

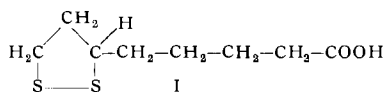
# Chemie und Biochemie der $\alpha$ -Liponsäure

Von Dr. HANS GRISEBACH\*)

Die  $\alpha$ -Liponsäure ist ein Coenzym, welches an der oxydativen Decarboxylierung der Brenztraubensäure beteiligt ist. Sie besitzt einen füngliedrigen Disulfid-Ring, der interessante physikalische und chemische Eigenschaften zeigt. Ihre biologische Funktion als Überträger von Acetyl-Gruppen ist gesichert. Möglicherweise ist sie auch an weiteren biochemischen Prozessen beteiligt.

## Einführung\*\*)

Die oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure nimmt eine zentrale Stellung im Stoffwechselgeschehen ein. Schon lange ist bekannt, daß Aneurinpyrophosphat bei dieser Reaktion als Coenzym beteiligt ist. Später konnten *Lipmann*, *Lynen* und andere Forscher zeigen<sup>1)</sup>, daß der Acetyl-Rest, der bei der Decarboxylierung der Brenztraubensäure entsteht, auf das Coenzym A unter Bildung von S-Acetyl-Coenzym A übertragen wird. Durch Wachstumsversuche bei Mikroorganismen wurde in den letzten Jahren ein neues Coenzym entdeckt, welches an der Übertragung der Acetyl-Gruppe auf das Coenzym A beteiligt ist. Infolge seiner ungewöhnlichen Struktur (I) erregte es bei Chemikern und Biochemikern großes Interesse.



Da es von mehreren Forschergruppen gleichzeitig entdeckt wurde, erhielt es verschiedene Namen: Acetat ersetzender Faktor (*acetate replacing factor*), Protogen A, Brenztraubensäure-Oxydationsfaktor (*pyruvate oxydation factor*, *POF*), Thiocantansäure oder genauer 6,8-Thiocantansäure (*6,8-thioctic acid*) und  $\alpha$ -Liponsäure. Im folgenden soll die Bezeichnung  $\alpha$ -Liponsäure verwendet werden.

## Entdeckung der $\alpha$ -Liponsäure

1946 fanden *Guirard*, *Snell* und *Williams*<sup>2)</sup>, daß das Wachstum verschiedener Milchsäurebakterien von der Acetat-Konzentration abhängig ist und daß in Abwesenheit von Acetat das Wachstum durch bestimmte Hefen und Leberextrakte stimuliert wird. Bei *Lactobacillus casei* besaß eine gereinigte Fraktion aus Brauhefe eine 440 mal größere Wachstumswirkung als die gleiche Gewichtsmenge Natriumacetat. Der „*acetate replacing factor*“ war löslich in Methanol, stabil gegen Säure und Alkali, ließ sich mit Schwermetallsalzen fällen und wurde durch Oxydationsmittel zerstört. *Kline* und *Barker*<sup>3)</sup> erhielten das gleiche Ergebnis mit dem *Butyribacterium rettgeri* als Testorganismus, und *Colio* und *Babb*<sup>4)</sup> fanden diesen Faktor auch in verschiedenen pflanzlichen Materialien. Mit *Streptococcus lactis* fanden später *Reed* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> in Hefeextrakten und Extrakten aus tierischen Geweben mehrere wuchststoffaktive Faktoren mit charakteristischen  $R_f$ -Werten, die nach Säurehydrolyse in eine Mischung von zwei aktiven Verbindungen verwandelt wurden. Durch Extraktion eines sauren Leberhydrolysates mit Benzol, Ausschütteln des Benzols mit Bicarbonat-Lösung und anschließende Chromatographie an Silicagel wurde ein Öl mit sehr hoher Aktivität erhalten.

\*) Anschrift: Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität, Berlin-Charlottenburg 2, Straße des 17. Juni Nr. 115.

\*\*) In der englischen Literatur erschienen Zusammenfassungen über die  $\alpha$ -Liponsäure von C. Long, Science Progr. 41, 659 [1953], 43, 672 [1955].

1) F. Lynen, diese Ztschr. 67, 463 [1955].

2) B. M. Guirard, E. E. Snell u. R. J. Williams, Arch. Biochem. 9, 281, 361 [1946].

3) L. Kline u. H. A. Barker, J. Bacteriol. 60, 394 [1950].

4) L. G. Colio u. V. Babb, J. biol. Chemistry 174, 405 [1948].

5) L. J. Reed, B. G. De Busk, P. M. Johnston u. M. E. Getzendauer, ebenda 192, 851 [1951].

Schon 1954 hatten *Kidder* und *Dewey*<sup>6)</sup> beobachtet, daß die Ciliate *Tetrahymena pyriformis* außer dem üblichen Medium eine Substanz, die aus Leber erhältlich ist, zum Wachstum benötigt. Dieser Faktor wurde von *Stokstad* und seinen Mitarbeitern<sup>7)</sup> näher untersucht. Sie fanden, daß er in zwei Formen existiert, denen sie die Namen Protogen A und B gaben, da es ein Wachstumsfaktor für Protozoen war.

Die Teilnahme eines unbekannten Faktors aus Hefe an der Oxydation von Brenztraubensäure durch ruhende Zellen von *Streptococcus faecalis* wurde zuerst von *O'Kane* und *Gunsalus*<sup>8)</sup> gefunden. Spätere Arbeiten<sup>9, 10)</sup> zeigten, daß der „*pyruvate oxydation factor*“ in mehreren Formen existiert, die nach Säurehydrolyse in eine Mischung von zwei Substanzen übergehen. Daß es sich bei dem Acetat ersetzenden Faktor, dem Protogen und dem Brenztraubensäure-Oxydationsfaktor um dieselbe Substanz handelt, wurde erstmals von *Snell* und *Brohquist*<sup>11)</sup> vermutet. Sie beobachteten, daß sowohl gereinigter „*pyruvate oxydation factor*“ als auch Protogen hohe Wachstumsaktivität bei *L. casei* in Abwesenheit von Acetat besaß. 1951 konnten *Reed*, *De Busk*, *Gunsalus* und *Hornberger*<sup>12)</sup> erstmalig eine kristallisierte Verbindung aus Leber gewinnen, die hohe Wachstumsaktivität für *S. lactis* in Abwesenheit von Acetat besaß und als Cofaktor für die Brenztraubensäure-Oxydation in *S. faecalis* diente. Auf Grund ihrer Löslichkeit in Fettlösungsmitteln und ihrer Säurenatur nannten sie die Verbindung „ *$\alpha$ -lipoic acid*“ (die Bezeichnung  $\beta$ -*lipoic acid* erhielt der zweite aktive Faktor, der sich später als das Sulfoxyd der Liponsäure erwies). Spätere Arbeiten von *Slater*<sup>13)</sup> und *Seaman*<sup>14)</sup> zeigten, daß diese Verbindung auch das Protogen-Bedürfnis von *T. pyriformis* vollständig ersetzen kann.

## Strukturaufklärung und Synthesen

Die Strukturaufklärung der  $\alpha$ -Liponsäure gelang etwa gleichzeitig *Reed* und Mitarbeitern<sup>15, 16)</sup> sowie der *Lederle*-Gruppe<sup>17, 18)</sup>. Aus 10 t Leberrückständen wurden 30 mg kristallisierte (+)- $\alpha$ -Liponsäure isoliert. Die Säure hatte einen  $p_K$  von 4,7 und enthielt Schwefel in Form eines Disulfides, da der Nitroprussidnatrium-Test erst nach Reaktion mit Natriumcyanid positiv war. Die Form der polarographischen Kurve sprach für ein cyclisches Disulfid.

6) G. W. Kidder u. V. C. Dewey, Arch. Biochem. 8, 293 [1945].

7) E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffmann, M. A. Regan, D. Fordham u. T. H. Jukes, ebenda 20, 75 [1949].

8) D. J. O'Kane u. I. C. Gunsalus, J. Bacteriol. 54, 20 [1947]; 56, 499 [1948].

9) I. C. Gunsalus, M. I. Dolin u. L. J. Struglia, J. biol. Chemistry 194, 849 [1952].

10) I. C. Gunsalus, L. Struglia u. D. J. O'Kane, ebenda 194, 859 [1952].

11) E. E. Snell u. H. P. Brohquist, Arch. Biochem. 23, 326 [1949].

12) L. J. Reed, B. G. De Busk, I. C. Gunsalus u. C. S. Hornberger, Science [Washington] 114, 93 [1951].

13) J. V. Slater, ebenda 115, 376 [1952].

14) G. R. Seaman, Proc. Soc. exper. Biol., N. Y. 79, 158 [1952].

15) L. J. Reed, B. G. De Busk, I. C. Gunsalus u. G. H. F. Schnakenberg, J. Amer. chem. Soc. 73, 5920 [1951].

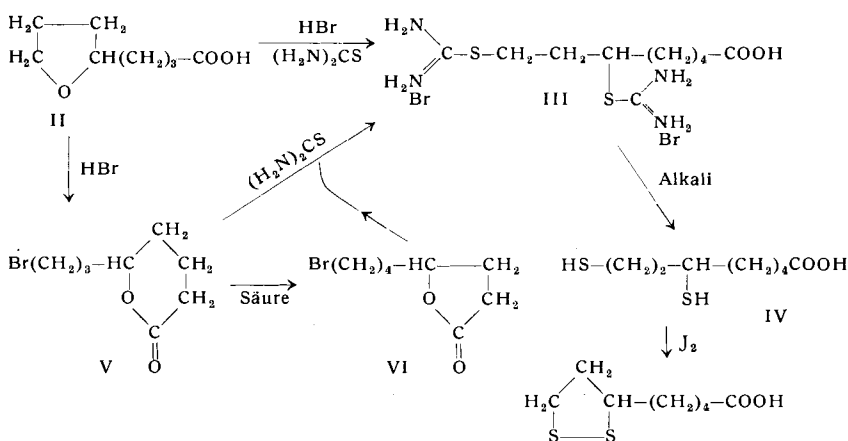
16) L. J. Reed, I. C. Gunsalus, G. H. F. Schnakenberg, Q. F. Soper, H. E. Boatz, S. F. Kern u. T. V. Parke, ebenda 75, 1267 [1953].

17) E. L. Patterson, J. V. Pierce, E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffmann, J. A. Brockmann, jr., F. P. Day, M. E. Macchi u. T. H. Jukes, ebenda 76, 1823 [1954].

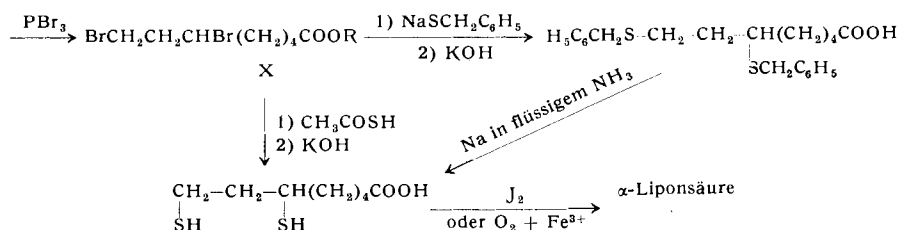
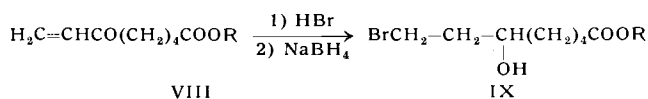
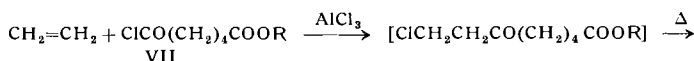
18) J. A. Brockmann, jr., E. L. R. Stokstad, E. L. Patterson, J. V. Pierce u. M. E. Macchi, ebenda 76, 1827 [1954].

Die Desulfurierung mit Raney-Nickel ergab n-Caprylsäure. Da der negative *Kuhn-Roth*-Test und das Infrarotspektrum die Abwesenheit einer Methyl-Gruppe anzeigten, mußte eines der Schwefel-Atome am endständigen C-Atom sitzen. Durch weitere chemische Befunde, Röntgenstrukturanalyse und das Infrarotspektrum, wurde auf die Struktur eines cyclischen Disulfides geschlossen, das sich von der 4,8-, der 5,8- oder der 6,8-Dimercapto-n-caprylsäure ableite. Der endgültige Strukturbeweis über die Ringgröße des Disulfid-Ringes wurde erst durch die Synthese erbracht<sup>19)</sup>.

Noch bevor die Struktur der  $\alpha$ -Liponsäure endgültig aufgeklärt war, gelang *Reed*<sup>20)</sup> die Synthese der kristallisierten Verbindung. Durch Umsatz von 4-( $\alpha$ -Tetrahydrofurfuryl)-buttersäure (II) mit Thioharnstoff und HBr bildet sich das Diisothiuroniumsalz (III). Die alkalische Hydrolyse von III ergibt die entspr. Mercaptosäure (IV), die durch Oxydation mit Jod in  $\alpha$ -Liponsäure übergeht.



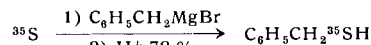
Bessere Ausbeuten werden erhalten, wenn man den Furan-Ring mit HBr und Schwefelsäure öffnet, wobei sich vorwiegend das Bromlacton (V) bildet und dieses dann mit Thioharnstoff zu III umsetzt. V lagert sich durch Säure oder durch Destillation in das  $\gamma$ -Lacton (VI) um, welches ebenfalls mit Thioharnstoff III ergibt. Die Synthese läßt also keinen Schluß auf die Größe des Disulfid-Ringes zu.



Die Ausbeuten an D,L- $\alpha$ -Liponsäure betragen etwa 4%. Öffnet man den Furan-Ring von II mit Kaliumjodid und Phosphorsäure an Stelle von HBr und Schwefelsäure, so erhält man bei sonst gleicher Reaktionsfolge das 6-Ring-Isomere der  $\alpha$ -Liponsäure<sup>19)</sup>.

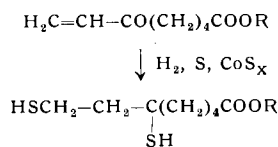
Bedeutend bessere Ausbeuten liefert eine weitere Synthese von *Reed*<sup>21)</sup>. Äthylen wird an  $\delta$ -Chlorformyl-

valeriansäureester (VII) addiert, wobei sich nach Destillation der 6-Oxo-7-octensäureester (VIII) bildet. Durch Addition von wasserfreier HBr und anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid erhält man den 8-Brom-6-oxy-octensäureester (IX), der mit  $\text{PBr}_3$  zum 6,8-Dibromoctensäureester (X) umgesetzt wird. Der Ersatz von Brom durch die Sulfhydryl-Gruppe ist durch Umsatz mit Kaliumthioacetat und anschließende alkalische Hydrolyse möglich. Bessere Ausbeuten liefert jedoch der Weg über das Dibenzylmercaptan, das sich aus X durch Umsatz mit Natriumbenzylmercaptid gewinnen läßt. Durch Reduktion mit Na in flüssigem Ammoniak erhält man die Dimercapto-Verbindung, welche mit Jod oder mit Luftsauerstoff in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$  zur  $\alpha$ -Liponsäure oxydiert wird. Die Ausbeuten, bezogen auf die Dibrom-Verbindung X, betragen etwa 65%. In der gleichen Weise wurden von *Adams*<sup>22)</sup> und von *Reed*<sup>23)</sup> auch die  $^{35}\text{S}$  markierte  $\alpha$ -Liponsäure synthetisiert. Die Darstellung des  $^{35}\text{S}$ -Benzylmercaptans gelang über die Grignard-Reaktion mit elementarem Schwefel und Benzylmagnesiumbromid.



Die technisch mögliche Synthese von *Bullock* und *Hand*<sup>24)</sup> verläuft zunächst über die gleichen Stufen. Das Zwischenprodukt VIII wird dann durch Druckhydrierung in Gegenwart von Schwefelwasserstoff, der im Reaktionsgefäß aus elementarem Schwefel und Wasserstoff gebildet wird,

und Kobaltpolysulfid als Katalysator direkt in den Ester der Dihydro- $\alpha$ -liponsäure übergeführt.



Weitere Synthesen der  $\alpha$ -Liponsäure, die aber im wesentlichen auf den gleichen Reaktionen beruhen, wurden von *Stokstad* und Mitarbeitern<sup>25)</sup> und von *Pohland* und Mitarbeitern<sup>26)</sup> ausgeführt.

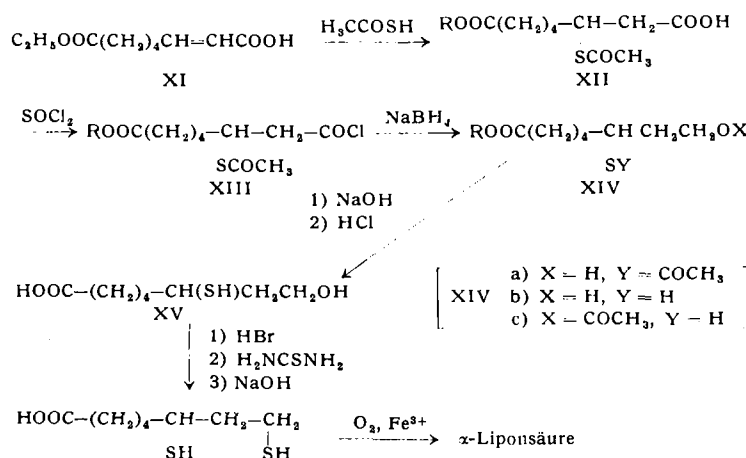
Die Synthese der optischen Antipoden der  $\alpha$ -Liponsäure gelang *Folkers* und Mitarbeitern<sup>27)</sup>. Die Addition von Thioessigsäure an 7-Carbäthoxy-2-heptensäure (XI) ergibt die D,L-3-Acetylthio-7-carbäthoxy-heptensäure (XII).

Aus einer ätherischen Lösung von XII kristallisiert mit L-Ephedrin das Salz der linksdrehenden Form. Die (–)-Form von XII wird dann in das Säurechlorid (XIII) verwandelt, welches durch Reduktion mit Natriumborhydrid

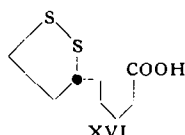
<sup>19)</sup> M. W. Bullock, J. A. Brockmann, jr., E. L. Patterson, J. V. Pierce, M. H. von Saltza, F. Sanders u. E. L. R. Stokstad, ebenda 76, 1828 [1954].  
<sup>20)</sup> C. S. Hornberger, jr., R. F. Heitmüller, I. C. Günsalus, G. H. F. Schnakenberg u. L. J. Reed, ebenda 75, 1273 [1953].  
<sup>21)</sup> L. J. Reed u. Ching-I Nin, J. Amer. chem. Soc. 77, 416 [1955].

<sup>22)</sup> P. Adams, J. Amer. chem. Soc. 77, 5357 [1955].  
<sup>23)</sup> R. C. Thomas u. L. J. Reed, ebenda 77, 5446 [1955].  
<sup>24)</sup> M. W. Bullock u. J. J. Hand, Chem. Engng. News, 33, 1526 [1955].  
<sup>25)</sup> M. W. Bullock, J. A. Brockmann, jr., E. L. Patterson, J. V. Pierce, M. H. von Saltza, F. Sanders u. E. L. R. Stokstad, J. Amer. chem. Soc. 76, 1828 [1954].  
<sup>26)</sup> Q. F. Soper, W. E. Butling, J. E. Cochran, jr. u. A. Pohland, ebenda 76, 4109 [1954].  
<sup>27)</sup> E. Walton, A. F. Wagner, F. W. Bachelor, L. H. Peterson, F. W. Holly u. K. Folkers, ebenda 77, 5144 [1955].

in eine Mischung von drei Estern (XIV, a, b, c) übergeht, die durch alkalische Hydrolyse die (-)-8-Oxy-6-thio-octansäure (XV) ergeben. Der Ersatz der Hydroxyl-Gruppe durch die Sulfhydryl-Gruppe über das Bromid mit Thioharnstoff führt zur (+)-Dihydro- $\alpha$ -liponsäure, welche in erwähnter Weise zur (-)- $\alpha$ -Liponsäure oxydiert wird. Entsprechend wurde die rechtsdrehende Verbindung dargestellt. Die (+)-Säure hat einen Drehwert von  $[\alpha]^{23}_D +104^\circ$  ( $c = 0,88$ , Benzol), die (-)-Säure  $[\alpha]^{23}_D -113^\circ$  ( $c = 1,88$ , Benzol). Im enzymatischen Brenztraubensäure-Oxydationstest<sup>28</sup>) zeigt die (+)- $\alpha$ -Liponsäure die doppelte Aktivität wie die D,L-Form. Die (-)-Säure ist inaktiv.



Nach Mislow und Meluch<sup>29</sup>) hat die (+)- $\alpha$ -Liponsäure die Konfiguration XVI.



### Physikalische und chemische Eigenschaften der $\alpha$ -Liponsäure

Die in gelben Nadeln vom Fp 60,5–61,5 °C kristallisierende D,L-Form zeigt ein charakteristisches UV-Spektrum mit  $\lambda_{\text{max}}$  332 m $\mu$ ,  $\lambda_{\text{min}}$  280 m $\mu$  und  $\epsilon_{\text{max}}$  157 [l·cm<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>]. Beim Vergleich des Spektrums der  $\alpha$ -Liponsäure mit dem Spektrum der entsprechenden Verbindung mit einem Sechsering und einem offenkettigen Disulfid<sup>30</sup>) (Bild 1) sieht man bei der  $\alpha$ -Liponsäure sowohl eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach längeren Wellen, als auch eine Abnahme der Intensität. Calvin<sup>31</sup>) deutete die Verschiebung des Absorptionsmaximums nach längeren Wellen durch das Auftreten einer Spannung im cyclischen Disulfid-Ring der  $\alpha$ -Liponsäure. Die Spannung ist mehr oder weniger in der S-S-Bindung lokalisiert und entsteht aus bisher noch nicht völlig geklärten Gründen. Es ist diese Ringspannung des fünfgliedrigen Disulfid-Ringes, der die  $\alpha$ -Liponsäure ihre besondere Stellung in der Biochemie verdankt. Die entsprechende Säure mit einem 6-Ring (5,8-Thiooctansäure) ist biologisch völlig unwirksam.

Calvin<sup>30, 31</sup>) hat die Spannungsenergie der  $\alpha$ -Liponsäure theoretisch und experimentell zu bestimmen versucht. Beim 5-Ring mit der Disulfid-Bindung muß der diedrische Winkel zwischen den C-S-Bindungen einen Wert von nahe 0° haben, während er in einem offenkettigen Disulfid jeden beliebigen Wert annehmen kann. An-

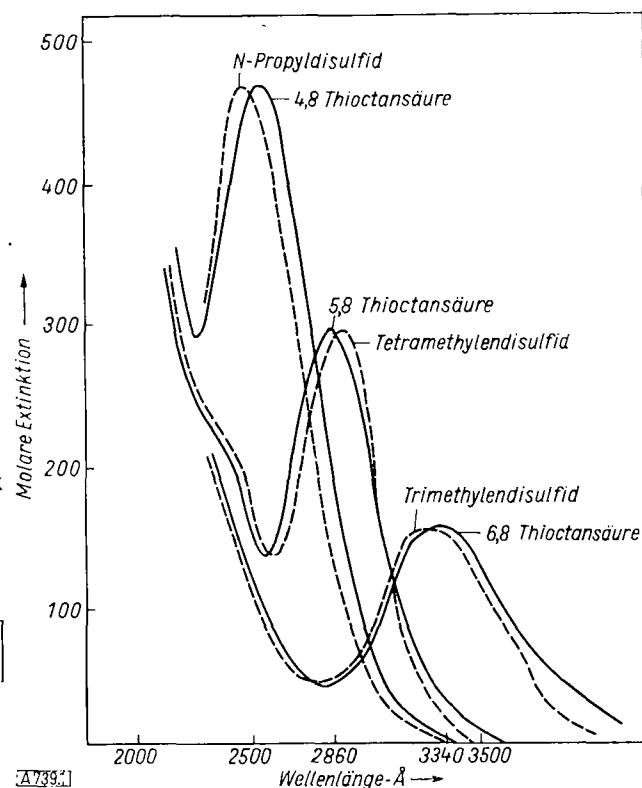


Bild 1  
Spektrum der Liponsäure

haltspunkte für die Größe der dadurch im Ring auftretenden Spannung, lassen sich aus Messungen über die Behinderung der freien Drehbarkeit bei einfachen offenkettigen Disulfiden gewinnen. Wärmekapazitätsmessungen an Dimethyldisulfid und Diäthyldisulfid ergaben eine Behinderung der freien Drehbarkeit zur coplanaren Stellung – Winkel zwischen den C-S-Bindungen 180° – mit einer Energieschwelle von ungefähr 10–15 Cal<sup>32</sup>). Die Geometrie des C-S-S-C-Systems ist in Bild 2 dargestellt. Ein möglicher Grund für die Behinderung der freien Drehbarkeit ist ein Überlappen der  $p_z$  „orbitals“ der beiden S-Atome<sup>33</sup>). Die stabile Konfiguration ist dann ein Disulfid mit einem Winkel von 90° zwischen den C-S-Bindungen.

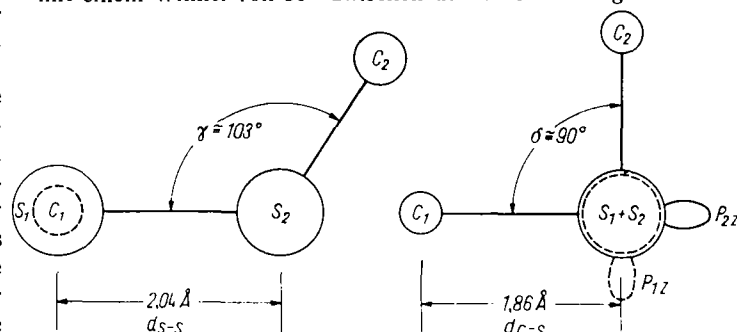


Bild 2  
Geometrie des C-S-S-C-Systems

Jede Abweichung von diesem Winkel ergibt eine Spannung, deren Energie etwa 10–12 Cal für die 180° Stellung beträgt und für die 0° Stellung (5-Ring) als noch größer zu erwarten ist, da hier eine Veränderung der C-S-Bindungswinkel hinzukommt. Eine weitere Abschätzung der Spannungsenergie im cyclischen Disulfid ergibt sich nach Cal-

<sup>28</sup>) J. C. Gunsalus u. W. E. Razzell: Methods of Enzymology, Bd. III; Academic Press, New York, N. Y. 1955, im Druck.

<sup>29</sup>) K. Mislow u. W. C. Meluch, J. Amer. chem. Soc. 78, 2341 [1956].

<sup>30</sup>) J. A. Barltrop, P. M. Hayes u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 76, 4348 [1954], vgl. a. diese Ztschr. 68, 253 [1956].

<sup>31</sup>) M. Calvin, Feder. Proc. 13, 697 [1954].

<sup>32</sup>) D. W. Scott, H. L. Finke, J. P. McCullough, M. E. Gross, R. E. Pennington u. G. Waddington, J. Amer. chem. Soc. 74, 2478 [1952].

<sup>33</sup>) L. Pauling: The Nature of the Chemical Bond; Cornell University Press, 1948, S. 90.

von aus der Verschiebung des Absorptionsmaximums bei der  $\alpha$ -Liponsäure gegenüber einem offenkettigen Disulfid. Nimmt man an, daß beim angeregten Zustand der ersten Absorptionsbanden die S—S-Bindung gesprengt wird, dann hat in erster Annäherung der angeregte Zustand für alle Disulfide etwa die gleiche Konfiguration, und die Energiedifferenz der Spektren beruht auf der Energiedifferenz der Grundzustände. Die verschiedenen Energiestufen lassen sich dann als Funktionen des S—S-Abstandes durch einfache Morse-Kurven darstellen (Bild 3). Der Übergang

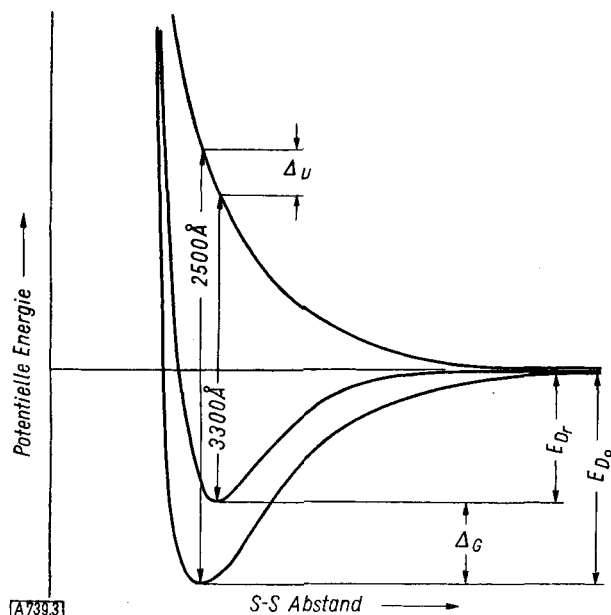
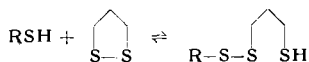


Bild 3  
Energieniveaus und S—S-Abstand

beim Absorptionsmaximum für den 5-Ring (3300 Å) entspricht 86 Cal, für die offenkettige Verbindung (2500 Å) 113 Cal. Da die Energie der angeregten Zustände  $\Delta U \approx 0$  ist, ergeben sich 27 Cal als Energiedifferenz der Grundzustände, welche einer Spannungsenergie von 27 Cal für den 5-Ring entspräche.

Weitere Anhaltspunkte über die Größe der Spannungsenergie lassen sich aus kinetischen Messungen gewinnen. Bei einem  $p_H$  um 8 reagiert das Trimethyldisulfid, welches alle charakteristischen Reaktionen des Disulfid-Ringes der  $\alpha$ -Liponsäure zeigt, mit Mercaptan unter Bildung eines offenkettigen Disulfides.



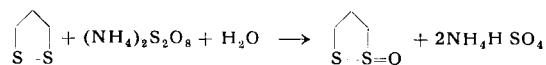
Durch Messung des Gleichgewichtes bei 25 °C und 35 °C wurde ein  $\Delta H$  von  $\sim 7$  Cal für diese Reaktion gefunden<sup>30)</sup>. Da die Bindungen auf beiden Seiten die gleichen sind, stellt das  $\Delta H$  in erster Annäherung die Spannung des Ringes dar. Die Messung ist jedoch sehr ungenau, da sie nur bei zwei verschiedenen Temperaturen ausgeführt werden konnte. Kürzlich bestimmte Sunner (S. Sunner, Nature [London] 176, 217 [1955]) aus der Reaktion



die Ringspannung bei der  $\alpha$ -Liponsäure zu 3,5 kcal und die des Trimethyldisulfides zu 4 kcal. Dieser experimentell nun gesichert erscheinende sehr kleine Wert läßt sich wahrscheinlich dadurch erklären, daß die Berechnungen für die Behinderung der freien Drehbarkeit der S—S-Bindung sich auf den Gaszustand beziehen, während obiger Wert im

flüssigen Zustand gemessen wurde. Die Berechnungen der Spannungsenergie aus dem Spektrum, werden von Sunner als unrealistisch bezeichnet.

Mit Ammoniumpersulfat läßt sich das Disulfid zum Sulfoxyd oxydieren. Die Geschwindigkeitskonstanten dieser



bimolekularen Reaktion für verschiedene Disulfide sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

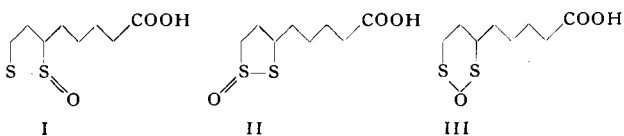
6,8-Thioctansäure ( $\alpha$ -Liponsäure)	141
5,8-Thioctansäure	4,2
8-Methyl-6,8-thioctansäure	220
Offenkettiges Disulfid	0

Tabelle 1

Oxydation von  $\text{S-S}$  durch  $(NH_4)_2S_2O_8$  zu  $\text{S-S=O}$  bei 25 °C in  $H_2O$  nach Calvin<sup>31)</sup>

Man sieht auch hier die bemerkenswert größere Reaktionsfähigkeit des 5-Ring-Disulfides. Die 8-Methyl-6,8-thioctansäure, der einzige bisher bekannte Antagonist der  $\alpha$ -Liponsäure, ist noch reaktionsfähiger als die  $\alpha$ -Liponsäure selbst, während ein offenkettiges Disulfid unter den angewandten Reaktionsbedingungen überhaupt nicht oxydiert wird. Auch bei der Reduktion mit Zink und Salzsäure wird das 5-Ring-Disulfid augenblicklich bei Zimmertemperatur reduziert, während ein 6-Ring-Disulfid bedeutend langsamer reagiert, und ein offenkettiges Disulfid erhitzt werden muß.

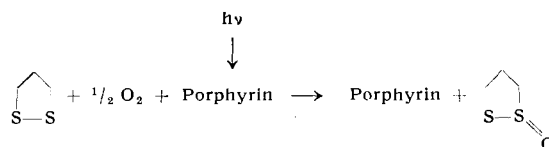
Das Sulfoxyd der  $\alpha$ -Liponsäure, für dessen Konstitution es drei Möglichkeiten gibt (I, II, III) bildet sich außerordentlich leicht. Es ist noch nicht genau bekannt, durch welche Stoffe die Sulfoxyd-Bildung katalysiert wird. Schon bei der Papierchromatographie eines analysenreinen Präparates von  $\alpha$ -Liponsäure, erhält man stets etwas Sulfoxyd.



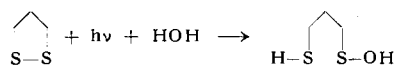
Aus  $\alpha$ -Liponsäure und Thiol-Verbindungen, wie z. B. reduziertem Glutathion, Cystein, Thioäpfelsäure und  $\beta$ -Mercapto-äthylamin bilden sich gemischte Disulfide mit biologischer Aktivität<sup>34)</sup>.

Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung der  $\alpha$ -Liponsäure bei der Photosynthese haben Calvin und Mitarbeiter<sup>30)</sup> die Photochemie der  $\alpha$ -Liponsäure bzw. des Trimethyldisulfides näher untersucht. Die Photolyse des Trimethyldisulfides in neutraler Lösung führt zur Polymerisation, wahrscheinlich über die Stufe eines Biradikals. Säure verhindert die Polymerisation.

Bei Gegenwart eines Porphyrins und Licht wird die Oxydation zum Sulfoxyd sensibilisiert.



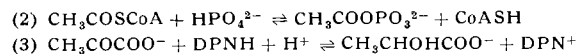
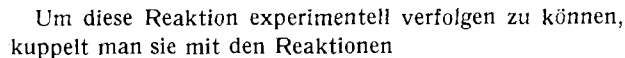
Die Photolyse in Gegenwart von Säure führt wahrscheinlich zu einem Thiol und einer Sulfensäure.



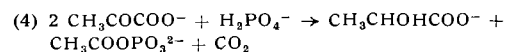
<sup>34)</sup> L. J. Reed, B. G. De Busk, C. S. Hornberger, jr., u. I. C. Gunsalus, J. Amer. chem. Soc. 75, 1271 [1953].

a) Coenzym der Decarboxylierung der Brenztraubensäure

Die von *Ochoa*<sup>35)</sup> untersuchte Oxydation von Brenztraubensäure durch zellfreie Extrakte von *E. Coli* verläuft nach folgender Bruttogleichung:

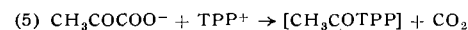


wodurch das CoASH und das DPN<sup>+</sup> laufend regeneriert werden. Als Gesamtreaktion ergibt sich dann



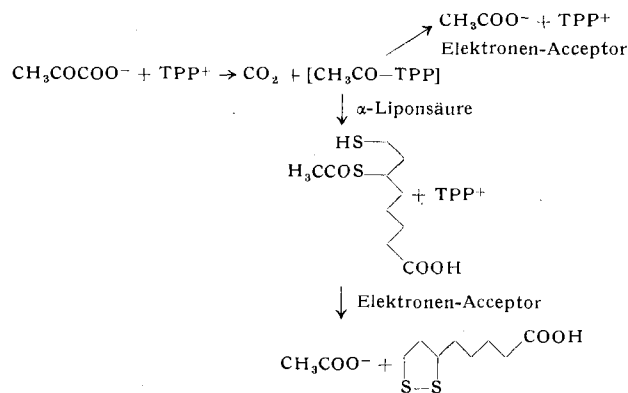
Diese Reaktion bezeichnet man als die Dismutation der Brenztraubensäure.

Der erste Schritt bei der Brenztraubensäure-Oxydation ist eine enzymatische Decarboxylierung, bei der Thiaminpyrophosphat (TPP) (Thiamin-Vitamin B<sub>1</sub>) beteiligt ist. Wahrscheinlich bildet sich zunächst ein Acetaldehyd-Thiaminpyrophosphat-Komplex („aktiver Acetaldehyd“) nach,



dessen weiterer Stoffwechsel von der Natur der anwesenden Verbindungen in dem betreffenden System abhängt.

Wie *Gunsalus* und *Dolin*<sup>36, 37)</sup> fanden, wird die Brenztraubensäure durch eine Fraktion A aus zellfreien Extrakten von *E. Coli*, welche die  $\alpha$ -Liponsäure in fester Bindung enthält, unter Zugabe von Thiaminpyrophosphat decarboxyliert. Die Reaktion läßt sich durch Arsenit und Schwermetalle hemmen, was für eine Beteiligung der  $\alpha$ -Liponsäure bei dieser Reaktion spricht, da Arsenit Enzyme hemmt, die Thiol-haltige Wirkungsgruppen tragen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden *Moyed* und *O'Kane*<sup>38)</sup> bei der Decarboxylierung von Brenztraubensäure mit einer Proteinfraction aus zellfreien Extrakten von *Proteus vulgaris*, daß Thiaminpyrophosphat und  $Mn^{2+}$  für die Aktivität des Enzymes benötigt werden, die Reaktion aber nicht durch Arsenit gehemmt wird. Entfernt man bei der gleichen Reaktion mit zellfreien Extrakten

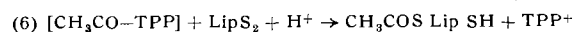


Schema I  
Decarboxylierung der Brenztraubensäure mit und ohne Beteiligung  
der  $\alpha$ -Liponsäure

aus *T. pyriformis* die  $\alpha$ -Liponsäure durch Absorption an Aluminiumoxyd, so hat dies ebenfalls keinen Einfluß auf die Reaktion<sup>39</sup>). Die  $\alpha$ -Liponsäure ist in diesem Falle jedoch für die Acetylierung des CoASH notwendig. Es scheint daher, als ob zwei verschiedene Mechanismen für die Decarboxylierung der Brenztraubensäure existierten, von denen der eine  $\alpha$ -Liponsäure benötigt, der andere nicht. Dies ist im Schema I angedeutet.

Am primären Decarboxylierungsschritt ist die  $\alpha$ -Liponsäure in keinem Falle beteiligt. Der nachfolgende Oxydationsschritt verläuft je nach beteiligtem Enzym mit oder ohne  $\alpha$ -Liponsäure.

Bei den meisten Extrakten aus tierischen Geweben oder Mikroorganismen, welche die Fähigkeit besitzen aus Brenztraubensäure Acetyl-Coenzym A zu bilden (Gleichung 1), folgt der Bildung des Acetaldehyd-Thiaminpyrophosphat-Komplexes die Reaktion



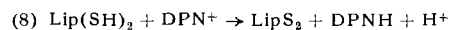
(LipS<sub>2</sub> = oxydierte Form, Lip(SH)<sub>2</sub> = reduzierte Form der α-Liponsäure)

Die Acetyl-Gruppe wird auf die  $\alpha$ -Liponsäure übertragen, wodurch der Disulfid-Ring geöffnet wird und sich die acetylierte Form der Dihydro- $\alpha$ -Liponsäure und freies TPP<sup>+</sup> bilden. Die  $\alpha$ -Liponsäure wirkt also gleichzeitig als Acetyl-Acceptor und als Codehydrogenase. Dies ist aus Versuchen von *Gunsalus*<sup>40)</sup> zu schließen, der fand, daß sich die S-Acetyl-dihydroliponsäure anreicherte, wenn die Fraktion A aus *E. Coli* mit Brenztraubensäure, TPP, Mg<sup>2+</sup> und stöchiometrischen Mengen von  $\alpha$ -Liponsäure inkubiert wurde. Die Acetyl-Gruppe kann dann von der  $\alpha$ -Liponsäure auf CoASH unter Bildung von Acetyl-Coenzym A übertragen werden<sup>41)</sup>.

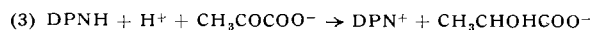
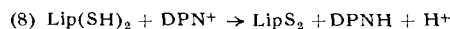
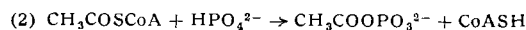
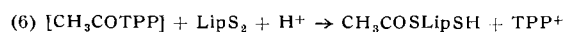
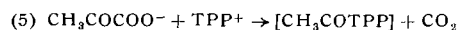


*Gunsalus* und Mitarbeiter<sup>42)</sup> benutzten die Umkehr dieser Reaktion, um die S-Acetyl-dihydroliponsäure enzymatisch mit einem Enzym aus *E. Coli* darzustellen. Das Ferment, welches den Namen Dihydroliponsäure-transacetylase erhielt, ist spezifisch für die (–)-Dihydroliponsäure, welche durch Reduktion der (+)- $\alpha$ -Liponsäure entsteht. Die enzymatisch gebildete Acetyl-Verbindung ist die 6-S-Acetyl-dihydroliponsäure, während bei der Acetylierung von Dihydroliponsäure mit Acetanhydrid in Pyridin die 8-S-Acetyl-dihydroliponsäure entsteht.

Fraktion B aus *E. Coli* enthält ein Enzym (Liponsäure-Dehydrogenase), welches die reduzierte Form der  $\alpha$ -Liponsäure zur Disulfid-Form oxydiert<sup>41</sup>).



Dieses Ferment oxydiert sowohl die (+)- wie auch die (–)- $\alpha$ -Liponsäure. Nach diesen Ergebnissen läßt sich für die Dismutation der Brenztraubensäure (Gleichung 4) folgendes Reaktionsschema aufstellen:



<sup>35)</sup> S. Korkes, A. Del Campillo, I. C. Gunsalus u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 193. 721 [1951].

<sup>36)</sup> I. C. Gunsalus, J. cell. comp. Physiol. 41, Suppl. 1, 113 [1953].  
<sup>37)</sup> M. I. Dolin, J. Bacteriol. 60, 51 [1955].

<sup>38)</sup> H. S. Moyed u. D. J. O'Kane, Arch. Biochem. Biophysics 39, 457 [1952].

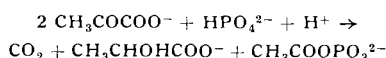
<sup>39)</sup> G. R. Seaman, Proc. Soc. exper. Biol., N. Y., 80, 308 [1952].

40) I. C. Gunsalus, *Feder. Proc.* **13**, 715 [1954].

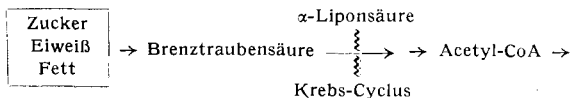
41) I. C. Gunsalus: The Mechanism of Enzyme Action; John Hopkins Press 1954, S. 545.

42) I. C. Gunsalus, L. S. Barton u. W. Gruber, J. Amer. chem. Soc. 78, 1763 [1956].

Die Summe dieser Reaktionen ergibt:



Bei Reaktion 2 kann bekanntlich die Acetyl-Gruppe auch auf andere Acceptor-Molekeln übertragen werden, so z. B. auf die Oxalessigsäure, wobei mit Hilfe des „condensing enzyme“ Citronensäure gebildet wird. Die  $\alpha$ -Liponsäure steht also im Stoffwechselgeschehen zwischen der Brenztraubensäure und dem Acetyl-CoA.



Für die oxydative Spaltung des Diacetyls durch *S. faecalis* wird außer Thiaminpyrophosphat und  $\text{Mg}^{2+}$  auch  $\alpha$ -Liponsäure gebraucht. Dabei bildet sich ebenfalls die Acetyldihydro-liponsäure<sup>38)</sup>.

#### b) Weitere mögliche biologische Funktionen der $\alpha$ -Liponsäure

Da die  $\alpha$ -Liponsäure in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln vorkommt, konnten bisher noch keine Mangelerscheinungen bei Fehlen von  $\alpha$ -Liponsäure festgestellt werden. Es ist also noch nicht entschieden, ob die  $\alpha$ -Liponsäure Vitamincharakter hat. Durch Fütterung des Antagonisten der  $\alpha$ -Liponsäure, der 8-Methyl- $\alpha$ -liponsäure, besteht die Möglichkeit, bei Versuchstieren einen künstlichen Mangel an  $\alpha$ -Liponsäure zu erzeugen. In dieser Hinsicht liegen jedoch noch keine experimentellen Ergebnisse vor. *De Busk* und *Williams*<sup>43)</sup> konnten lediglich zeigen, daß bei Zusatz von  $\alpha$ -Liponsäure zu einer bestimmten Diät bei Kücken und Ratten das Wachstum zunahm und die Nahrungsausnutzung besser wurde.

Wie *Bradley* und *Calvin*<sup>44)</sup> fanden, wird die Sauerstoff-Entwicklung bei der Hill-Reaktion durch Zusatz von  $\alpha$ -Liponsäure beschleunigt. Die  $\alpha$ -Liponsäure ist möglicherweise bei der Photosynthese als Elektronen-Acceptor beteiligt. Dies ist bereits von *M. Calvin* in dieser Zeitschrift ausführlich diskutiert worden<sup>45)</sup>.

Da bei der Einwirkung von Licht auf Rhodopsin pro Molekül Rhodopsin 2 SH-Gruppen frei werden, vermutet *Strauss*<sup>46)</sup> die Teilnahme von  $\alpha$ -Liponsäure beim Sehvorgang.

#### Therapeutische Anwendung der $\alpha$ -Liponsäure bei Leberaffektionen

Bei Leberaffektionen, bei denen Störungen im Keto-säure-Stoffwechsel vermutet wurden, konnte *Rausch*<sup>47)</sup> durch intravenöse Injektion einer 0,2% wäßrigen Lösung von  $\alpha$ -Liponsäure eine Besserung des vegetativen Symptomenkomplexes erzielen. Beim Leberkoma gelang es die Bewußtlosigkeit durch Injektion von  $\alpha$ -Liponsäure zu unterbrechen. Gleiche Ergebnisse erhielten kürzlich auch amerikanische Forscher<sup>48)</sup>.

<sup>43)</sup> B. G. De Busk u. R. J. Williams, Archiv. Biochem. Biophysics 55, 587 [1955].

<sup>44)</sup> D. F. Bradley u. M. Calvin, ebenda 53, 99 [1954].

<sup>45)</sup> M. Calvin, diese Ztschr. 68, 263 [1956].

<sup>46)</sup> B. S. Strauss, Science [Washington] 118, 330 [1953].

<sup>47)</sup> F. Rausch, Arzneimittelforsch. 5, 32 [1955].

<sup>48)</sup> F. Steigmann u. S. M. Canaknati, Feder. Proc. 15, 487 [1956].

#### Biologisch aktive Formen der $\alpha$ -Liponsäure

*Reed* und *De Busk*<sup>49)</sup> schlossen aus Versuchen mit einer *E. Coli*-Mutante, daß ein Amid aus  $\alpha$ -Liponsäure und Thiaminpyrophosphat, das sog. „lipothiamide“ (LPTT), die biologisch aktive Form der  $\alpha$ -Liponsäure bei der oxydativen Decarboxylierung der Brenztraubensäure ist. Diese Befunde konnten aber bisher nicht bestätigt werden und sind auf Widerspruch gestoßen. *Gunsalus*<sup>51)</sup> fand, daß die Dialyse der Fraktion A aus *S. faecalis* gegen alkalisches Pyrophosphat und Äthylendiamin-tetraessigsäure das Thiaminpyrophosphat entfernt, wodurch das Enzymsystem inaktiviert wird. Die Aktivität kann dann durch einfaches Zufügen von Thiaminpyrophosphat wiederhergestellt werden. Diese Befunde wären bei einer covalenten Bindung zwischen der  $\alpha$ -Liponsäure und dem Thiaminpyrophosphat nicht verständlich. Die synthetischen Experimente zur Darstellung des Lipothiamids waren von *Reed* mit sehr unreiner  $\alpha$ -Liponsäure ausgeführt worden und konnten mit der kristallisierten Verbindung nicht wiederholt werden<sup>50)</sup>.

Schon *Gunsalus*<sup>10)</sup> hatte gefunden, daß die  $\alpha$ -Liponsäure in *S. faecalis* in mehreren Formen vorkommt: einer gebundenen Form, einer schwach sauren Form, einer stärker sauren Form und einer neutralen Form. Die schwach saure und stark saure Form wurden später als  $\alpha$ -Liponsäure und ihr Sulfoxyd identifiziert. Die wasserlöslichen Formen der  $\alpha$ -Liponsäure scheinen Protein-Komplexe zu sein<sup>51, 52)</sup>.

Durch Untersuchung des Stoffwechsels von <sup>35</sup>S markierter  $\alpha$ -Liponsäure in Grünalgen<sup>50, 53)</sup> konnten die verschiedenen biologisch aktiven Formen der Säure näher charakterisiert werden. Die neutrale Form ist ein Carboxylester der  $\alpha$ -Liponsäure, der in den Chloroplasten lokalisiert ist. Diese Form scheint für die Stimulierung der Hill-Reaktion durch die  $\alpha$ -Liponsäure verantwortlich zu sein.

Bei der  $\alpha$ -Ketobuttersäure-Oxydation ist zur Aktivität der  $\alpha$ -Liponsäure ein Enzymsystem, bestehend aus Coenzym A, Cocarboxylase, L-Cystein,  $\text{MgCl}_2$  und Phosphat, notwendig. Inkubiert man die  $\alpha$ -Liponsäure mit diesem Enzymsystem, so erreicht sie erst nach 30 min ihre volle Aktivität und geht dabei in eine gebundene, nicht dialysierbare Form über, die offenbar die eigentlich enzymatisch aktive Form der  $\alpha$ -Liponsäure ist<sup>54)</sup>.

Die vorliegende Übersicht und die eigenen Arbeiten über die  $\alpha$ -Liponsäure machte ich während meines Aufenthaltes im Laboratorium von Prof. Melvin Calvin an der Universität von Californien in Berkeley. Ich möchte auch an dieser Stelle für die gastliche Aufnahme, die ich dort fand, herzlich danken.

Eingegangen am 19. Juni 1956 [A 739]

<sup>49)</sup> L. J. Reed u. B. G. De Busk, J. biol. Chemistry 199, 881 [1952]; Feder. Proc. 13, 723 [1954].

<sup>50)</sup> H. Grisebach, C. Fuller u. M. Calvin, Biochim. Biophys. Acta, im Druck.

<sup>51)</sup> D. K. Sanadi, T. W. Littlefield u. R. M. Bock, J. biol. Chemistry 197, 851 [1952].

<sup>52)</sup> Jagannathan, Venkataraman u. R. S. Schweet, ebenda 196, 551 [1952].

<sup>53)</sup> R. C. Fuller, H. Grisebach u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 77, 2659 [1955].

<sup>54)</sup> F. R. Leach, K. Yasunobu u. L. J. Reed, Biochim. Biophys. Acta 18, 297 [1955].