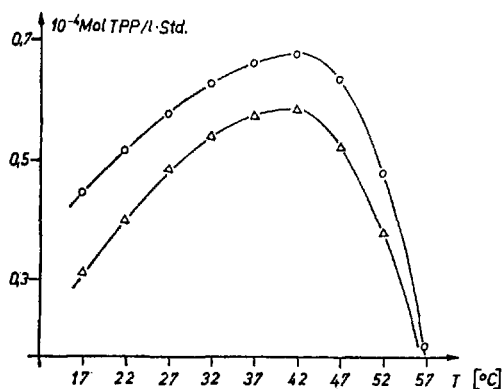


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Thiaminphosphorylierung von der Reaktionstemperatur (10 ml Endvolumen, 6 mg Pankreassaft-N, Borsäure-KCl-Na₂CO₃-Puffer pH 9,0; 0,2 M; $5 \cdot 10^{-3}$ M T, $2 \cdot 10^{-4}$ M Mg⁺⁺, 60 min: --△--△-- ohne ATP, --○--○-- $2 \cdot 10^{-4}$ M ATP).

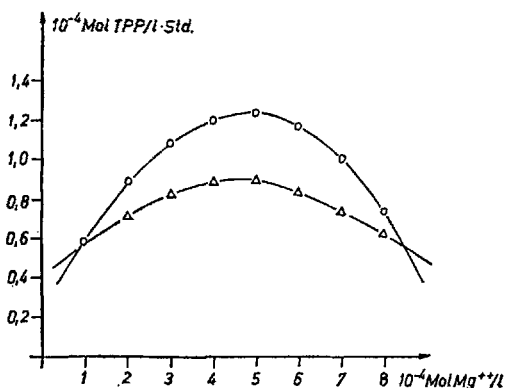


Abb. 3. Der Einfluß der Mg⁺⁺-Konzentration auf die Thiaminpyrophosphokinase-Reaktion (10 ml Endvolumen, 6 mg Pankreassaft-N, $5 \cdot 10^{-3}$ M T, $5 \cdot 10^{-4}$ M ATP, 60 min: --△--△-- Na-Citrat-NaOH-Puffer pH 5,3; 0,1 M; 41 °C; --○--○-- Borsäure-KCl-Na₂CO₃-Puffer pH 9,0; 0,2 M; 42,5 °C).

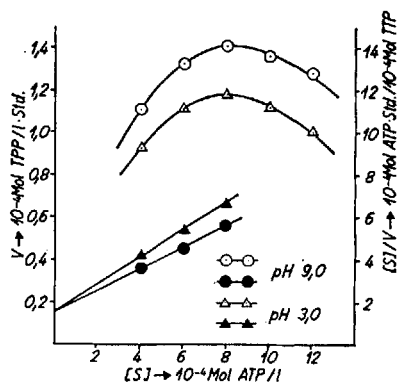


Abb. 4. Der Einfluß der ATP-Konzentration auf die Geschwindigkeit der Thiaminphosphorylierung (10 ml Endvolumen, 6 mg Pankreassaft-N, $5 \cdot 10^{-3}$ M T, $5 \cdot 10^{-4}$ M Mg⁺⁺, 60 min: --△--△-- Na-Citrat-NaOH-Puffer pH 5,3; 0,1 M; 41,0 °C; --○--○-- Borsäure-KCl-Na₂CO₃-Puffer pH 9,0; 0,2 M; 42,5 °C).

Unabhängig vom pH -Optimum hat die optimale Mg^{++} -Konzentration bei Ansatz von 6 mg N entsprechendem Pankreassaft/10 ml Reaktionslösung $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l betragen (Abb. 3). Unter den gleichen Bedingungen hat sich ein ATP-Zusatz von $8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l als am günstigsten erwiesen (Abb. 4). Ein Überschuß von ATP wirkt sich hemmend auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. Bei ATP als Substrat errechnet sich nach Abb. 4 für beide pH -Optima eine Michaeliskonstante von $1,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

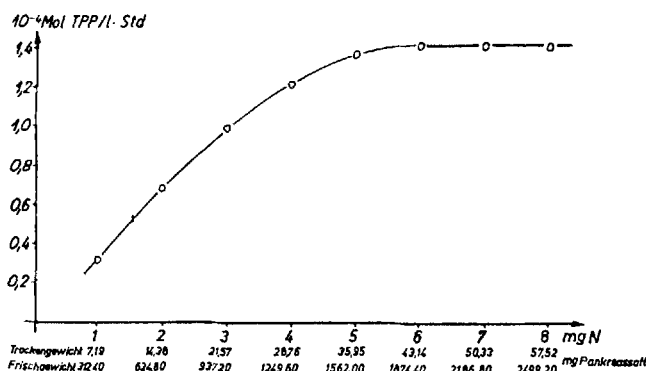


Abb. 5. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Pankreassaft- und Pankreassaft-N-Menge/10 ml (10 ml Endvolumen, Borsäure-KCl- Na_2CO_3 -Puffer pH 9,0; 0,2 M; $5 \cdot 10^{-3}$ M T, $5 \cdot 10^{-4}$ M Mg^{++} , $8 \cdot 10^{-4}$ M ATP, 60 min, 42,5 °C).

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeit gegen den N-Gehalt der inkubierten Pankreassaftmenge auf (Abb. 5), so erkennt man, daß dieser als relative Enzymkonzentration gewertet werden kann; denn die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bei der vorgegebenen Substratkonzentration ($5 \cdot 10^{-3}$ M T) bis etwa 4 mg Pankreassaft-N/10 ml linear an. Untersucht man die TPP-Bildung für verschiedene relative Enzymkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit, so erhält man Umsatzkurven, die mit abnehmender Enzymkonzentration mehr und mehr abflachen. Die zur halbmaximalen TPP-Bildung benötigte Zeit

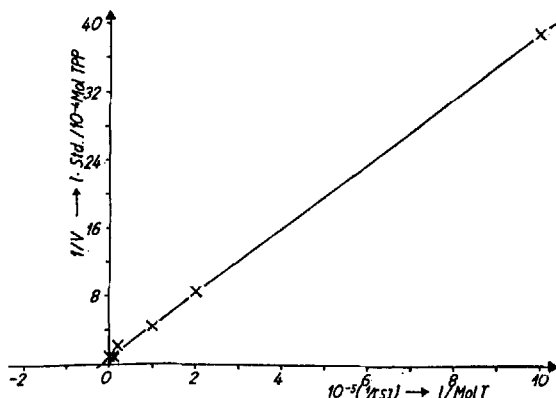


Abb. 6. Bestimmung der Michaeliskonstante für Thiamin als Substrat (10 ml Endvolumen, 6 mg Pankreassaft-N, Borsäure-KCl- Na_2CO_3 -Puffer pH 9,0; 0,2 M; $5 \cdot 10^{-4}$ M Mg^{++} , $8 \cdot 10^{-4}$ M ATP, 60 min, 42,5 °C).

beträgt im Bereich 1–4 mg Pankreassaft-N 330 (1 mg), 210 (2 mg), 152 (3 mg) und 72 min (4 mg N).

Die bei p_H 9 und den günstigsten Reaktionsbedingungen (6 mg Pankreassaft-N, 5 μ Mol Mg^{++} und 8 μ Mol ATP/10 ml; 42,5 °C, 60 min) gefundene Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Thiaminkonzentration ist in der Abb. 6 nach LINEWEAVER und BURK dargestellt. Unter diesen Bedingungen ergibt sich eine Michaeliskonstante von $5,42 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Die aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit berechnete spezifische Aktivität der Thiaminpyrophosphokinase beträgt $3,9 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/mg Pankreassaft-N oder $12,6 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/ml Pankreassaft.

In ähnlicher Weise (6 mg Pankreassaft-N, 5 μ Mol Mg^{++} und 8 μ Mol ATP/10 ml; 41,0 °C, 60 min) sind für p_H 5,3 eine Michaeliskonstante von $1,23 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und eine spezifische Aktivität von $2,4 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/mg Pankreassaft-N oder $7,7 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/ml Pankreassaft ermittelt worden.

Diskussion

Thiaminpyrophosphokinasen sind bisher in Hefe, Bakterien und verschiedenen tierischen Geweben nachgewiesen worden (1). Näher gekennzeichnet worden sind Extrakte und Enzympräparate aus Hefe (2, 3, 5, 6, 13, 16, 18, 20) sowie aus der Leber (7, 8, 14) und der Dünndarmwand (13) von Ratten und Kaninchen. Es wird angenommen, daß es sich bei der von ihnen katalysierten Phosphorylierung um die direkte Übertragung einer Pyrophosphatgruppe handelt (5, 7, 20), bei der verschiedene Nukleosidtriphosphate als Pyrophosphatdonatoren wirksam werden können (1, 6).

Über eine Thiaminpyrophosphokinase im Pankreassaft ist unseres Wissens bisher nichts bekannt. NASSET und WALDO (9) haben zwar Thiamin mit Pankreas- und Darmsäften inkubiert, aber nur eine Hydrolyse von TPP und nicht eine Phosphorylierung von Thiamin feststellen können.

In den vorangegangenen Versuchen (10) haben wir jedoch im Dünndarm von Ratten von oral verabfolgten 50 μ g ^{35}S -Thiamin schon nach 20 min 90% als TPP vorgefunden und dafür vor allem eine im Pankreassekret enthaltene Thiaminpyrophosphokinase verantwortlich gemacht. Die Absonderung von Pankreassaftmengen bis zu 1 ml/Std., wie wir sie bei unseren ad libitum gefütterten Fisteltieren beobachtet haben, und die gefundene spezifische Enzymaktivität von $12,6 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/ml Pankreassaft (4,2 μ g TCl-HCl oder 5,8 μ g TPP/min/ml) bestärken uns in unserer Auffassung. Die Enzymaktivität muß selbst im Vergleich mit der für Leberpräparate angegebenen (7, 8) als hoch bezeichnet werden. Als Michaeliskonstanten sind für das Leberenzym $4,5 \cdot 10^{-4}$ Mol T/l und $8,3 \cdot 10^{-4}$ Mol ATP/l und für das Hefeenzym $0,75 \cdot 10^{-4}$ Mol T/l und $1,0 \cdot 10^{-4}$ Mol ATP/l mitgeteilt worden (12).

Zwei optimale p_H -Bereiche deuten auf das Vorliegen von Isoenzymen hin (11), von denen jedoch nur eins im p_H -Bereich des Pankreassekretes (8,6–8,8) wirksam wird. Wie in der p_H -Abhängigkeit unterscheiden sie sich auch in der Michaeliskonstante für Thiamin als Substrat und in der spezifischen Aktivität. Mit dem für das Leberenzym angegebenen (7) stimmt keines der beiden p_H -Optima überein.

Die nach Überschreiten eines Optimalzusatzes von Metallionen einsetzende Hemmung der Thiaminpyrophosphokinase-Aktivität ist mit der Bildung von

inaktiven oder hemmenden (Metall)₂-ATP-Komplexen neben der eigentlich wirksamen Metall-ATP-Form und das Fehlen einer Hemmwirkung überschüssigen Magnesiums auf das Hefeenzym mit der nur geringen Neigung von Magnesium zur Chelatbildung erklärt worden (5). Ähnlich wie beim Pankreasenzym setzt jedoch überschüssiges Magnesium⁺⁺ auch beim Leberenzym die Reaktionsgeschwindigkeit herab (7).

Das günstigste Molverhältnis von Mg⁺⁺: ATP hat im Versuch zur Kennzeichnung der optimalen Mg⁺⁺-Menge 1 : 1 betragen. Da ein solches Verhältnis für die Fructokinase der Leber gleichfalls als optimal (4) und mehrfach als günstigstes Verhältnis von Substratnukleotid und aktivierendem Ion bezeichnet worden (10) ist, kommt ihm möglicherweise auch für die Thiaminpyrophosphokinase des Pankreassekretes Bedeutung zu.

Zusammenfassung

In Inkubationsversuchen mit ³⁵S-Thiamin wird durch papierelektrophoretische Abtrennung des gebildeten ³⁵S-Thiaminpyrophosphats und dessen Bestimmung im Pankreassekret der Ratte eine Thiaminpyrophosphokinase mit zwei pH-Optima nachgewiesen und bei Einhaltung von 10 ml Endvolumen, 6 mg N entsprechenden Pankreassaftmengen, 60 min Inkubationszeit und in der Regel $5 \cdot 10^{-3}$ M ³⁵S-Thiamin als Reaktionsbedingungen folgendermaßen gekennzeichnet:

1. pH-Optimum 9,0 (Borsäure-KCl-Na₂CO₃-Puffer; 0,2 M), Temperaturoptimum 42,5 °C, günstigste ATP-Konzentration $8 \cdot 10^{-4}$ M, optimale Mg⁺⁺-Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ M; Michaeliskonstante für ATP als Substrat $1,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, für Thiamin als Substrat $5,42 \cdot 10^{-5}$ Mol/l; spezifische Aktivität $3,9 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/mg Pankreassaft-N oder $12,6 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/ml Pankreassaft.
2. pH-Optimum 5,3 (Natriumcitrat-NaOH-Puffer 0,1 M), Temperaturoptimum 41,0 °C, günstigste ATP-Konzentration $8 \cdot 10^{-4}$ M, optimale Mg⁺⁺-Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$ M; Michaeliskonstante für ATP als Substrat $1,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, für Thiamin als Substrat $1,23 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; spezifische Aktivität $2,4 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/mg Pankreassaft-N oder $7,7 \cdot 10^{-9}$ Mol/min/ml Pankreassaft.

Unserer wiss.-techn. Assistentin Frau E. VORRATH danken wir für ihre zuverlässige Mitarbeit.

Literatur

1. BOYER, P. D., H. LARDY und K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 6, 2nd Ed., p. 25 (New York und London 1962). — 2. CAMIENER, G. W. und G. M. BROWN, *J. biol. Chem.* **235**, 2411 (1960). — 3. FORSANDER, O., *Acta Soc. Sci. fenn. comm. Phys.-Math.* **19**, 96 (1956). — 4. HERS, H. G., *Biochim. biophys. Acta* **8**, 424 (1952). — 5. KAZIRO, Y., *J. Biochem., Tokyo* **46**, 1523 (1959). — 6. KAZIRO, Y. und N. SHIMAZONO, *J. Biochem., Tokyo* **46**, 963 (1959). — 7. LEUTHARDT, F. und H. NIELSEN, *Helv. chim. Acta* **35**, 1196 (1952). — 8. MANO, Y., *J. Biochem., Tokyo* **47**, 159, 283, 401 (1960). — 9. NASSET, E. S. und I. F. WALDO, *J. Nutr.* **21**, Suppl. 10 (1941). — 10. SANDNER, E. und B. GASSMANN, *Nahrung* (in Druck). — 11. SCHWIMMER, S., *J. theoret. Biol.* **3**, 102 (1962). — 12. SHIMAZONO, N., *Metabolism of thiamine in the animal body*. In: SHIMAZONO, N. and E. KATSURA, *Review of Japanese literature on beriberi and thiamine*, p. 163, Vitamin B Res. Comm. Jap. (Kyoto 1965). — 13. SHIMAZONO, N., Y. MANO, R. TANAKA und Y. KAZIRO, *J. Biochem. Tokyo* **46**, 959 (1959). — 14. SHIMOTANI, M., Y. UEMORI und T. MORIYAMA, *J. Nara Med. Ass.* **11**, 995 (1960). — 15. SILIPRANDI, D. und N. SILIPRANDI, *Biochim. biophys. Acta* **14**, 52 (1954). — 16. STEYN-PARVÉ, E. P., *Biochim. biophys. Acta* **8**, 310 (1952). —

17. STOCKHOLM, M., T. L. ALTHAUSEN und H. J. BORSON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. **46**, 387 (1941). — 18. THOAI, VAN N. und L. CHEVILLARD, Bull. Soc. Chim. biol. **31**, 204 (1949). — 19. VISKONTINI, M., P. KARRER und G. BONETTI, Helvet. chim. Acta **32**, 1478 (1949). — 20. WEIL-MALHERBE, H., Biochem. J. **33**, 1997 (1939).

Anschrift der Verfasser:

Dipl.-Chem. E. SANDNER und Dr. B. GASSMANN,
X 1505 Potsdam-Rehbrücke, A.-Scheunert-Allee 155

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Mainz
(Seinerzeitiger Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)*

Parenterale Ernährung mit Fettemulsionen verschiedener Teilchengröße

(Versuche mit Ratten)

VON A. FRICKER, W. GRIEM und K. LANG *)

Mit 5 Abbildungen und 8 Tabellen

(Eingegangen am 3. April 1967)

I. Einleitung

Seit einigen Jahren werden bei Patienten, bei denen eine Ernährung per os oder mit Hilfe der Magensonde aus klinischen Gründen nicht möglich ist, in der dann notwendigen parenteralen Ernährung Fettemulsionen mitverwendet. Es wird damit erleichtert bzw. in manchen Fällen überhaupt erst möglich, entsprechende „Kalorienmengen“ zu applizieren. Insbesondere ist dies z. B. nach schweren Traumen notwendig. In zahlreichen Tierversuchen sowie in der Klinik wurden inzwischen auch die Erfahrungen gesammelt, die einer breiten klinischen Anwendung der Fettemulsionen den Weg ebneten.

Bei dem Symposium über parenterale Ernährung im Oktober 1964 in Mainz wies PEZOLD (1) u. a. darauf hin, daß die optimale durchschnittliche Partikelgröße in den Fettemulsionen mit $1\ \mu$ angenommen wird. Untersuchungen darüber, wie sich gegebenenfalls Emulsionen mit abweichenden Teilchengrößen auswirken, insbesondere wenn sie Teilchendurchmesser von wesentlich mehr als $2\ \mu$ aufweisen, sind unseres Wissens bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Es wurde daher in dieser Arbeit versucht, Fettemulsionen mit Teilchen von 2 bis 5 und mehr μ Durchmesser herzustellen und die Verwertung dieser Emulsionen nach Markierung mit ^{14}C im Körper der Ratte im Vergleich mit „kleintropfigen“ Emulsionen zu untersuchen. Die Markierung erfolgte durch Zugabe von Palmitinsäure-, Ölsäure- und Linolsäuremethylester, die in Stellung 1 mit ^{14}C markiert waren. Wir benutzten als Fett handelsüblich raffiniertes Sojaöl, das also als „Vehikel“ für die Markierungssubstanz diente und über dessen ernährungsphysiologische Eigenschaften umfangreiche Erfahrungen am Institut vorlagen. Histologische Untersuchungen an den Organen der Versuchstiere sollten die Befunde erweitern.

*) Der Technischen Assistentin Fräulein IRIS STOCK danken wir auch an dieser Stelle für ihre Mitarbeit.