

2,25 cm³ der wässrigen Lösung nach der Zersetzung des Ozonids, die nicht zum Brenztraubensäure-Nachweis verbraucht worden waren, liess man zusammen mit 2 cm³ Perameisensäure 14 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das Reaktionsprodukt wurde dann in Äther aufgenommen und die ätherischen Auszüge mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Rückstand sublimierte man fraktioniert im Hochvakuum. Bei 38° liessen sich geringe Mengen öligere Anteile abtrennen, worauf bei 60—70° 1,2 mg einer kristallinen Säure vom Smp. 126—128° sublimierten. Auf Grund des IR.-Absorptionsspektrums und des Misch-Smp. sowie des papierchromatographischen Vergleichs mit einem authentischen Vergleichspräparat erwies sich diese als identisch mit der meso- α , α' -Dimethyl-glutarsäure (III).

Die Mikroanalysen wurden in unserem Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Dem Carboxy-lacton, C₁₀H₁₆O₄, das durch Oxydation der Antibiotica Narbomycin, Pikromycin und Methymycin mit Kaliumpermanganat entsteht, wurde auf Grund seiner Eigenschaften und Abbauergebnisse die Konstitution I zugewiesen.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

212. Reinigung von Coenzym A und Isolierung von reinem Dephospho-Coenzym A¹⁾

von Olga Brenner-Holzach, R. Adler und F. Leuthardt.

(25. VIII. 56.)

Während unserer Arbeiten über die biologische Synthese und über die Spezifität von CoA²⁾ stellte sich das Problem, CoA von seinen Abbauprodukten (im Speziellen von Dephospho-CoA) zu trennen.

Als erste Methode wählten wir die Papierchromatographie. Mit Filterpapier *Whatman* Nr. 1 und 1-proz. Natriumacetat/Propanol 1:1 als mobile Phase konnte im aufsteigenden Chromatogramm eine gute Trennung der reduzierten und oxydierten Form des CoA und Dephospho-CoA erhalten werden. Die Betrachtung des Chromatogramms im UV. lässt die adeninhaltigen Produkte erkennen; die Entwicklung mit Ammonmolybdat zeigte die phosphathaltigen Verbindungen, diejenige mit Nitroprussidnatrium das Vorhandensein von SH-Verbindungen an.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* durchgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

Es werden folgende Abkürzungen verwendet: CoA = Coenzym A, Dephospho-CoA = Dephospho-Coenzym A, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat.

²⁾ Siehe nachfolgende Arbeit: *Olga Brenner-Holzach & F. Leuthardt*, *Helv.* **39**, 1796 (1956).

Die Papierchromatographie eignet sich für die Aufarbeitung grösserer Mengen Materials nicht; ausserdem ergeben sich bei Verwendung von Organextrakten Störungen („tailing“). Aus diesen Gründen gingen wir daran, CoA und seine Abbauprodukte an einer Ionenaustauscherkolonne zu trennen.

In der Literatur sind einige wenige Arbeiten über Säulenchromatographie von CoA beschrieben: *Beinert* und Mitarb.³⁾ benutzten die Chromatographie an Dowex 50 im Zusammenhang mit einer Reinigung von CoA aus Hefe zur Trennung von CoA und Glutathion. *Basford & Huennekens*⁴⁾ chromatographierten käufliches CoA in einer Säule von Zellulose („Solka flocc paper pulp“) mit 70-proz. Alkohol und konnten auf diese Weise mehrere aktive Formen des CoA voneinander trennen. *Stadtman & Kornberg*⁵⁾ reinigten einen CoA-Extrakt aus Hefe mittels Chromatographie an Dowex I. Sie eluierten mit einem Gemisch von Ameisensäure-Formiat, adsorbierten nachher das CoA an Kohle und eluierten es mit Aceton. Sie erreichten dabei eine Reinheit des CoA von 50–65%.

Unsere Versuche basieren auf den Arbeiten von *Hurlbert* und Mitarb.⁶⁾, welche die Nucleotide der Leber an einer Kolonne von Dowex 1 mit Ameisensäure-Ammoniumformiat-Mischungen bei kontinuierlicher Änderung der Konzentration des Elutionsmittels (sog. „Gradient“-Methode) trennten. Wir verwendeten eine Säule von Dowex 1, und zwar erwies sich für unsere Zwecke ein Produkt mit niederem „cross linking“, d. h. mit hoher Porosität, als günstig. Wahrscheinlich werden in einem solchen Produkt die grossen Molekeln leichter ausgetauscht. Zur Elution benutzten wir Gemische von Essigsäure und Ammoniumacetat, da sich das letztere durch Sublimation im Vakuum leichter entfernen lässt als das von *Hurlbert* und Mitarb. verwendete Ammoniumformiat. Die Konzentration der Essigsäure wurde konstant gehalten (4-n.), diejenige des Acetats stieg kontinuierlich an (von 0 bis 1-n.).

Reinigung von CoA.

Um für die nachfolgenden Versuche des CoA-Abbaus mit Phosphatase von reinem CoA ausgehen zu können, chromatographierten wir als erstes das für alle unsere Versuche verwendete CoA *Pabst* (siehe Fig. 1).

Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass das CoA nicht einheitlich ist. Es lassen sich 5–6 verschiedene Gipfel unterscheiden. Um beurteilen zu können, ob diese Produkte schon im ursprünglichen Präparat vorhanden sind oder erst während der Chromatographie

³⁾ *H. Beinert* u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. **74**, 854 (1952).

⁴⁾ *R. E. Basford & F. M. Huennekens*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3878 (1955).

⁵⁾ *E. R. Stadtman & A. Kornberg*, J. biol. Chemistry **203**, 47 (1953).

⁶⁾ *R. B. Hurlbert* u. Mitarb., J. biol. Chemistry **209**, 23 (1954).

entstehen, wurde die Hauptfraktion (die, wie wir später zeigen, reduziertes CoA ist) mittels Lyophilisation zur Trockne gebracht und auf gleiche Weise wieder chromatographiert. Aus Fig. 2 lässt sich entnehmen, dass CoA in der Kolonne nicht verändert wird, dass also die verschiedenen kleinen Gipfel im Chromatogramm des CoA *Pabst* vorgebildeten Produkten entsprechen.

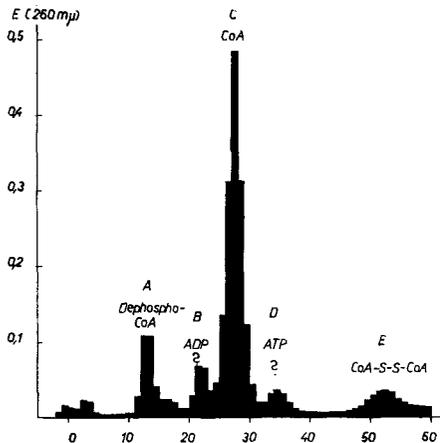


Fig. 1.

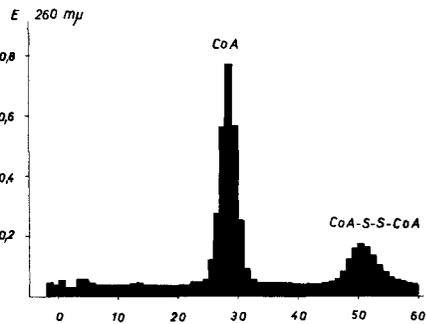


Fig. 2.

Zur Identifizierung der verschiedenen Komponenten des CoA *Pabst* (Fig. 1) wurden alle Fraktionen lyophilisiert und nach folgenden Methoden untersucht: 1. Katalyse der Oxydation von Ketoglutar-säure (optischer Test)⁷⁾, 2. Acetylierung von p-Aminoazobenzol⁸⁾, 3. Gehalt an Phosphat⁹⁾, 4. SH-Gruppen-Bestimmung¹⁰⁾.

Die Oxydation von Ketoglutar-säure wird durch CoA katalysiert. Dabei ist nur das vollständige CoA wirksam, Dephospho-CoA und kleinere Bruchstücke sind inaktiv. Die Acetylierung von p-Aminoazobenzol in Taubenleberextrakt erfolgt nicht nur in Gegenwart von CoA, auch Dephospho-CoA und Phosphopantethin zeigen dieselbe Aktivität (vgl. nachfolgende Arbeit²⁾).

Die Untersuchungen mit den vier Bestimmungsmethoden ergaben die in Tabelle 1 zusammengestellten Resultate. Es wurden alle Analysen auf die Extinktion bei 260 $m\mu$, d. h. auf den Adeningehalt bezogen.

Anhand der erhaltenen Versuchsergebnisse ergibt sich folgende Identifizierung der einzelnen Fraktionen: Die Komponente A ist reduziertes Dephospho-CoA, die Komponenten C und E sind die reduzierte bzw. die oxydierte Form des CoA. Die Zusammensetzung der

⁷⁾ R. W. Von Korff, J. biol. Chemistry **200**, 401 (1953).

⁸⁾ N. O. Kaplan & F. Lipmann, J. biol. Chemistry **174**, 37 (1948).

⁹⁾ J. Berenblum & E. Chain, Biochem. J. **32**, 295 (1938).

¹⁰⁾ R. R. Grunert & P. H. Phillips, Arch. Biochemistry **30**, 217 (1951).

Komponenten B und D ist noch nicht vollständig sichergestellt, es dürfte sich jedoch vermutlich um ADP und ATP handeln, wobei die geringe Aktivität im optischen und im Acetylierungs-Test durch unvollständige Trennung von der eng benachbarten Hauptfraktion des CoA bedingt sein kann.

Tabelle 1.

Analyse der Fraktionen A—E [Chromatogramm Fig. 1].
(Alle Zahlen sind Mittelwerte von 2–3 Bestimmungen).

Fraktion	Anteil der versch. Frakt. im CoA <i>Pabst</i>	Opt. Test, Aktivität CoA = 100	Acetylierungstest Aktivität CoA = 100	Total-Phosphat in Mol.		SH-	-S-S-	Verbindung
				gef.	theor.			
A	11%	1%	98%	2,2	2	100%	—	red. Dephospho-CoA
B	8%	3%	19%	1,9	2	0%	0%	ADP?
C	65%	100%	100%	3,0	3	89%	—	red. CoA
D	5%	18%	32%	2,3	2	0%	0%	ATP?
E	9%	100%	97%	2,7	3	0%	93%	oxyd. CoA

Abbau von reinem CoA mit Phosphatase und Isolierung des reinen Dephospho-CoA.

Lyophilisiertes, reines CoA (Fraktion C) wurde mit Raygras-Phosphatase abgebaut und das Inkubationsgemisch in der oben beschriebenen Weise an Dowex 1 x⁴ getrennt. Wir erhielten dabei das in Fig. 3 dargestellte Chromatogramm.

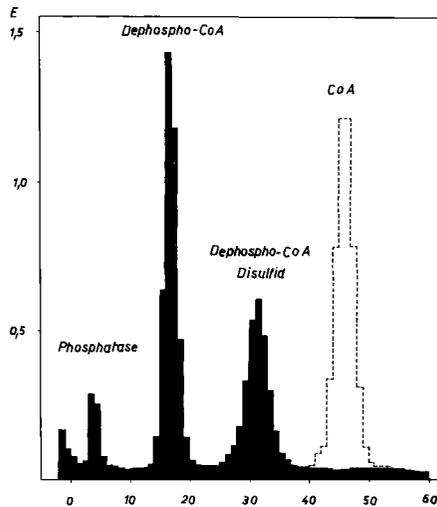


Fig. 3.

Die beiden mittels Gefriertrocknung isolierten Komponenten sind reduziertes bzw. oxydiertes Dephospho-CoA. Beide waren im optischen Test ohne Wirkung, im Acetylierungstest voll aktiv. Phosphatgruppen konnten zwei nachgewiesen werden. Eine positive Reaktion auf freie SH-Gruppen war beim reduzierten Dephospho-CoA sofort, bei der oxydierten Form nach Reduktion festzustellen. Der abgespaltene Phosphatrest läuft zusammen mit dem oxydierten Dephospho-CoA, er wurde als anorganisches Phosphat bestimmt. Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der ausgeführten Untersuchungen.

Tabelle 2.

Analyse der Fraktionen nach Abbau mit Raygrasphosphatase.
(Die Resultate sind Mittelwerte von 2-3 Bestimmungen.)

Fraktion	An- teil	Opt. Test	Ace- tyl- Test	Total-Phosph. in Mol.		Anorgan. Phosphat		SH- Grup- pen	S-S- Grup- pen
				gef.	theor.	gef.	theor.		
red. Dephos- pho-CoA	60%	0%	110%	3,2	2+1	1,2	1	87%	—
oxyd. Dephos- pho-CoA	40%	0%	111%	2,0	2	—	—	0%	97%

Der im Chromatogramm zuerst auftretende kleine Gipfel (Röhren 4/5) ist durch Bestandteile der rohen PhosphataseLösung bedingt.

Experimenteller Teil.

Verwendete Produkte: CoA ist ein käufliches Produkt der *Papst Laboratories*, Milwaukee, USA. Als Austauscher wurde Dowex 1 x⁴ (Dow Chemical Company, Midland, Michigan, USA.) verwendet. Es handelt sich um ein Produkt mit niedrigem (4%) Vernetzungsgrad.

Chromatographie: Als Kolonne wurde eine Säule von Dowex 1 x⁴ in der Acetatform mit einer Länge von ca. 4 cm und einem Querschnitt von 2,25 cm² verwendet. Die Säule wurde vor den Versuchen mit 600 ml eines Gemisches, enthaltend 4-n. Ammoniumacetat und 2-n. Essigsäure chlorfrei gewaschen. Dann folgte eine Behandlung mit 300 ml 80-proz. Essigsäure und anschliessend mit 600 ml Wasser. Schliesslich wurden ca. 300 ml 4-n. Essigsäure entsprechend der Ausgangskonzentration für die Elution durch die Säule filtriert.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in möglichst wenig Wasser aufgenommen, mit dem 4—5fachen Volumen 4-n. Essigsäure verdünnt und unter leichtem Druck auf die Säule aufgezogen.

Zur Elution wurde die etwas modifizierte, von *Hurlbert* u. Mitarb. angegebene Apparatur verwendet. Das Mischgefäss enthielt zu Beginn 4-n. Essigsäure, das Reservoir 4-n. Essigsäure + 1-n. NH₄-Acetat, so dass während der Elution die Acetat-Konzentration im Mischgefäss kontinuierlich anstieg. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug etwa 8 ml/10 Min. bei einem Überdruck von ca. 10 cm Wassersäule. Es wurde der G.M.E.-Fraction Collector (*Gilson Medical Electronics*, Madison, USA.) verwendet, der auf 8 ml pro Fraktion eingestellt war. Die adeninhaltigen Produkte in den Fraktionen wurden durch Messung der Extinktion bei 260 m μ bestimmt.

Bei Durchführung des optischen Tests im lyophilisierten und vom Ammoniumacetat befreiten Eluat traten selbst bei Verwendung reiner Produkte Aktivitätsverluste auf. Es

konnte nachgewiesen werden, dass die Ursache für diese Störungen in den im Ammoniumacetat vorhandenen minimalen Mengen Schwermetallkationen zu suchen ist, welche bei der Trocknung auf ein Vielfaches konzentriert werden. Daher wurden alle Essigsäure-Acetat-Gemische aus destillierter Essigsäure und frisch destilliertem Ammoniak hergestellt.

Aufarbeitung der chromatographierten Substanzen. Von jedem Gipfel des Chromatogramms wurden die 4—6 Fraktionen mit den höchsten Extinktionen zur Entfernung der Essigsäure der Lyophilisation unterworfen. (Das bei -30° gefrorene Gemisch taut während der Destillation bald auf, da die Verdampfungswärme der Essigsäure zu klein ist, um die Lösung im gefrorenen Zustand zu erhalten.) Das Ammoniumacetat sublimiert meist schon bei Zimmertemperatur, sicher aber bei leichtem Erwärmen (auf ca. 45°) vollständig weg. Die trockenen Proben wurden in wenig Wasser gelöst. Die Extinktionsmessung bei 260μ ergab die Menge des darin enthaltenen CoA oder CoA-Abbauproduktes und diente uns als Berechnungsgrundlage für die Aktivitätsprüfungen im optischen Test, im Acetylierungstest und für die SH-, S-S- und Phosphatbestimmungen.

Abbau von CoA mit Raygras-Phosphatase: Die spezifisch auf den Phosphatrest in Stellung 3' der Ribotide eingestellte b-Nucleotidase wurde nach *Shuster & Kaplan*¹¹⁾ aus keimendem englischen Raygras (*Lolium perenne L.*) extrahiert und durch Ammoniumsulfatfraktionierung und Adsorption an Tonerde C γ und Calcium-Phosphatgel gereinigt.

Der Abbau von CoA zu Dephospho-CoA erfolgte durch Inkubation von 4—5 mg des chromatographisch gereinigten CoA mit 1 ml Raygras-Phosphatase, 1 ml 0,1-m. Trispuffer vom pH 7,5 und 0,8 ml 0,01-m. CaCl₂ während 30—40 Min. bei 38° . Das Gemisch wurde durch Erhitzen im siedenden Wasserbad während 4 Min. vom Eiweiss befreit.

Enzymatische Methoden: Zur Bestimmung der Aktivität des CoA und seiner Abbauprodukte wurden a) die Oxydation der α -Ketoglutar säure und b) die Acetylierung des p-Aminoazobenzols verwendet.

a) *Optischer Test nach Von Korff*⁷⁾. Die Ketoglutar säureoxydase und die Succinyl-CoA-Desacylase extrahierten wir aus Schweinsherz, die Oxydase nach *Sanadi & Littlefield*¹²⁾, die Desacylase nach *Gergely* und Mitarb.¹³⁾. Der optische Test wurde nach *Von Korff*⁷⁾ mit einigen kleinen Modifikationen ausgeführt¹⁴⁾.

b) *Acetylierungstest*. Der als Enzymlösung dienende Taubenleberextrakt wurde nach *Kaplan & Lipmann*⁸⁾ aus Acetontrockenpulver hergestellt. Der Acetylierungstest wurde nach *Handschumacher*¹⁵⁾ mit einigen Modifikationen¹⁴⁾ ausgeführt.

SH- und S-S-Bestimmung: Die SH-Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Nitroprussidnatrium-Reaktion nach *Grunert & Phillips*¹⁰⁾ mit einigen Modifikationen. Die Ansätze enthielten 0,5—1 ml unbekannte Lösung, 2,0—2,5 ml ges. NaCl-Lösung, ca. 1 mg Komplexon, 0,5 ml 1,5-m. Na₂CO₃/0,1-m. Komplexon, 0,5 ml 2-proz. Nitroprussidnatrium. Eine Standardkurve mit Cystein-HCl (100 γ /ml) diente als Basis für die Berechnung der vorhandenen SH-Gruppen.

Die Bestimmung der Disulfidform des CoA wurde in der gleichen Weise ausgeführt, nach vorheriger Reduktion mit naszierendem Wasserstoff (Zn/Sn/HCl), Neutralisation mit wenig NaOH und Bindung des aufgelösten Schwermetalls durch Komplexon.

Phosphatbestimmung: Das anorganische Phosphat wurde direkt nach der Methode von *Berenblum & Chain* bestimmt⁹⁾. Zur Freisetzung des organisch gebundenen Phosphats wurde 0,1—1 ml der unbekanntes Lösung mit 1 ml 60-proz. Perchlorsäure 4—5 Min. zum Kochen erhitzt, nach dem Abkühlen mit 3 Tropfen H₂O₂ versetzt und nochmals 2—3 Minuten erhitzt. In einem aliquoten Teil der auf 5 ml verdünnten Lösung wurde die Summe des anorganischen und organischen Phosphats kolorimetrisch bestimmt.

¹¹⁾ *L. Shuster & N. O. Kaplan*, J. biol. Chemistry **201**, 535 (1953).

¹²⁾ *D. R. Sanadi, J. W. Littlefield & R. M. Bock*, J. biol. Chemistry **197**, 851 (1952).

¹³⁾ *J. Gergely, P. Hele & C. V. Ramakrishnan*, J. biol. Chemistry **198**, 323 (1952).

¹⁴⁾ *O. Brenner-Holzach & J. Raaflaub*, Helv. **39**, 863 (1956).

¹⁵⁾ *R. E. Handschumacher, G. C. Mueller & F. M. Strong*, J. biol. Chemistry **189**, 335 (1951).

SUMMARY.

CoA (*Pabst Laboratories*, Milwaukee) was purified by chromatography on Dowex 1 columns. To obtain a good separation from the byproducts it is essential to use a resin of a low cross-linking (4%).

The commercial product contains, besides reduced CoA as the main fraction, oxidized CoA, dephospho CoA and two further nucleotides, probably ADP and ATP. Pure CoA was prepared by rechromatographing the main fraction.

Pure dephospho CoA has been obtained by treating CoA with rye grass phosphatase and chromatographical separation of the products.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

213. Über die Spezifität des Coenzym A¹⁾

von Olga Brenner-Holzach und F. Leuthardt.

(25. VIII. 56.)

Bei allen Coenzymen stellt sich die Frage, welche Bedeutung die einzelnen Molekülteile für ihre Reaktionsfähigkeit haben. Meist ist es nur eine spezielle Gruppe in einer relativ komplexen Molekel, welche direkt an der enzymatischen Reaktion beteiligt ist. Wir wissen aber auch, dass oft eine geringfügige Veränderung der Molekel, welche die reagierende Gruppe gar nicht zu betreffen braucht, zur Aufhebung der Reaktionsfähigkeit genügt oder das Coenzym sogar in einen Hemmstoff der Reaktion verwandelt. Man hat schon wiederholt versucht, gewisse Coenzyme durch kleinere Molekeln mit der gleichen Wirkungsgruppe zu ersetzen. *Kunz & Leuthardt*²⁾ konnten nachweisen, dass die Lebermitochondrien bei Blockierung des vorhandenen CoA durch SH-Reagentien aus Benzoylpantethein und Glykokoll Hippursäure bilden können. Sie mussten allerdings, um die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit wie mit CoA zu erhalten, eine ungefähr hundertfache Menge an Benzoylpantethein einsetzen. Das für die Einführung der Benzoylgruppe in das Glykokoll verantwortliche Enzym besitzt also eine weit grössere Affinität zum Benzoyl-CoA als zum Benzoyl-Pantethein.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* durchgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

Verwendete Abkürzungen: CoA = Coenzym A, Dephospho-CoA = Dephospho-Coenzym A, DPN = Diphosphopyridinnucleotid, TPN = Triphosphopyridinnucleotid, ATP = Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PP = Pyrophosphat, AAB = p-Aminoazobenzol.

²⁾ *H. Kunz & F. Leuthardt*, *Helv. physiol. pharm. Acta* **13**, 60 (1955).