

# Acetyl-Coenzym A und andere S-Acyl-Verbindungen bei der Energieausnützung in der lebenden Zelle

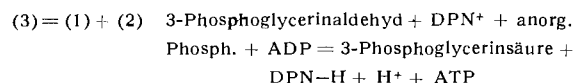
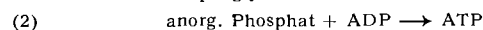
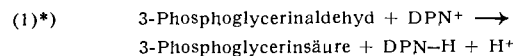
Von Dr. H. HOLZER, München

Chemisches Institut der Universität München, Biochemische Abteilung

Das energiereiche Primärprodukt der Brenztraubensäure-Oxydation („aktivierte Essigsäure“) ist als S-Acetyl-Verbindung des Coenzym A erkannt worden. Eine Reihe von Beobachtungen spricht dafür, daß auch bei der dehydrierenden Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutar Säure und bei der Triosephosphat-Dehydrierung primär S-Acyl-Bindungen aufgebaut werden. Der Energieinhalt dieser Bindungen wird zur Synthese von Adenosintriphosphat aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat ausgenutzt. Die Bedeutung dieser Befunde im Hinblick auf die Mechanismen der Energieausnützung bei der Kohlenhydratoxydation wird besprochen.

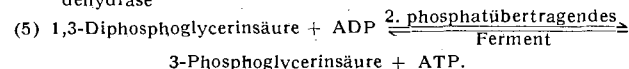
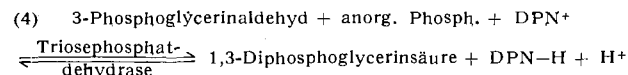
Seit etwa 15 Jahren gewinnt die thermodynamische Betrachtung der Reaktionsfolgen in der Zelle immer mehr Bedeutung. Wir verdanken diesen Überlegungen ein tiefgehendes Verständnis für das Wechselspiel von Synthese und Abbau in der lebenden Zelle. Weiterhin besteht ein gewichtiges, heuristisches Moment der Anwendung von thermodynamischen Gesichtspunkten in der Möglichkeit, die Gleichgewichtslage einer enzymatisch katalysierten Reaktion vorherzusagen und energetisch nicht mögliche Reaktionswege bei Arbeitshypothesen auszuschließen.

Erste Einblicke in die Koppelung einer Energie liefernden und Energie verbrauchenden Reaktion gewann O. Meyerhof<sup>1)</sup> beim Studium der Triosephosphat-Dehydrierung. Hier ist die mit Freisetzung von Energie verbundene Dehydrierung eines Aldehyds (Reaktion 1) in einem stöchiometrischen Verhältnis gekoppelt mit der Energie benötigenden Synthese von Adenosin-triphosphorsäure (ATP) aus Adenosin-diphosphorsäure (ADP) und anorganischem Phosphat (Reaktion 2). Die experimentell beobachtete Bilanzreaktion ist in Gleichung (3) wiedergegeben.



\*) DPN<sup>+</sup> = oxydierte Form von Diphospho-pyridinnucleotid (Codehydrase I); DPN-H + H<sup>+</sup> = reduzierte Form von Diphospho-pyridinnucleotid.

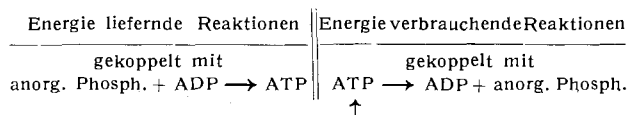
Die Aufklärung des chemischen Zusammenhanges beider Reaktionen brachten Untersuchungen von Warburg<sup>2)</sup> und Bücher<sup>3)</sup>. Mit den isolierten, kristallisierten Fermenten konnte der Reaktionsmechanismus wie folgt formuliert werden:



Damit war eine grundlegende Erkenntnis gewonnen: die energetische Koppelung von Reaktionen wird in der lebenden Zelle durch Energiespeicherung in chemischer Form ermöglicht. Die Zelle umgeht demnach die mit Energieverlusten verknüpfte Transformierung von chemischer Energie in Wärmeenergie, elektrische Energie

usw., wie dies der Techniker tut, wenn er beispielsweise das energiereiche System Kohle und Sauerstoff zur Synthese des energiereichen Wasserstoffsuperoxyds aus Wasser und Sauerstoff ausnützt. Hierzu wird mit Kohle und Sauerstoff Wärme erzeugt, diese in mechanische und schließlich elektrische Energie übergeführt und zur „Synthese“ von Wasserstoffsuperoxyd durch anodische Oxydation benützt.

Es hat sich gezeigt, daß das Adenylsäure-System nicht nur bei der Triosephosphat-Dehydrierung zur Energiekonservierung dient. Ganz allgemein können wir heute die biologischen Reaktionen vom energetischen Gesichtspunkt in 2 Klassen einteilen (4):



Das Adenosintriphosphat spielt hierbei die Rolle des Energietransporteurs. Es diffundiert von den Stellen der Erzeugung zu den Verbrauchsorten.

Noch allgemeiner kann man das durch ATP vermittelte Ineinandergreifen von Dissimilation (Energie liefernde Reaktionen) und Assimilation (Energie verbrauchende Synthesen) durch die Gleichung kennzeichnen (s. Kalckar<sup>4)</sup>)

$$|-\Delta F| \geq |+\Delta F|$$

(Dissimilation)                      (Assimilation)

wobei  $\Delta F$  den absoluten Betrag der freien Energie der beteiligten Reaktionsfolgen bedeutet und irreversible Energieverluste durch das Zeichen  $\geq$  berücksichtigt sind.

Bei heterotrophen Organismen bestehen die Energie liefernden Prozesse im Abbau von mit der Nahrung zugeführten organischen Substanzen. Die Hauptenergiequelle ist bei Säugetieren und bei einer großen Zahl anderer Lebewesen das Kohlenhydrat. In Bild 1 ist der Weg des oxydativen Abbaues von Glucose ausgehend skizziert, wobei nur die Reaktionsschritte aufgezeichnet wurden, bei welchen ein Energiegefälle besteht, das von der Zelle zur ATP-Synthese benützt wird.

Die beim Aufbau von ATP aus ADP neu erzeugte Pyrophosphat-Bindung enthält etwa 10,5 kcal/Mol<sup>5)</sup>. Man ersieht aus dem Schema, daß bei der völligen Oxydation von 1 Mol Glucose, wobei 686 kcal an freier Energie verfügbar werden, 38 Mole ATP synthetisiert werden können. Das heißt, die Zelle hat die Möglichkeit,  $38 \times 10,5 =$

<sup>1)</sup> O. Meyerhof, P. Ohlmeyer u. W. Möhle, Biochem. Z. 297, 90, 113 [1938].

<sup>2)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 303, 40 [1939].

<sup>3)</sup> Th. Bücher, Biochim. Biophys. Acta 1, 292 [1947].

<sup>4)</sup> Zusammenfassungen: H. M. Kalckar, Chem. Rev. 28, 71 [1941]; F. Lipmann, Adv. Enzymology 1, 99 [1941]; F. Lynen, Naturwiss. 30, 398 [1942]; Th. Bücher, diese Ztschr. 62, 256 [1950].

<sup>5)</sup> P. Oesper: Phosphorus Metabolism; Baltimore 1951; The Johns Hopkins Press, S. 525.

400 kcal, das sind etwa 60% der theoretisch möglichen Energie, in Form von für Synthesen verwertbarer ATP-Energie zu konservieren.

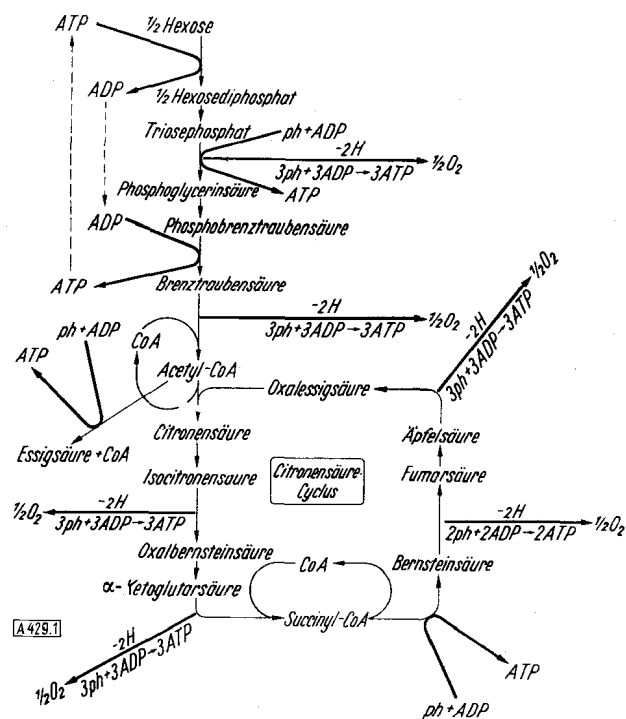


Bild 1  
ATP-Erzeugung bei der Kohlenhydratoxydation  
ph = anorganisches Phosphat, ADP = Adenosindiphosphat,  
ATP = Adenosintriphosphat, CoA = Coenzym A

### ATP-Erzeugung beim oxydativen Kohlenhydratabbau

Betrachtet man die einzelnen Reaktionsschritte näher, die mit der ATP-Synthese gekoppelt sind, so wird deutlich, daß es sich um zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen handelt.

Zur ersten Gruppe gehören Vorgänge, die unter aeroben und anaeroben Bedingungen ablaufen können. Bei den mit Dehydrierungen verknüpften Reaktionen dient unter aeroben Bedingungen Sauerstoff als Wasserstoff-acceptor, während unter anaeroben Bedingungen geeignete Substrate den Wasserstoff aufnehmen.

Folgende Reaktionsschritte sind beteiligt:

- 1) Triosephosphat-Dehydrierung
- 2) Phosphat-Übertragung von Phospho-brenztraubensäure auf Adenosin-diphosphat
- 3) Dehydrierende Decarboxylierung von Brenztraubensäure
- 4) Dehydrierende Decarboxylierung von α-Ketoglutarinsäure.

Kennzeichnend für die genannten Reaktionen ist, daß sie mit im Zuge des Abbaues stattfindenden Veränderungen an den Substraten obligatorisch gekoppelt sind, weshalb die Sammelbezeichnung „Substratphosphorylierungen“ zur Abgrenzung von der im folgenden zu besprechenden „Atmungskettenphosphorylierung“ eingeführt wurde<sup>6, 7)</sup>.

Der zweite zur ATP-Synthese befähigte Reaktionstypus ist die Übertragung des Wasserstoffs von den Dehydrasen über die Kette der an der Atmung beteiligten Fermente auf den Sauerstoff. Hierbei ist es belanglos, von welchem Substrat der Wasserstoff abgelöst wird. Über

den Chemismus dieser Reaktionskoppelung („Atmungskettenphosphorylierung“) ist bis heute nichts bekannt. Interessant ist aber, daß die ATP-Synthese nicht obligat mit der Wasserstoff-Übertragung durch die Fermentkette der Atmung verknüpft ist.

Die quantitative Bedeutung der Atmungskettenphosphorylierung ist wesentlich größer als die der Substratphosphorylierungen. Beim aeroben Kohlenhydratabbau fallen auf die Atmungskettenphosphorylierung 9/10 der in Form von ATP gewinnbaren Energie. Die Substratphosphorylierungen haben demnach unter aeroben Bedingungen nur eine untergeordnete Bedeutung. Für Anaerobier dagegen sind die Substratphosphorylierungen der einzige Reaktionsmechanismus, bei welchem ATP für synthetische Leistungen gewonnen werden kann.

Geht man von Glucose als Substrat aus (Bild 1), so kann die Erzeugung von ATP bei der Phosphat-Übertragung von Phospho-enol-brenztraubensäure auf ADP für den Energiegewinn der Zelle unberücksichtigt bleiben 2 Molekeln ATP pro Mol umgesetzter Glucose werden nämlich für die einleitenden Phosphorylierungen gebraucht und gehen damit für andere Energie verbrauchende Reaktionen verloren. Diese in Hexose-diphosphat festgelegten Phosphat-Gruppen treten bei der Phosphat-Übertragung von Phosphobrenztraubensäure wieder als Adenosin-triphosphat auf, und man kann sich vereinfachend vorstellen, daß es gerade diese beiden Molekeln ATP sind, die im Kreislauf wieder zur Hexosephosphorylierung benützt werden.

Für den Chemismus der Atmungskettenphosphorylierung bestehen nur Hypothesen. Dagegen haben die Arbeiten der letzten Jahre zu einer weitgehenden Aufklärung des Chemismus der Substratphosphorylierungen geführt. Im folgenden sollen diese Erkenntnisse besprochen werden.

### Dehydrierende Decarboxylierung von Brenztraubensäure

Das primäre Oxydationsprodukt der Brenztraubensäure steht seit langem im Brennpunkt des Interesses der Biochemiker. Von H. Wieland und seiner Schule begonnene Untersuchungen<sup>8)</sup> haben Anhaltspunkte dafür ergeben, daß es sich um eine Substanz handle, die mit Essigsäure zwar nicht identisch, aber ihr sehr nahe verwandt ist. F. Lynen<sup>9)</sup> hat deshalb die Bezeichnung „aktivierte Essigsäure“ vorgeschlagen, und C. Martius ist es endgültig gelungen, den direkten Übergang von Brenztraubensäure in „aktivierte Essigsäure“ zu demonstrieren<sup>10)</sup>. Insbesondere Isotopenversuche haben gezeigt, daß „aktivierte Essigsäure“ der Ausgangspunkt für die verschiedensten Synthesen in der Zelle ist.

Im Zusammenhang mit der Kohlenhydrat-Oxydation ist von besonderer Bedeutung, daß „aktivierte Essigsäure“ mit Oxalessigsäure die Synthese von Citronensäure ermöglicht. Auf diesem Wege wird der zur völligen Oxydation von Essigsäure führende Citronensäurecyclus eingeleitet.

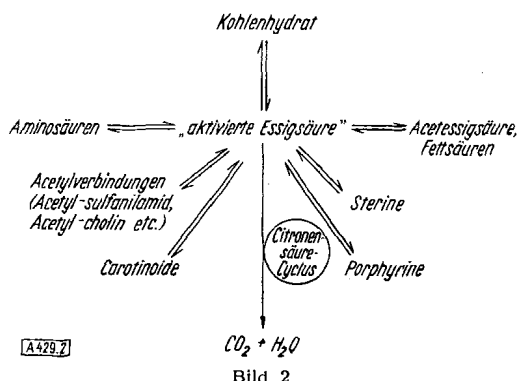
Da man seit den Untersuchungen von Meyerhof<sup>1)</sup> und Warburg<sup>2)</sup> die überragende Rolle der Phosphorsäure und ihrer Verbindungen für den Energiestoffwechsel kennt und andererseits die verschiedenen von „aktivierter Essigsäure“ ausgehenden Synthesen nur unter Energieverbrauch möglich sind, lag es am nächsten, in dieser Substanz ein energiereiches Derivat der Phosphorsäure zu vermuten. Hiervon

<sup>8)</sup> Zusammenfassende Darstellung: C. Martius u. F. Lynen, Adv. Enzymology 10, 167 [1950].

<sup>9)</sup> F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 552, 270 [1942].

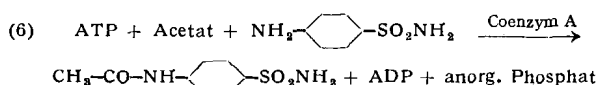
<sup>10)</sup> C. Martius, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 279, 96 [1943].

ausgehend hat *Lynen* bereits 1940<sup>11)</sup> Acetylphosphorsäure synthetisiert. Die Verbindung erwies sich aber im Stoffwechsel der Hefe und des tierischen Gewebes als völlig wirkungslos<sup>10, 12, 13)</sup>. Von *F. Lipmann*<sup>14)</sup>, *E. R. Stadtman* und *H. A. Barker*<sup>15)</sup> wurde zwar gezeigt, daß Acetylphosphat in gewissen Bakterien die Rolle der „aktivierten Essigsäure“ übernehmen kann, bzw. in diese übergehen kann, aber der Stoffwechsel dieser Bakterien blieb bezüglich der Verwertung von Acetylphosphat ein Sonderfall.



## Coenzym A

Einen wesentlichen Fortschritt erbrachten Studien von *D. Nachmansohn*<sup>16)</sup> über die Acetylierung von Cholin durch eine spezifische Proteinfraction aus Kaninchenhirn, sowie Untersuchungen von *F. Lipmann*<sup>17)</sup> über die durch Taubenleber katalysierte Acetylierung von Sulfanilamid. In beiden Fällen diente ATP als Energiedonator, und es konnte die Beteiligung eines neuen Coenzym nachgewiesen werden, das *F. Lipmann* Coenzym A nannte. Die Acetylierungsreaktion des Sulfanilamids wurde zu einem

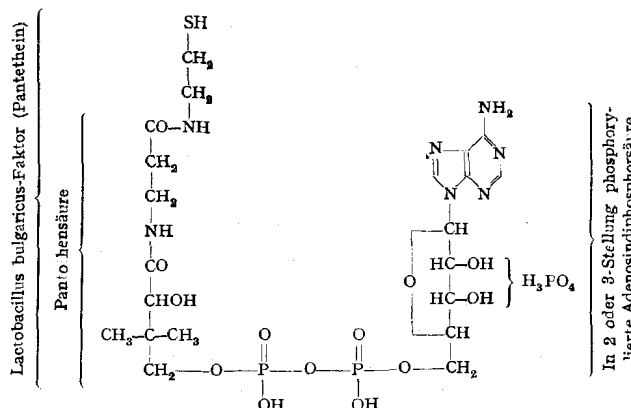


relativ einfachen Test für Coenzym A ausgearbeitet. Man führt das freie Sulfanilamid in einen Azofarbstoff über, dessen Konzentration ein Maß für die jeweils vorliegende Menge an nicht acetyliertem Sulfanilamid ist. Hierdurch kann die Kinetik der Acetylierungsreaktion erfaßt werden. Wählt man die Mengen der Reaktionspartner so, daß die Coenzym A-Konzentration unterhalb der Sättigung des wirksamen Proteins liegt, während die anderen Komponenten im Überschuß vorliegen, so wird die kolorimetrisch meßbare Geschwindigkeit der Reaktion ein Maß für die Konzentration an Coenzym A.

In der Folgezeit wurde die enge Beteiligung von Coenzym A an allen Reaktionen, die von „aktivierter Essigsäure“ ausgehen, immer deutlicher. *S. Ochoa*<sup>18)</sup> und *F. Lipmann*<sup>19)</sup> demonstrierten die Notwendigkeit von Coenzym A neben ATP für die Citronensäure-Synthese aus Essigsäure und Oxalessigsäure. *F. Lipmann*<sup>20)</sup> konnte den Übergang von Essigsäure in Acetessigsäure bei Einsatz von ATP und ka-

talytischen Mengen Coenzym A nachweisen. Die aus all diesen Versuchen zu ziehende Folgerung war, daß die „Kombination ATP + Acetat + Coenzym A sich im biologischen System wie „aktivierte Essigsäure“ verhält“<sup>21)</sup>.

Bei der überragenden Bedeutung des Coenzym A für eine Vielzahl von zentralen Stoffwechselreaktionen ist es verständlich, daß auch die Konstitution des Cofermentes eingehend bearbeitet wurde. *Lipmann*<sup>22)</sup> konnte Pantothenensäure, Adenosin, Phosphorsäure und eine Schwefelhaltige Amino-Verbindung als Bausteine sicherstellen. *Snell*<sup>23)</sup> und Mitarbeiter konnten die Identität von *Lactobacillus bulgaricus*-Faktor mit einem Bruchstück des Coenzym A beweisen und damit die genannte Schwefelhaltige Verbindung als Thioäthanolamin (Cysteamin) aufklären. Die zur Zeit wahrscheinlichste Konfiguration zeigt Formel 1.

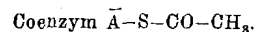


Coenzym A (nach *Novelli*, *Lipmann* u. Mitarb. u. *Baddiley* u. Mitarb. (s. Phosphorus Metabolism, Baltimore 1951, S. 205 u. 415)

Aus der Anordnung ist ersichtlich, daß es sich um eine Dinucleotid-ähnliche Struktur handelt. Die eine Komponente ist Adenylsäure, die andere das Thioäthanolamin-Derivat der phosphorylierten Pantothenensäure. Die Formel enthält aber noch Unsicherheiten, man wird zur endgültigen Klärung die Reindarstellung des Coenzym abwarten müssen<sup>23a)</sup>.

## „Aktivierte Essigsäure“ = Acetyl-Coenzym A

Im vorhergehenden Abschnitt ist der Stand unseres Wissens über das Problem der „aktivierten Essigsäure“ bis zum Jahre 1950 geschildert. Bei dieser Sachlage gelang *F. Lynen*<sup>21, 24)</sup> ein entscheidender Fortschritt, der die endgültige Lösung des Problems bedeutete. Zwar waren bereits die Arbeitskreise um *Ochoa* und *Lipmann* zu der Erkenntnis gekommen, daß die „aktivierte Essigsäure“ ein Acetyl-Derivat des Coenzym A darstelle, aber befangen durch die etwa 1940 angebrochene „Phosphorsäure-Ära“, hatte man die Wirkungsgruppe des Coenzym A in der Phosphorsäure gesucht. *F. Lynen*, dem erstmalig die Anreicherung von „aktivierter Essigsäure“ in Substanz gelang, zog die SH-Gruppe des Coenzym in Betracht und konnte beweisen, daß es sich bei der wirksamen Substanz um das am Schwefel acetylierte Coenzym A, also ein Acylmercaptan handle:



(Nach *Lynen*<sup>21)</sup> bezeichnet das Symbol CoA den Rest des Coenzym A ohne SH-Gruppe. Also:  $\text{CoA—SH} = \text{CoA}$ )

<sup>11)</sup> *F. Lynen*, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 367 [1940].  
<sup>12)</sup> *F. Lynen* u. *N. Naciullah*, vgl. *Naciullah*, Dissert. München 1941.  
<sup>13)</sup> *F. E. Hunter* u. *L. F. Leloir*, J. biol. Chemistry 159, 295 [1945].  
<sup>14)</sup> *F. Lipmann*, Adv. Enzymology 6, 231 [1946].  
<sup>15)</sup> *E. R. Stadtman* u. *H. A. Barker*, J. biol. Chemistry 174, 1039 [1946].  
<sup>16)</sup> *D. Nachmansohn* u. *A. L. Machado*, J. Neurophysiol. 6, 397 [1943]; *D. Nachmansohn* u. *M. Berman*, J. biol. Chemistry 165, 551 [1946].  
<sup>17)</sup> *F. Lipmann*, J. biol. Chemistry 160, 173 [1945]; *F. Lipmann* u. *N. O. Kaplan*, ebenda 162, 743 [1946].  
<sup>18)</sup> *J. R. Stern* u. *S. Ochoa*, ebenda 179, 491 [1949].  
<sup>19)</sup> *G. D. Novelli* u. *F. Lipmann*, ebenda 182, 213 [1950].  
<sup>20)</sup> *M. Soodak* u. *F. Lipmann*, ebenda 175, 999 [1948].

<sup>21)</sup> *F. Lynen*, *E. Reichert* u. *L. Rueff*, Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].

<sup>22)</sup> *F. Lipmann* u. Mitarb., J. biol. Chemistry 186, 235 [1950].

<sup>23)</sup> *E. E. Snell* u. Mitarb., J. Amer. Chem. Soc. 72, 5349 [1950].

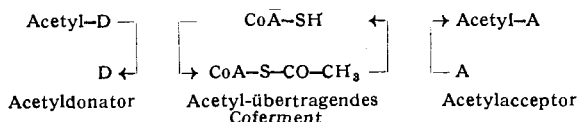
<sup>23a)</sup> Vor kurzem konnten *F. Lipmann* u. Mitarb. ein auf Grund von Formel 1 90%iges Präparat darstellen: J. Amer. Chem. Soc. 74, 854 [1952].

<sup>24)</sup> *F. Lynen* u. *E. Reichert*, diese Ztschr. 63, 47 [1951].

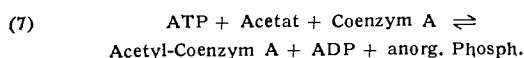
Die Anreicherung gelingt aus Alkohol oder Acetat oxydierender Hefe durch Extraktion mit Phenol, Fraktionierung der Ba-Salze und Adsorption an Kohle. Das erhaltene Präparat acetylierte Sulfanilamid ohne Zusatz von ATP und Acetat und war bei Ergänzung mit den spezifischen Proteinen zur direkten Acetylierung von Cholin<sup>25</sup>), sowie zur Acetylierung von Oxalessigsäure, wobei Citronensäure resultiert, befähigt<sup>26</sup>). Es bestand demnach kein Zweifel, daß die von *Lynen* angereicherte Fraktion „aktivierte Essigsäure“ enthielt. Die Bindung der aktiven Acetyl-Gruppe an die SH-Gruppe des Coenzym A konnte *Lynen* durch folgende Reaktionen sicherstellen:

- 1) die Substanz gibt nach Behandlung mit J<sub>2</sub> keine Nitroprussid-Reaktion, da sie keine freien SH-Gruppen enthält. Zusatz von konz. Ammoniak ergibt langsame Hydrolyse, und gleichzeitig tritt die Farbreaktion mit Nitroprussid-Natrium in steigendem Maße auf. Diese „verzögerte Nitroprussidreaktion“ kann auch zur quantitativen, kolorimetrischen Bestimmung von Acetyl-Coenzym A benützt werden<sup>27</sup>).
- 2) Bei der enzymatischen Acetylierung von Sulfanilamid mit dem Acetyl-Coenzym A-Präparat nimmt die mit der „verzögerten Nitroprussid-Reaktion“ kolorimetrisch bestimmbare Konzentration an S-Acyl-Gruppen in gleichem Maße ab, wie freies Sulfanilamid verschwindet<sup>28</sup>).
- 3) Bei der Citronensäure-Synthese<sup>29</sup>) wird die der entstehenden Citronensäure äquivalente Menge an SH-Gruppen freigesetzt.
- 4) Die Substanz ist wie andere Acylmercaptane stark empfindlich gegen Quecksilber. Sie zerfällt in Acetat und das Hg-Salz des Coenzym A.
- 5) Jodessigsäure inaktiviert Coenzym A schnell durch irreversible Reaktion mit der freien SH-Gruppe. Acetyl-Coenzym A dagegen ist gegen Jodessigsäure unempfindlich.
- 6) Die Aktivität des Präparates geht im alkalischen Milieu schnell verloren, während im sauren Bereich bei tiefen Temperaturen kein Wirkungsverlust eintritt. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für alle Acylmercaptane.
- 7) Coenzym A als Mercaptan-Komponente der „aktivierten Essigsäure“ wurde durch Versuche von *E. R. Stadtman*<sup>29</sup>) dadurch endgültig bewiesen, daß das System Acetylphosphat + Coenzym A + Phosphotransacetylase (s. Gleichung 8) Acetyl-Coenzym A liefert, das genau so zur Citronensäure-Synthese befähigt ist wie das Acetyl-Coenzym A-Präparat von *Lynen* bei Inkubation mit Oxal-essigsäure und dem „kondensierenden Enzym“ von *Ochoa*.

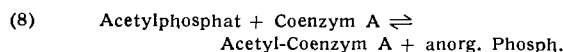
Damit war sichergestellt, daß die Wirkungsgruppe des Coenzym A in der SH-Gruppe des Thioäthanolamin-Anteils zu suchen ist und die Funktion des Coenzym A die einer Co-Transacetylase ist, völlig analog zu einer Reihe anderer Cofermente, die Wasserstoff, Phosphat-Gruppen oder Amino-Gruppen übertragen. Diese Erkenntnis machte es möglich, den Mechanismus der von Coenzym A abhängigen Acetylierungsreaktionen detailliert zu formulieren. Allgemein gilt folgende Formel<sup>31</sup>):



Eines der wichtigsten Acetylondonator-Systeme ist das System ATP + Acetat. *Lynen* und *Hilz*<sup>30</sup>) haben aus Hefe und der Arbeitskreis um *Lipmann*<sup>30a</sup>) aus Taubenleber eine Protein-Fraktion angereichert, welche dieses System zur Acetyl-CoA-Synthese verwerten kann:



Das hier wirksame Ferment (oder Fermentsystem) ist es, das die im vorhergehenden beschriebenen Acetylierungsreaktionen bei Anwesenheit von ATP, Acetat und Coenzym A ermöglichte. Ein weiteres, von *Stadtman* und *Barker*<sup>31</sup>) beschriebenes Acetylondonator-System stellt Acetylphosphat mit Phosphotransacetylase aus Bakterien dar:



Dieses, nur in gewissen Bakterien vorkommende Enzym ist verantwortlich für die Wirksamkeit von Acetylphosphat als Ersatz für „aktivierte Essigsäure“.

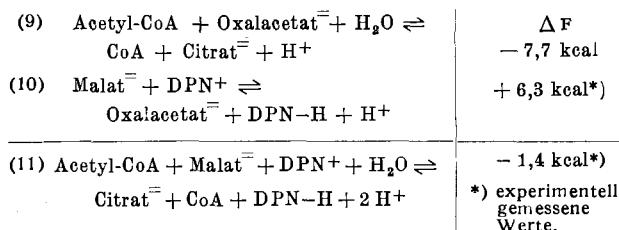
Sehr wahrscheinlich führt nach *Lynen*<sup>32</sup>) auch der oxydative Abbau der höheren Fettsäuren und der Acetessigsäure-Abbau unter Mitwirkung von Coenzym A zur reversiblen Entstehung von aktivem Acetyl<sup>33a</sup>).

## Energetische Verhältnisse

Im Zuge des Kohlenhydratabbaues ist die dehydrierende Decarboxylierung der Brenztraubensäure die Acetylondonator-Reaktion. Vor der Besprechung der Reaktion soll aber noch eine energetische Betrachtung eingeschaltet werden.

Da „aktivierte Essigsäure“ eine zu energieverbrauchenden Synthesen befähigte Verbindung ist, muß die Acylmercaptan-Bindung zu den energiereichen Bindungen im Sinne *Lipmanns* gehören. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß es sich bei den Acylphosphaten ebenso wie bei den Acylmercaptanen um Anhydride zwischen einer Carbonsäure und dem Derivat einer schwachen anorganischen Säure (H<sub>2</sub>S bzw. Phosphorsäure) handelt. Vermutlich spielen für den Energieinhalt der Acetyl-Coenzym A-Bindung verminderte Mesomeriemöglichkeiten des Coenzym A-Anteils<sup>31</sup>) sowie die von *T. L. Hill* und *M. F. Morales*<sup>33</sup>) für den Energieinhalt von Phospho-enol-brenztraubensäure, Adenosindi- und Adenosintriphosphat diskutierte, elektrostatische Abstoßung zwischen negativen Ladungen der Molekel eine Rolle.

Experimentell ist der Energieinhalt der S-Acyl-Bindung in Acetyl-Coenzym A von *J. R. Stern*, *S. Ochoa* und *F. Lynen* gemessen worden<sup>26</sup>). Hierzu wurde die Citronensäure-Synthese aus Oxalessigsäure und Acetyl-Coenzym A (Gl. 9) mit der Bildung von Oxalessigsäure aus Äpfelsäure durch Äpfelsäuredehydrase (Gl. 10) gekoppelt. Die Gleichgewichtskonstanten der Bilanzreaktion (Gl. 11) sowie der Reaktion 10 wurden durch spektrophotometrische Bestimmung der DPN-H-Konzentration gemessen und hieraus die bei den Gleichungen angegebenen Beträge für die freie Energie der Reaktionen berechnet. Die Differenz beider Beträge ergibt die freie Energie der Reaktion (9).



<sup>31</sup>) *E. R. Stadtman* u. *H. A. Barker*, J. biol. Chemistry 180, 1117 [1949].

<sup>32</sup>) *F. Lynen*: Zitat<sup>31</sup>); s. a. *H. A. Barker*: Phosphorus Metabolism, S. 234.

<sup>33</sup>) *T. L. Hill* u. *M. F. Morales*, Arch. Biochemistry 29, 450 [1950].

<sup>33a</sup>) Neueste Befunde sprechen dafür, daß auch bei der Synthese der Säureamid-Bindung in Hippursäure Coenzym A beteiligt ist (*H. Chantrenne*, J. biol. Chemistry 189, 227 [1951]). Dies eröffnet interessante Aspekte für den Mechanismus der biologischen Peptid-Synthese (*Th. Wieland* u. *W. Schäfer*, diese Ztschr. 63, 146 [1951]).

<sup>25</sup>) *F. Lynen* u. *O. Wieland*, unveröffentl. Versuche.

<sup>26</sup>) *J. R. Stern*, *S. Ochoa* u. *F. Lynen*, Fed. Proc. 1952, im Druck.

<sup>27</sup>) *F. Lynen*, Liebig's Ann. Chem. 574, 33 [1951].

<sup>28</sup>) *F. Lynen* u. *M. Bühler*, vgl. Diplomarbeit *M. Bühler*, München 1951.

<sup>29</sup>) *E. R. Stadtman*, Gordon Research Conferences 1951.

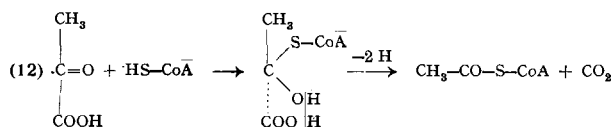
<sup>30</sup>) *F. Lynen* u. *H. Hilz*, unveröffentl. Versuche.

<sup>30a</sup>) *T. C. Chou*, *G. D. Novelli*, *E. R. Stadtman*, u. *F. Lipman*, Fed. Proc. 9, 160 [1950].

Mit Hilfe der von N. O. Kaplan<sup>34)</sup> berechneten Energieänderung bei der Citronensäure-Synthese aus Oxalessigsäure und Essigsäure (+ 4,7 kcal) ergibt sich für den Energieinhalt der Acetyl-Coenzym A-Bindung ein Betrag von  $7,7 + 4,7 = 12,4$  kcal/Mol. Dieser Wert stimmt sehr gut überein mit dem Wert, den Stadtman<sup>35)</sup> bei der Analyse des Phosphotransacetylase-Systems erhalten hat. Damit gliedern sich die Acylmercaptane der seit längerem bekannten Gruppe von energiereichen Phosphat-Verbindungen ein.

Bedeutungsvoll ist in diesem Zusammenhang die wesentlich höhere Stabilität der Acylmercaptane im Gegensatz zu den Acylphosphaten bei der energetisch für die Zelle nutzlosen Aufspaltung durch Wasser. So wird verständlich, daß die Zelle für die vielfältig benötigte und deshalb in relativ hoher Konzentration vorliegende „aktivierte Essigsäure“ eine energiereiche Acyl-S-Verbindung benützt statt einer labilen Acyl-Phosphat-Verbindung.

Nachdem wir die Struktur und energetische Stellung der „aktivierten Essigsäure“ kennengelernt haben, können wir zu unserem eigentlichen Problem, der dehydrierenden Decarboxylierung von Brenztraubensäure zurückkehren. Es war bereits von Lynen formuliert worden<sup>21, 24)</sup>, daß hier die SH-Gruppe des Coenzym A an die Carbonyl-Gruppe der Brenztraubensäure addiert wird und daß diese SH-Carbonyl-Verbindung der Dehydrierung und Decarboxylierung anheimfällt und zur Entstehung von Acetyl-Coenzym A führt, wobei wahrscheinlich die Decarboxylierung der Dehydrierung vorangeht<sup>+</sup>.

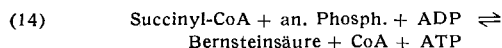
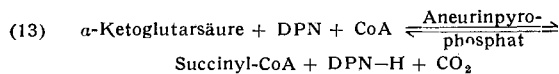


S. Ochoa<sup>36)</sup> hat vor kurzem über Versuche berichtet, welche die Anreicherung der notwendigen Proteine aus Schweineherz und *Escherichia colizum* Inhalt haben und die schon früher vermutete Beteiligung von Diphosphopyridinnucleotid als Wasserstoffacceptor und von Aneurinpyrophosphat sowie Coenzym A beweisen. Wie die Reaktion im einzelnen vor sich geht, ist noch nicht endgültig geklärt, Ochoa<sup>37)</sup> konnte aber eine Protein-Fraktion anreichern, die spezifisch die Decarboxylierung von Brenztraubensäure mit Aneurinpyrophosphat katalysiert, während eine zweite Proteinfraktion notwendig ist, um die Bildung des Endproduktes (Acetyl-Coenzym A) zu ermöglichen.

### Dehydrierende Decarboxylierung von $\alpha$ -Ketoglutaräure

Seit langem ist der oxydative Umsatz von  $\alpha$ -Ketoglutaräure in Analogie zum Brenztraubensäureumsatz gestellt worden. Hier wie dort handelt es sich um die Dehydrierung einer  $\alpha$ -Ketosäure, die durch gleichzeitige Decarboxylierung in eine um ein C-Atom ärmere Carbonsäure übergeht. Bei Ausschluß der mit der Atmungskette verknüpften Phosphorylierungen führt diese Reaktion zur Erzeugung von einem Mol ATP pro Mol oxydierter  $\alpha$ -Ketoglutaräure<sup>38)</sup>. Im Anschluß an die Versuche von Lynen ist es Ochoa<sup>39)</sup> und Mitarbeitern von D. E. Green<sup>40)</sup> gelungen, die Beteiligung von Coenzym A an der Reaktion nachzuweisen

und die primäre Entstehung von Succinyl-Coenzym A sowie dessen Aufspaltung durch anorganisches Phosphat und ADP zu Bernsteinsäure und ATP wahrscheinlich zu machen. Zweifellos gehorcht die Reaktion folgendem Schema:



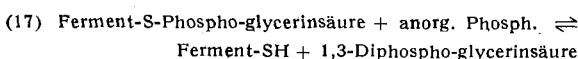
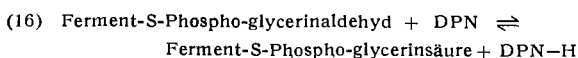
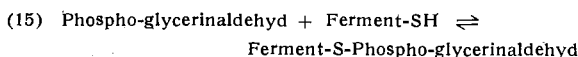
Auch hier ist, wie bei der Brenztraubensäure-Oxydation, DPN der Wasserstoff-Acceptor, und wahrscheinlich ist Aneurinpyrophosphat an der Reaktion beteiligt.

So wie von Acetyl-Coenzym A ausgehend die verschiedensten Synthesen in der Zelle durchgeführt werden können, kann von Succinyl-Coenzym A aus die Bernsteinsäuregruppierung zum Aufbau einer Reihe von Substanzen verwendet werden. Isotopenversuche<sup>41)</sup> haben ergeben, daß insbesondere zur Synthese des Porphyrin-Ringes C<sub>4</sub>-Bruchstücke verwendet werden, die aus dem Essigsäure-Abbau stammen. Vermutlich ist es Succinyl-Coenzym A, das für die Synthese dieser biologisch äußerst wichtigen Verbindungsklasse benützt wird.

### Triosephosphat-Dehydrierung

Von der Isolierung der Triosephosphatdehydrase und der Aufklärung des primären Reaktionsproduktes als eine Acylphosphat-Verbindung war der Anstoß zur Erkenntnis der Bedeutung von energiereichen Phosphat-Bindungen für den Energiehaushalt der Zelle ausgegangen. Durch die Versuche von Warburg war der Mechanismus der Triosephosphat-Dehydrierung geklärt im Sinne der Formeln 4 und 5. Eine Frage blieb offen, nämlich die Reaktion bei der das anorganische Phosphat gebunden wird. Warburg postulierte die primäre, nicht-enzymatische Entstehung einer Aldehyd-Phosphat-Additionsverbindung, die dann durch Dehydrierung in die experimentell sichergestellte 1,3-Diphospho-glycerinsäure übergehen sollte. Diese Hypothese hat sich nicht beweisen lassen.

Durch die Entdeckung der S-Acyl-Verbindungen ergab sich ein neuer Aspekt zu diesem Problem. Die Phosphorolyse einer Acyl-S-Verbindung führt im Falle des Acetyl-Coenzym A bei Verwendung von Bakterienextrakten zu Acetylphosphat (Gleichung 8 von rechts nach links betrachtet), einer Verbindung, die in ihrem Aufbau dem Reaktionsprodukt der Triosephosphat-Dehydrierung (1,3-Diphosphoglycerinsäure) entspricht. Berücksichtigt man die hohe Empfindlichkeit der Triosephosphatdehydrase gegen SH-Gruppen-Reagenzien, so liegt nahe, für den Reaktionsmechanismus der Triosephosphat-Dehydrierung primäre Bildung einer Aldehyd-S-Verbindung anzunehmen (In diesem Falle stammt die SH-Gruppe aus dem Protein der Triosephosphatdehydrase), die dann weiter zur Acyl-S-Verbindung dehydriert und durch Phosphat zu freiem Ferment-SH und Acylphosphat aufgespalten wird:



<sup>41)</sup> D. Shemin u. J. Wittenberg, J. biol. Chemistry 192, 315 [1951]

<sup>34)</sup> N. O. Kaplan: The Enzymes, Academic Press, New York, 1951, S. 102.

<sup>35)</sup> E. R. Stadtman, Gordon Research Conferences 1951.

<sup>36)</sup> S. Korkes, A. Campillo, J. C. Gunsalus u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 193, 721 [1951].

<sup>37)</sup> Persönliche Mitteilung an F. Lynen.

<sup>38)</sup> F. E. Hunter u. S. Spector, Fed. Proc. 10, 201 [1951].

<sup>39)</sup> Phosphorus Metabolism, Baltimore 1951, S. 370.

<sup>40)</sup> D. R. Sanadi u. J. W. Littlefield, J. biol. Chemistry 193, 683 [1951].

Diesen Reaktionsmechanismus hat *E. Racker*<sup>42)</sup> aus Analogiegründen zum Reaktionsmechanismus der Glyoxalase vorgeschlagen. Er ist völlig analog der Entstehung von Acetylphosphat aus Acetaldehyd über Acetyl-Coenzym A mit Hilfe der katalytischen Wirkung einer Proteinfraction aus Bakterien<sup>43)</sup>. *S. Ochoa*<sup>36)</sup> kam zu derselben Annahme auf Grund von Versuchen, welche die Fähigkeit der Triosephosphatdehydrogenase beweisen, Acetyl-Gruppen auf Coenzym A zu übertragen<sup>44)</sup>, wobei diese Acetyl-Gruppen auch durch Dehydrierung aus Acetaldehyd entstehen können<sup>45)</sup>. Für die genannten Reaktionen sind größere Protein-Mengen notwendig, da es sich um nicht-physiologische, katalytische Fähigkeiten der Triosephosphatdehydrogenase handelt. Trotzdem sind zweifellos die von *Ochoa* angeführten Versuche ein starkes Argument für den oben wiedergegebenen Reaktionsverlauf.

Ausgehend von Beobachtungen über die Kinetik der Jodessigsäure-Hemmung an lebenden Hefezellen und angeregt durch die Demonstration von energiereichen S-Acyl-Verbindungen<sup>21, 24)</sup> sowie die im obigen Schema wiedergegebene Hypothese von *E. Racker*, wurde die Kinetik der Triosephosphatdehydrogenase mit kristallisiertem Protein aus Kaninchenmuskel bei Anwendung von Jodessigsäure näher untersucht<sup>46)</sup>. Hierbei ergab sich (Bild 3), daß Vorinkubation des Proteins mit geringen Konzentrationen an Phosphoglycerinaldehyd einen wirksamen Schutz gegen die SH-Gruppen blockierende Wirkung der Jodessigsäure ergibt.

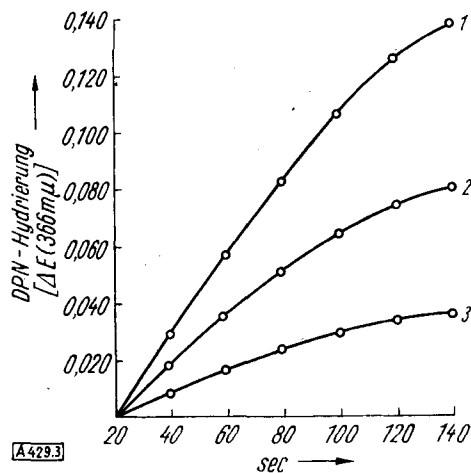


Bild 3  
Kinetik der Jodacetathemmung bei der Triosephosphat-Dehydrierung<sup>46)</sup>

(1) Reaktion ohne Jodacetat; (2) Reaktion mit Jodacetat; mit Phosphoglycerinaldehyd vorinkubiert; (3) Reaktion mit Jodacetat; ohne Vorinkubation. (1) (2) (3): Start zur Zeit Null durch DPN und Arsenat-Zusatz

Man kann diesen Befund mit der Existenz einer Ferment-SH-Aldehyd-Verbindung, wie sie in Gleichung 15 wiedergegeben ist, zwanglos erklären. Durch das Auftreten dieser Additionsverbindung wird die Konzentration an freien SH-Gruppen erniedrigt und damit die irreversible, inaktivierende Reaktion

$$\text{Ferment-SH} + \text{J-CH}_2\text{COOH} \rightarrow \text{Ferment-S-CH}_2\text{COOH} + \text{HJ}$$
 verlangsamt. Daß es sich hierbei um einen spezifisch mit dem Reaktionsmechanismus verknüpften Effekt handelt, wurde dadurch gesichert, daß bei Verwendung verschiede-

ner Substrate (Phosphoglycerinaldehyd, Glycerinaldehyd, Acetaldehyd) die zur Schutzwirkung notwendigen Konzentrationen parallel mit den Konzentrationen gehen, die zum beobachtbaren Umsatz an der Triosephosphatdehydrogenase notwendig sind. Zweifellos darf man diesen Befund als Beleg dafür werten, daß die Triosephosphatdehydrierung durch die Ausbildung einer Phosphoglycerinaldehyd-SH-Verbindung eingeleitet wird, und die genannten Experimente und Analogieschlüsse amerikanischer Autoren sprechen dafür, daß der zweite Reaktionsschritt in der Dehydrierung zur S-Acylverbindung besteht.

### Zusammenfassung

Die mit der ATP-Erzeugung gekoppelten exergonen Reaktionsschritte bei der Kohlenhydratoxydation (ohne Berücksichtigung der Atmungskettenphosphorylierung) bestehen in der Dehydrierung von Carbonyl-Verbindungen zu Carbonsäuren. Hierbei ist die Phosphat-Übertragung von Phosphobrenztraubensäure auf Adenosindiphosphat außer acht gelassen, da es sich bei diesem Prozeß lediglich um die Rückgewinnung des Phosphates handelt, das bei den einleitenden Phosphorylierungen der Hexosen verbraucht wurde. Die im vorhergehenden dargestellten Untersuchungen zeigen, daß die Zelle die Energieausnutzung in allen drei in Betracht kommenden Fällen mit prinzipiell demselben Mechanismus durchführt: Eine organische SH-Verbindung wird an die Carbonyl-Gruppe addiert, hierauf setzt Dehydrierung bzw. dehydrierende Decarboxylierung ein: es resultiert eine energiereiche S-Acyl-Verbindung. Deren Aufspaltung verläuft unter Beteiligung von anorganischem Phosphat, wobei letzten Endes die freie SH-Verbindung wieder zur Verfügung gestellt und ATP aus ADP synthetisiert wird. Bei der Triosephosphat-Dehydrierung ist die Zwischenstufe ein Acylphosphat (1,3-Diphospho-glycerinsäure); über die Zwischenstufen der phosphorolytischen Aufspaltung von Acetyl-Coenzym A und Succinyl-Coenzym A sind wir noch im unklaren.

Im Falle der Triosephosphat-Dehydrierung dient als in katalytischer Menge notwendige SH-Verbindung das Protein selbst, eventuell auch eine nicht dissoziierend an das Protein gebundene Wirkungsgruppe. Bei der dehydrierenden Decarboxylierung von Brenztraubensäure und  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure dagegen wird eine niedrigmolekulare SH-Verbindung, das Coenzym A, benützt. Der Grund hierfür besteht darin, daß die primär entstehende energiereiche Acyl-S-Verbindung nicht nur auf einem Reaktionsweg weiterverändert wird, wie dies bei der Triosephosphat-Dehydrierung der Fall ist, sondern daß das Acetyl- und Succinylmercaptan für die verschiedensten Synthesen und damit für eine Reihe von katalytisch wirksamen Proteinen zur Verfügung stehen muß. Dies kann nur erreicht werden durch Verwendung einer leicht diffusiblen Verbindung, ein Prinzip, das die Zelle auch bei der Wasserstoff- und Phosphatübertragung durch dissoziierende Cofaktoren verwendet<sup>47)</sup>.

Bedenkt man die insbesondere im Zusammenhang mit der „aktivierten Essigsäure“ stehende universelle Funktion von energiereichen Acyl-Mercaptanen, so wird klar, daß diese Verbindungsklasse, deren physiologische Rolle erst im letzten Jahre entdeckt wurde, den energiereichen Phosphatverbindungen an Bedeutung für den Energiehaushalt der Zelle nicht nachsteht.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen bin ich für wertvolle Hinweise bei der Abfassung des Manuskriptes zu großem Dank verpflichtet.

Eingeg. am 2. April 1952

[A 429]

<sup>47)</sup> Th. Bücher, diese Ztschr. 62, 256 [1950].

<sup>42)</sup> E. Racker, J. biol. Chemistry 190, 685 [1951].

<sup>43)</sup> E. R. Stadman u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 180, 1095 [1949]; s. a. <sup>36)</sup>, S. 731.

<sup>44)</sup> Persönliche Mitteilung an F. Lynen.

<sup>45)</sup> J. Harting, Fed. Proc. 10, 195 [1951].

<sup>46)</sup> H. Holzer u. E. Holzer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. [1952] im Druck.