

*Aus dem Institut für Physiologische Chemie I und dem Lehrstuhl
für Klinische Biochemie (Diabetologie) der Universität Düsseldorf*

Pyruvat- und α -Ketoglutaratatmung in Mitochondrien der Thiaminmangelratte*)

Von D. Januschke, H. Reinauer und S. Hollmann

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 16. August 1973)

In der terminalen Phase des alimentären Thiaminmangels bei der Ratte sind die Mitochondrien des Herzmuskels geschwollen, ihre Zahl ist erhöht (Bózner et al. 1969). Biochemisch fand man in dieser Phase eine Aktivitätsminderung der Pyruvat- und α -Ketoglutaratdehydrogenase in den Mitochondrien des Herzmuskels, der Leber und des Gehirns. Außer diesen thiaminabhängigen mitochondrialen Enzymen waren auch die Aktivitäten der Thiaminpyrophosphokinase, der Isozitratdehydrogenase, der Lactatdehydrogenase, der Glukose-6-phosphatdehydrogenase vermindert (Gubler 1968, Blum 1969, Reinauer et al. 1971). Die Aktivitäten anderer Enzyme wie Malatdehydrogenase, Lipoamiddehydrogenase, Dihydrolipoamidacetyltransferase, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und Phosphorylase waren hingegen unverändert.

Die Frage nach dem Aktivitätsverlust der Pyruvatdehydrogenase im Thiaminmangel ist mit den Untersuchungen von Linn et al. (1969) bzw. Wieland und Mitarb. (1969-1971) erneut aktuell geworden. Es stellt sich die Frage, inwieweit dieser Aktivitätsabfall im schweren Thiaminmangelzustand durch irreversible Phosphorylierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes zustande kommt. Weiterhin ist zu prüfen, mit welcher Geschwindigkeit die isolierten Mitochondrien aus Mangeltierorganen Pyruvat bzw. α -Ketoglutarat veratmen und in welchem Maße dieser O_2 -Verbrauch durch Thiaminpyrophosphat aktiviert werden kann.

Material und Methode

1. Reagenzien

Saccharose für biochemische Zwecke, Äthyldiamintetraessigsäure, Di-natriumsalz, Thiaminpyrophosphorsäure, Brenztraubensäure Natriumsalz, Nikotinsäureamid von der Firma Merck, Darmstadt

2-Mercaptoäthanol von der Firma Fluka AG., Schweiz

***)** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Landesamtes für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen

NAD, NADP, ADP, Dibutyryl-cyclo-AMP, Oxalessigsäure, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Triäthanolaminhydrochlorid, Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus Hefe (EC 1.1.1.49), Phosphoglucose-Isomerase aus Hefe (EC 5.3.1.9), Hexokinase (EC 2.7.1.1) von der Firma Boehringer, Mannheim

Binotal® von der Firma Bayer, Leverkusen.

2. Versuchstiere

50 bis 70 g schwere Wistar-II-Ratten wurden mit einer thiaminarmen Diät (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland/Ohio) ernährt. Die Tiere wurden in verschiedenen Stadien des Thiaminmangelzustandes untersucht. Der Thiaminmangelzustand wird in 4 Stadien von jeweils 8 Tagen eingeteilt, wobei im Stadium 4 vestibuläre Reizerscheinungen bzw. tonisch-klonische Krämpfe einsetzen. Alle Tiere erhielten Wasser ad libitum. Die Kontrolltiere wurden mit Mangelfutter ernährt und mit Thiamin supplementiert. In einer weiteren Versuchsserie wurden die Ratten paarweise gefüttert, wobei die Kontrolltiere die gleiche Menge Mangelfutter, das durch Thiamin ergänzt war, erhielten. Die Gewichtskurven der Mangeltiere und der Kontrollen gehen aus der Abb. 1 hervor.

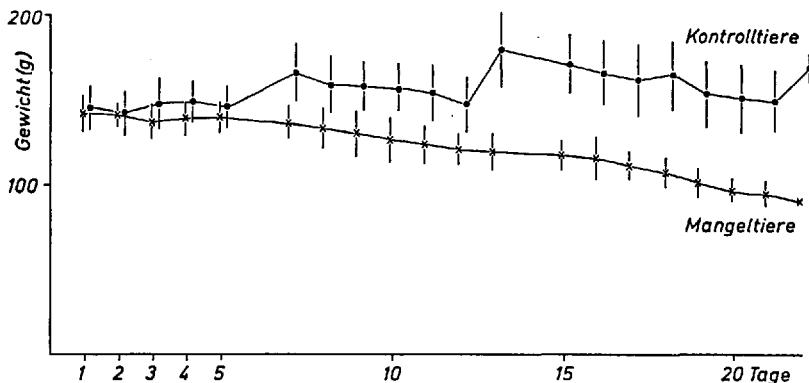


Abb. 1. Gewichtskurve von paarweise gefütterten Ratten. Die Mangeltiere erhielten täglich 15 g Futter vorgelegt. Durch Rückwiegen wurde die Futteraufnahme und damit die Futtermenge für die Kontrolltiere bestimmt.

3. Methoden

Die Rattenorgane wurden sofort in eisgekühlter Saccharose-EDTA-Tris-Lösung (0,3 M – 1 mM – 10 mM, pH 7,4) mit dem *Potter-Elvehjem*-Homogenisator homogenisiert, die Mitochondrien durch Differentialzentrifugation in der Kühlzentrifuge (Sorvall) nach *Schneider* (1948) bzw. *Hogeboom* und *Schneider* (1948) gewonnen und zweimal gewaschen. Die gewaschenen Mitochondrien wurden in einer Lösung nach *Stuart* und *Williams* (1966) aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen in den *Warburg*-Ansätzen lagen bei Herzmuskelmitochondrien durchschnittlich bei 2,5 mg pro Ansatz, bei den Nierenmitochondrien bei 3,6 mg und bei den Lebermitochondrien bei 10,7 mg. Die Proteinbestimmung wurde mit der Biuret-Methode durchgeführt, wobei Serumalbumin als Standard diente. Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondriensuspension wurde mit dem *Warburg*-Apparat in 13-ml-Gefäßen bestimmt. Der Ansatz enthielt: Magnesiumchlorid 40 mM, NAD 3 mM, Nikotinsäureamid 30 mM, CoA 0,4 mM, Serumalbumin 2 mg/ml, Binotal® 1,5 mg, 2-Mercaptoäthanol 2 mM, Phosphatpuffer 100 mM, Mitochondrien 2,5–10,5 mg Protein, ADP 1,25 mM, Glucose 3,50 mM, Hexo-

kinase 0,15 mg, Thiaminpyrophosphat 0,5 mM. Das Endvolumen bestand aus 2,0 ml, der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

Bestimmt wurden der endogene O_2 -Verbrauch und der O_2 -Verbrauch nach Zugabe von 10 mM Pyruvat bzw. α -Ketoglutarat. Glucose-6-phosphat wurde nach *Hohorst* (1962) mit Hilfe der Glucose-6-phosphatdehydrogenase bestimmt, aus der Glucose-6-phosphatmenge und dem Sauerstoffverbrauch der P/O-Quotient errechnet.

Die Aktivitätsmessung der Pyruvatdehydrogenase erfolgte in den friergestoppten Organen bei 1 mM $MgCl_2$ nach *Reinauer* et al. (1968, 1970). Das eingefrorene Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit 40% Glycerin in 0,050 M Phosphatpuffer, pH = 7,4, bei $-10^\circ C$ homogenisiert, und dieses Homogenat direkt oder nach Vorinkubation mit 1 bzw. 10 mM $MgCl_2$ zur Aktivitätsmessung der Pyruvatdehydrogenase eingesetzt (Wieland und Siess 1971).

Extrakte aus Normaltiermitochondrien: Nach Aufschluß der reinen Mitochondrien durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in hypotonem Phosphatpuffer wurde die Suspension 20 min bei $30\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Test eingesetzt.

Ergebnisse

Zur Ermittlung der optimalen Meßbedingungen wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Inkubiert man Mitochondrien aus Normaltieren mit dem Standardansatz, so erhält man bei der Pyruvatatmung von Nierenmitochondrien regelmäßig zu niedrige P/O-Quotienten. Weiterhin ging aus den Messungen im substratfreien Medium hervor, daß über eine längere Zeit ATP aus dem Umsatz von endogenem Substrat geliefert wird, wie es auch von anderen Autoren (Minnaert 1960, Bryla et al. 1967, Weinbach 1958, 1960, 1961) beschrieben wurde. Diese endogene Atmung der Mitochondrien nimmt mit fortschreitendem Thiaminmangel zu. Pyruvat bewirkte zwar eine Steigerung der O_2 -Aufnahme, jedoch keine adäquate Zunahme der ATP-Produktion. Mögliche Ursachen sind:

1. ATP-verbrauchende Enzymaktivitäten (Myokinase etc.) (Slater 1952).
2. Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung.

Um optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, wurde der ursprüngliche Ansatz systematisch variiert. Es zeigte sich, daß eine O_2 -Aufnahme nur in Gegenwart von NAD, ADP und Coenzym A erfolgt. Als entkoppelnde Faktoren erwiesen sich: Hypotoner Medium, lange Inkubationsdauer bei $37^\circ C$, freie Fettsäuren. Die Wirkung der Myokinase ließ sich durch NaF (40 mM), die entkoppelnde Wirkung der freien Fettsäuren durch Albuminzugabe unterbinden. Zur Wahrung der Isotonie wurden alle Substanzen im Isolationsmedium (Saccharose 0,3 M, Tris-Puffer 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 7,4) gelöst.

Inkubiert man Nierenmitochondrien von Normaltieren mit Pyruvat als Substrat, dann steigt die Atmungsaktivität mit zunehmender Magnesiumkonzentration nur geringfügig an. Ein Maximum findet man bei 40 mM (Abb. 2). Bei höheren Magnesiumkonzentrationen geht der Sauerstoffverbrauch eher zurück.

Der mittlere Sauerstoffverbrauch beträgt bei Nieren- und Lebermitochondrien 760 bzw. 933 $\mu l O_2/100$ mg Protein und Stunde. In den Nierenmitochondrien liegt der P/O-Quotient bei etwa 2,5. Erhöht man bei diesen Nierenmitochondrien die NAD-Konzentration von 3 bis 20 mM, so fällt

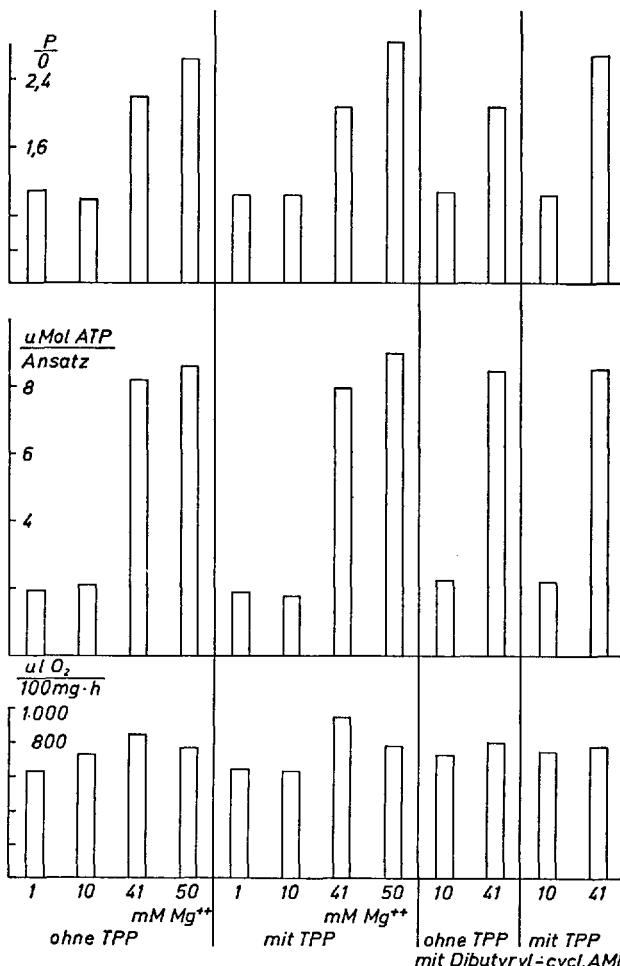


Abb. 2. O_2 -Verbrauch, ATP-Produktion und P/O-Quotient in Nierenmitochondrien von Normaltieren. Mit steigender Mg^{2+} -Konzentration steigen der O_2 -Verbrauch, die ATP-Produktion und der P/O-Quotient an ($n = 3$).

bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch die ATP-Produktion und damit der P/O-Quotient auf 1,05 ab (Abb. 3).

Inkubiert man Herz- und Lebermitochondrien mit Pyruvat bzw. mit Pyruvat und Oxalacetat als Substrat, so ist der Sauerstoffverbrauch in Gegenwart beider Substrate erhöht. Die Unterschiede sind besonders in den Herzmuskelmitochondrien ausgeprägt. In der Leber führt die Oxalacetatzugabe zu keiner wesentlichen Steigerung der Atmung.

Erstaunlich ist der große Unterschied beim Sauerstoffverbrauch zwischen Pyruvat und α -Ketoglutarat. Bei Nierenmitochondrien von Normaltieren ist der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch mit α -Ketoglutarat als Substrat 2750 $\mu l O_2/100 mg/Stunde$ und damit mehr als dreimal so hoch wie bei Pyruvat. Der O_2 -Verbrauch mit Pyruvat als Substrat liegt im glei-

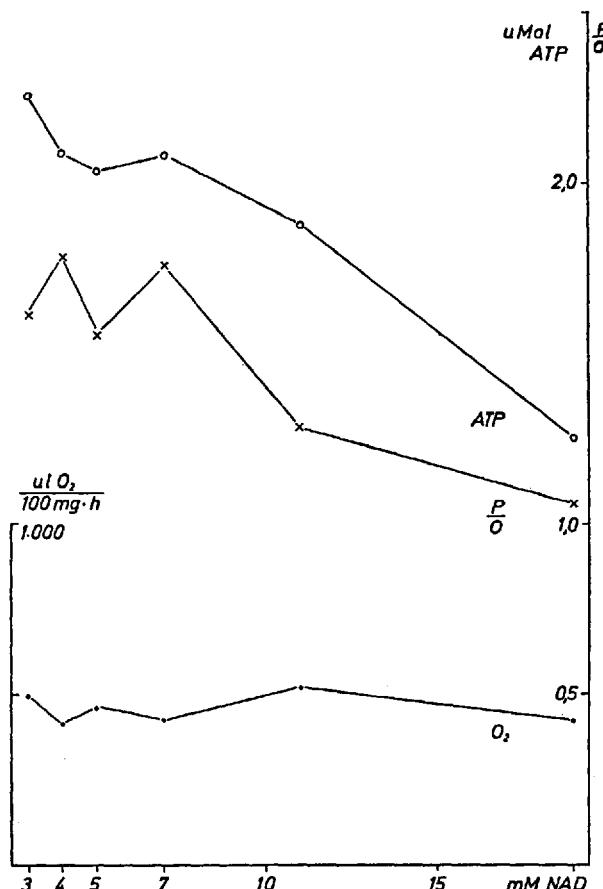


Abb. 3. Abhängigkeit des O_2 -Verbrauchs, der ATP-Bildung und des P/O-Quotienten von der NAD-Konzentration. Die NAD-Supplementierung hat bereits bei $3 \mu\text{Mol/ml}$ Ansatz einen optimalen Effekt.

chen Bereich wie die Aktivitätsmessungen der Pyruvatdehydrogenase in isolierten Mitochondrien und im Gewebe nach Frierstopp. Der Sauerstoffverbrauch entspricht einem Umsatz von $42 \mu\text{Mol Pyruvat}/100 \text{ mg}/\text{Std.}$, der Umsatz der z. T. aktivierten PDH wurde in isolierten Mitochondrien zwischen $52-58 \mu\text{Mol}/100 \text{ mg}/\text{Std.}$ gemessen (Reinauer et al. 1971). Der P/Q-Quotient liegt bei α -Ketoglutarat als Substrat für Lebermitochondrien bei 2,5 bzw. 2,1, für Nierenmitochondrien bei 2,8.

Untersucht man den O_2 -Verbrauch unter Pyruvat und α -Ketoglutarat in Mitochondrien von Mangeltieren 18 Tage nach Fütterung mit einer thiaminarmen Diät, so findet man einen signifikanten Abfall des O_2 -Verbrauchs, der bei Pyruvat nur ca. 30%, bei α -Ketoglutarat noch ca. 50% des Kontrollwertes beträgt. Der verminderte O_2 -Verbrauch wird auf den schon bekannten Aktivitätsabfall der Pyruvat- und α -Ketoglutaratdehydrogenase im Thiaminmangel zurückgeführt.

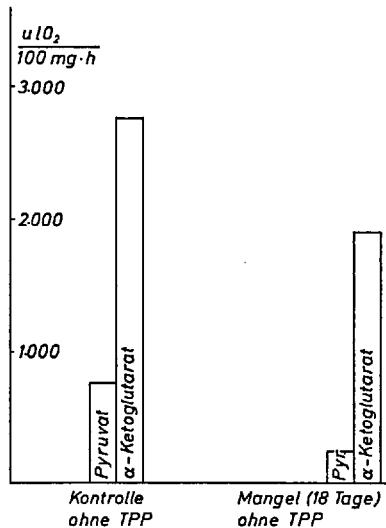


Abb. 4. Verhältnis des O₂-Verbrauchs in Nierenmitochondrien mit Pyruvat bzw. α -Ketoglutarat als Substrat (n = 3).

Der Aktivitätsabfall der Pyruvatdehydrogenase kann durch 3 Faktoren bedingt sein:

1. durch Mangel an Thiaminpyrophosphat
2. durch Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes infolge Interkonvertierung
3. durch Abbau des Apoenzyms der Pyruvatdehydrogenase bzw. Pyruvatcarboxylase.

Der durch *Mangel an Thiaminpyrophosphat* bedingte Aktivitätsabfall der Pyruvatdehydrogenase kann durch In-vitro-Inkubation der Mitochondrien mit Thiaminpyrophosphat aufgehoben werden. Nach unseren Untersuchungen wird das Apoenzym mit 10^{-4} bis 10^{-5} M Thiaminpyrophosphat innerhalb von 5 Min. mit Coenzym gesättigt. Die durch Thiaminpyrophosphat aktivierbare Menge an Pyruvatdehydrogenase ist abhängig vom Mangelzustand der untersuchten Ratten. Im Stadium III und IV des Mangelzustandes kann man eine Aktivierung über die Norm hinaus messen, woraus auf eine Vermehrung der aktiven Form der Pyruvatdehydrogenase (PDH_a) geschlossen wird.

Inkubiert man Nierenmitochondrien aus Mangeltieren mit 10 mM Mg⁺⁺-Ionen, um die Pyruvatdehydrogenase-phosphatase zu aktivieren, aber ohne Thiaminpyrophosphat, so erhält man keine wesentlichen Differenzen zu den Werten bei 1 mM Magnesiumchlorid (Abb. 5). Gibt man jetzt zusätzlich Thiaminpyrophosphat in der obengenannten Konzentration zu, dann erhält man bei 10 mM Mg⁺⁺-Ionen gegenüber den Werten bei 1 mM einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, der jedoch statistisch nicht signifikant ist. Möglicherweise kann ein Teil der Pyruvatdehydrogenase ohne Thiaminpyrophosphat im phosphorylierten Zustand vorliegen und durch Mg⁺⁺-Ionen aktiviert werden. Eine Beeinträchtigung der Interkonvertie-

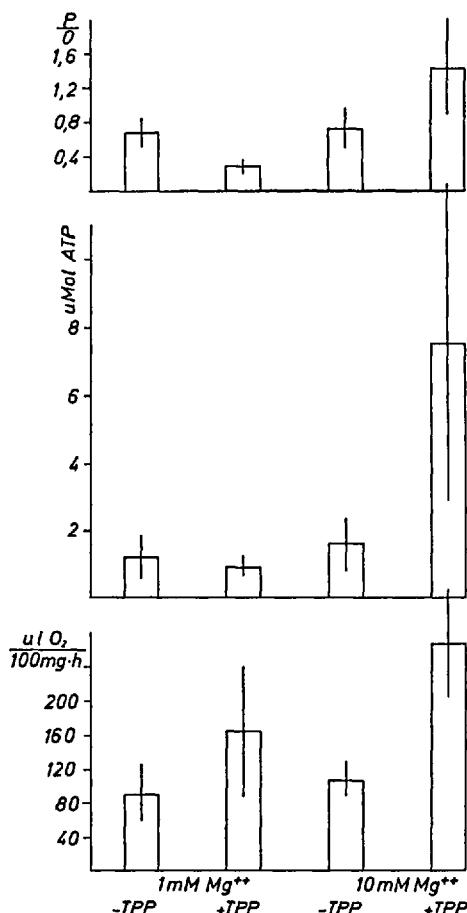


Abb. 5. Nierenmitochondrien aus Mangeltieren (Stadium IV) inkubiert mit Pyruvat als Substrat. Aktivierung des O_2 -Verbrauchs durch Mg^{++} -Ionen und TPP ($n = 4$).

rung der Pyruvatdehydrogenase liegt in diesem Stadium des Thiaminmangels nicht vor. 3',5'-AMP hatte bei Magnesiumkonzentrationen von 1 und 10 mM keinen steigernden Effekt auf den Sauerstoffverbrauch mit Pyruvat als Substrat. Vergleicht man die ATP-Produktion mit dem Sauerstoffverbrauch, so findet man bei 10 mM Magnesiumchlorid- und 0,5 mM Thiaminpyrophosphatzusatz die höchsten Werte, wodurch der P/O-Quotient in Mangeltieren von 0,68 bzw. 0,30 auf 1,44 ansteigt.

Im Vergleich zur mitochondrialen Atmung wurde die aktuelle und durch *Interkonvertierung* erreichbare Gesamtaktivität der Pyruvatdehydrogenase in den friergestoppten Mangeltierorganen gemessen. Vergleicht man die gemessene Aktivität im Gesamthomogenat (65 μ Moles/100 mg/h) mit dem Pyruvatabbau in isolierten Mitochondrien (52–58 μ Moles/100mg/h), dann erhält man unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Interkonvertierung vergleichbare Werte (Abb. 4 und Abb. 6). Wie aus der Abb. 6 weiter hervorgeht, beträgt im Normaltier die aktuelle Pyruvatdehydro-

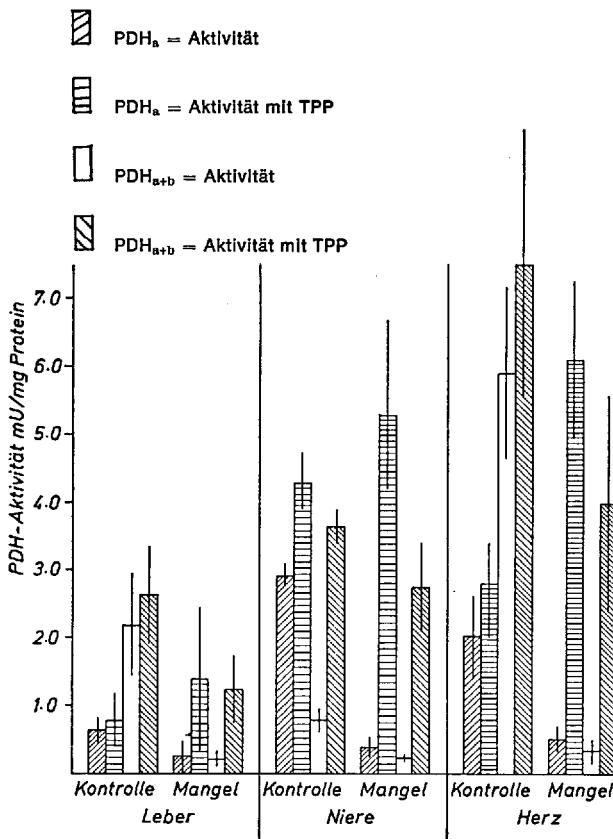


Abb. 6. Aktivität der Pyruvatdehydrogenase im Stadium IV des Thiaminmangels. Die Aktivität wurde in Organhomogenaten vor und nach Vorinkubation mit 10 mM Mg^{++} -Ionen und Thiaminpyrophosphat gemessen ($n = 6$).

genaseaktivität in Herz, Leber und Gehirn 27 %, 21 % bzw. 78 % der möglichen Gesamtaktivität. Diese prozentualen Unterschiede sind im Thiaminmangeltier ausgeprägter: Die aktuelle Aktivität im Gewebe beträgt auf Grund des Thiaminpyrophosphatmangels in Herz, Leber und Gehirn nur noch 12,6 %, 12,9 % bzw. 14,3 % der möglichen Gesamtaktivität. Die Pyruvatdehydrogenase liegt außer in der Leber (77 % Aktivität) in vollaktivem, d. h. entphosphoryliertem Zustand (PDH_a) vor, denn allein durch direkte Zugabe von Thiaminpyrophosphat erhält man (ohne Vorinkubation mit 10 mM Mg^{++} -Ionen) die maximale Aktivität des Enzyms. Nach 30 Min. Vorinkubation bei 37°C ist sogar ein Aktivitätsverlust der Pyruvatdehydrogenase festzustellen. Daher behalten die früher gewonnenen Meßwerte der Pyruvatdehydrogenase im Thiaminmangel, die bei 10 mM Mg^{++} -Ionen und in Gegenwart von Thiaminpyrophosphat gemessen wurden, ihre Gültigkeit (Reinauer et al. 1969, 1971).

Untersucht man die Atmung der Mitochondrien in Niere und Leber in Abhängigkeit von der Dauer des Mangelzustandes, so findet man im Sta-

dium IV ohne Thiaminpyrophosphatzusatz einen weiteren Abfall des Sauerstoffverbrauchs (nach 30 Tagen) und einen Abfall des P/O-Quotienten von 2,5 auf 0,2. Mit Thiaminpyrophosphatzusatz ist die mitochondriale Atmung bis zum 30. Tag über die Norm aktivierbar und danach zunehmend weniger, wobei im Terminalstadium (nach 35 Tagen) der Sauerstoffverbrauch auch in Gegenwart von Thiaminpyrophosphat sehr niedrig ist (Abb. 7 a und 7 b). Der P/O-Quotient verhält sich weitgehend analog.

Noch deutlicher sind diese Veränderungen in den Nierenmitochondrien nachzuweisen (Abb. 7 b). Auch hier findet man nach etwa 30 Tagen ein Maximum der mit Thiaminpyrophosphat aktivierbaren Atmung, danach fällt der O_2 -Verbrauch und damit auch der P/O-Quotient sehr stark ab und ist mit Thiaminpyrophosphat nicht mehr zu aktivieren. Auch aus diesen Befunden und früheren Aktivitätsmessungen der Pyruvatedehydrogenase folgt, daß ein *in vitro irreversibler Aktivitätsverlust der Pyruvatedehydrogenase bzw. Pyruvatdecarboxylase* vorliegen muß. Eine durch

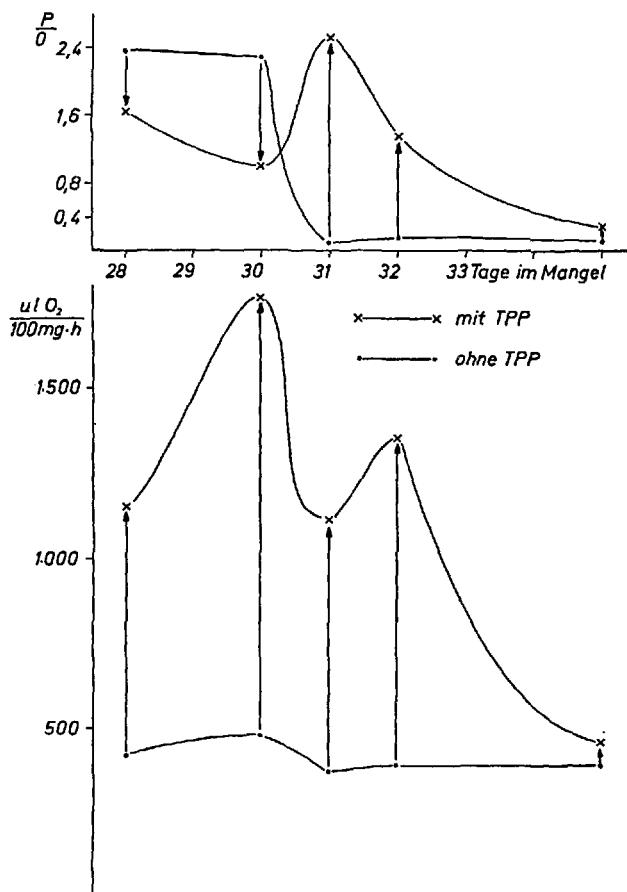


Abb. 7 a.

Abb. 7. O_2 -Verbrauch und P/O-Quotient in der terminalen Phase des Thiaminmangels. Der Abbau von Pyruvat ist in der terminalen Phase mit Thiaminpyrophosphat nicht aktivierbar, der P/O-Quotient fällt ab. a) Lebermitochondrien, b) Nierenmitochondrien.

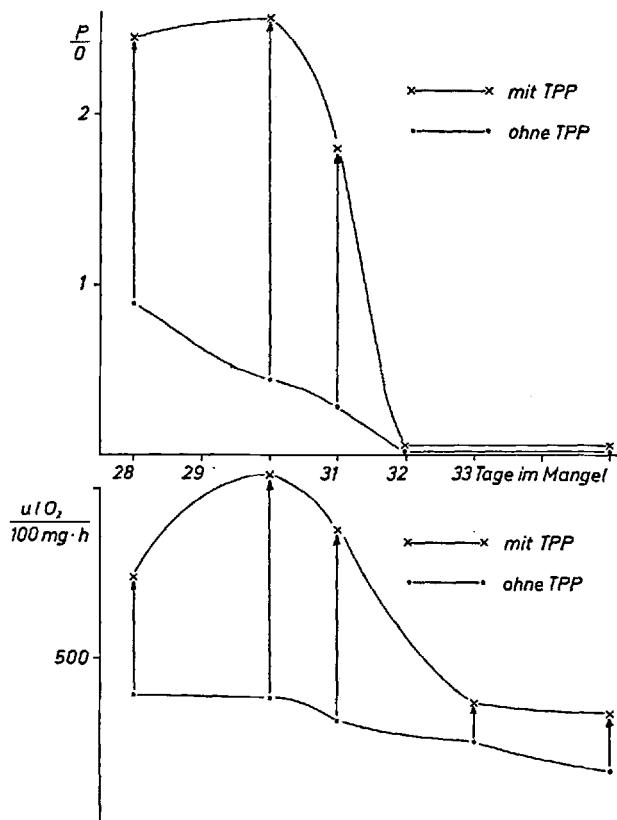


Abb. 7b.

Interkonvertierung bedingte Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes konnte ausgeschlossen werden, da auch mit 10 mM Magnesiumchlorid und 0,5 mM Thiaminpyrophosphat keine Steigerung der Aktivität mehr zu erreichen war. Auch hier hatten zyklisches 3',5'-AMP bzw. Dibutyryl-3',5'-AMP keinerlei Einfluß. Zugabe von Extrakten aus Normaltiermitochondrien hatten an intakten Mitochondrien keinen zusätzlichen aktivierenden Effekt auf die Atmung und in aufgeschlossenen Mitochondrien auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in diesem Stadium. Auch eine Supplementierung mit Pyruvatdehydrogenase-phosphatase aus Schweineherzmuskel blieb in beiden Versuchsanordnungen ohne Erfolg.

Diskussion

In den Untersuchungen von Gubler (1961) und Arcos et al. (1964) änderte sich der P/O-Quotient in Herzmuskelmitochondrien auch über 8 Wochen Thiaminmangel nicht. In unseren Untersuchungen fällt im terminalen Stadium des Mangelzustandes der P/O-Quotient in Leber und Niere auf 0,2 ab. Diese Differenzen sind auf die Schwere des Mangelzustandes zurückzuführen, denn während Arcos et al. (1964) den Thiaminmangelzustand über 10 Wochen aufrechterhalten konnten, überleben in unseren

Versuchen die Tiere einen Thiaminmangel von 35 Tagen nicht. Weiterhin wurde die Atmung in einem Teil unserer Untersuchungen mit Pyruvat bzw. α -Ketoglutarat als alleiniges Substrat durchgeführt, während Arcos et al. (1964) dem Ansatz 2 μ M Fumarat zusetzen. In unseren Versuchen führte Malat bei Normaltieren zu keiner wesentlichen Steigerung der Atmung. Die mitochondriale Atmung mit anderen Substraten war im Thiaminmangel nicht vermindert, ebensowenig die Aktivität der thiaminunabhängigen Enzyme der Mitochondrien (Blum 1969, Wu et al. 1971, Reinauer et al. 1971).

Der gemessene Sauerstoffverbrauch in den isolierten Mitochondrien entspricht annähernd der gemessenen Pyruvat- bzw. α -Ketoglutaratdehydrogenaseaktivität in isolierten Mitochondrien (42 μ Mole/100 mg/h bzw. 52 μ Mole/100 mg/h). Die gefundene Differenz ist vermutlich durch die unterschiedliche Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase infolge Interkonvertierung bedingt.

Das zentrale Problem der vorliegenden Arbeit ist die Frage, wodurch der Abfall der Pyruvatatmung bzw. der Pyruvatdehydrogenaseaktivität im terminalen Stadium des Thiaminmangels bedingt ist.

Im Vordergrund des Thiaminmangelschadens steht der Mangel an Thiaminpyrophosphat, wodurch der Abbau von Pyruvat im Stadium III und IV auf 30 bzw. 40 % des Ausgangswertes vermindert und durch In-vitro-Zugabe von Thiaminpyrophosphat über die Kontrollwerte hinaus reaktiviert wird. Diese Aktivitätsminderung ist also in dieser Phase reversibel. Die über die Norm erhöhte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase wird durch eine Vermehrung der aktiven Pyruvatdehydrogenaseform (PDH_a) erklärt.

Die Frage nach einer intakten Interkonvertierung der Pyruvatdehydrogenase im Thiaminmangel ist schwieriger zu beantworten. Die regulatorische Interkonvertierung der Pyruvatdehydrogenase wird durch den Mangel an katalytisch wirksamem Enzym (Mangel an TPP) einseitig im Sinne einer Aktivitätssteigerung verschoben. Durch den Rückgang des Pyruvatabbaues staut sich Pyruvat an (Gubler 1968, McCandless et al. 1970, Paquet et al. 1970) und der ATP-Gehalt in der Zelle fällt ab (McCandless et al. 1970). Diese beiden Faktoren können die inaktive Form des Enzyms in die aktive überführen, so daß eine weitere In-vitro-Aktivierung durch Magnesiumionen nur noch in der Leber (um 23 %) möglich ist. In Herzmuskel und Niere sinkt die Aktivität des Enzyms nach Vorinkubation mit 10 mM Magnesiumionen sogar ab. Offenbar mißt man im Gesamthomogenat stets eine Resultante zwischen Aktivierung durch Dephosphorylierung und einer Inaktivierung (Abbau? Denaturierung?).

In der terminalen Phase des Stadiums IV fehlt eine volle Reaktivierung der Pyruvatdehydrogenase durch Thiaminpyrophosphat und Magnesiumionen, so daß hier ein Enzymdefekt innerhalb des Pyruvatdehydrogenasekomplexes angenommen werden muß, sei es, daß die Pyruvatdecarboxylase fehlt oder aber die Pyruvatdecarboxylase-phosphatase inaktiviert ist. In dieser Phase sinkt auch der P/O-Quotient auf minimale Werte ab und läßt sich nicht mehr reaktivieren. Zugabe von Mitochondrienextrakten aus Normaltieren zu Mitochondrienextrakten aus Mangeltierorganen konnte eine Reaktivierung der Pyruvatdehydrogenase nicht erreichen, so daß ein

einseitiger Ausfall der Pyruvatdecarboxylase-phosphatase nicht anzunehmen ist. In den Aktivitätsmessungen am Gesamthomogenat und auch in aufgeschlossenen Mitochondrien hatte der Zusatz eines Extraktes aus normalen Mitochondrien bzw. eine reine PDH-phosphatase keinen Effekt. Aus den Befunden wird daher gefolgert, daß im terminalen Mangelzustand das Apoenzym der Pyruvatdecarboxylase in einer anderen Weise inaktiviert oder aber abgebaut ist. Hier könnten die Befunde von Katunuma et al. (1971) eine Erklärung liefern, in denen ein einseitiger Abbau des coenzymfreien Apoenzyms der Transaminasen in den Organen von Vitamin-B₆-Mangeltieren nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassung

In isolierten Mitochondrien aus den Organen von Normal- und Mangeltieren wurde der Abbau von Pyruvat und α -Ketoglutarat gemessen. Der P/O-Quotient beträgt bei Normaltieren mit Pyruvat als Substrat 2,4 bis 2,6, mit α -Ketoglutarat 2,1 bis 2,8. Die endogene Atmung nimmt im Verlauf des Thiaminmangels zu.

In Mangeltiermitochondrien geht in Abhängigkeit von der Schwere des Thiaminmangels der Sauerstoffverbrauch zurück, kann aber durch In-vitro-Zugabe von Thiaminpyrophosphat über die Kontrollwerte hinaus reaktiviert werden. Diese Reaktivierung fehlt im terminalen Stadium des Mangelzustandes und kann durch Zugabe von Extrakten aus normalen Mitochondrien nicht bewirkt werden. Der P/O-Quotient der Mitochondrien sinkt in der terminalen Phase des Thiaminmangels irreversibel auf 0,2 ab. Aus den Befunden wird auf eine Schädigung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes im schweren Thiaminmangel geschlossen. Eine Inaktivierung des Enzymkomplexes durch Interkonvertierung liegt nicht vor.

Literatur

- Arcos, J. C., M. F. Argus, V. M. Sardesai, R. E. Stacey, Biochemistry* **3**, 2041–2045 (1964). – *Bózner, A., H.-J. Knieriem, H. Meessen, H. Reinauer, Virchows Arch., Abt. B, Zellpathologie* **2**, 125–143 (1969). – *Blum, E. C., Enzymatische Studien zum Thiaminmangel bei der Ratte. Dissertation (Freiburg 1969)*. – *Bryla, J., Z. Kaniuga, B. Frackowiak, Biochim. Biophys. Acta* **143**, 285–291 (1967). – *Gubler, C. J., Internat. Z. Vit. Forschung* **38**, 287–303 (1968). – *Gubler, C. J., J. biol. Chemistry* **236**, 3112–3120 (1961). – *Hogeboom, G. H., W. C. Schneider, G. E. Palade, J. biol. Chem.* **172**, 619 (1948). – *Hohorst, H. J., In: H.-U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 134 (Weinheim 1962)*. – *Jennings, R. B., P. B. Herdson, M. L. Hill, Lab. Invest.* **20**, 537–547 (1969). – *Katunuma, N., E. Kominami, S. Kominami, K. Kito, Advances in Enzyme Regulation* **10** (1971). – *Linn, T. C., F. H. Pettit, L. J. Reed, Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, 234–241 (1969). – *McCandless, D. W., C. Hanson, K. V. Speeg Jr., S. Schenker, J. Nutrition* **100**, 991–1002 (1970). – *Minnaert, K., Biochim. Biophys. Acta* **44**, 595–597 (1960). – *Paquet, R. J., M. A. Mehlman, R. B. Tobin, E. M. Sporn, J. Nutrition* **100**, 1407–1414 (1970). – *Reinauer, H., Habilitationsschrift (Düsseldorf 1968)*. – *Reinauer, H., G. Grassow, S. Hollmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **349**, 969–978 (1968). – *Reinauer, H., S. Hollmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 40–50 (1969). – *Reinauer, H., S. Hollmann, Beitrag zur Protein- und Nuklein-säuresynthese im Thiaminmangel. Wintertag. Ges. Biol. Chemie, Freiburg (1969)*. – *Reinauer, H., W. Janssen, S. Hollmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **352**, 125–131 (1971). – *Slater, E. C., Biochem. J.* **53**, 521–530 (1952). – *Schneider, W. C., J. biol. Chemistry* **176**, 259 (1948). – *Stuart, S. C., G. R. Williams, Biochemistry* **5**, 3912–3919 (1966). – *Weinbach, E. C., J. biol. Chem.* **234**, 1580–1586 (1958). – *Wein-*

bach, E. C., J. biol. Chem. 236, 1526–1530 (1961). – Weinbach, E. C., Analyt. Biochem. 2, 335–343 (1961). – Wieland, O., E. Siess, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1160 (1969). – Wieland, O., E. Siess, Proc. Natl. Acad. Sci. 65, 947–954 (1970). – Wieland, O., E. Siess, F. H. Schulze-Wethmar, H. G. von Funcke, B. Winton, Arch. Biochem. Biophys. 143, 593–601 (1971). – Wu, B. C., M. F. Argus, J. C. Arcos, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 808–812 (1970). – Wu, B. C., R. T. Valle, L. E. White, R. S. Sohal, J. C. Arcos, M. F. Argus, G. E. Burch, Virch. Arch. Abt. B. Zellpathologie 9, 97–114 (1971).

Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. H. Reinauer, Diabetes-Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf,
4000 Düsseldorf 1, Auf'm Hennekamp 65