

bei Photoreaktionen [73] benutzt worden. Es können Lebensdauern bis herab zu einigen msec. gemessen werden. *Fessenden* [142] hat verschiedene experimentelle Methoden beschrieben, nach denen derartig schnelle Reaktionen verfolgt werden können. Er konnte die Lebensdauer $\tau = 7,4 \pm 0,1$ msec. des durch Bestrahlung von Äthan mit 2,8 MeV-Elektronen gebildeten Äthylradikals bei -170°C messen. Aus der Temperaturabhängigkeit von τ konnte außerdem die Aktivierungsenergie der

[142] R. W. Fessenden, J. phys. Chem. 68, 1508 (1964).

Rekombinationsreaktion zu 830 cal/Mol berechnet werden.

Häufig ist bereits der Nachweis, daß bei einer Reaktion überhaupt Radikale beteiligt sind, von Bedeutung. Das trifft vor allem für biochemische Probleme zu, bei denen der Reaktionsablauf noch nicht geklärt ist. Die EPR-Spektren auftretender freier Radikale bestehen meist aus einer einzigen breiten Linie bei $g = 2$, so daß nur Linienbreite und Intensität quantitative Aussagen ermöglichen [143].

Eingegangen am 11. Januar 1965 [A 454]

[143] K. G. Zimmer, W. Köhnlein, G. Hotz u. A. Müller, Strahlentherapie 120, 161 (1963).

Chemie und Biochemie der α -Liponsäure

VON PROF. DR. ULRICH SCHMIDT UND DR. P. GRAFEN

CHEMISCHES LABORATORIUM, UNIVERSITÄT FREIBURG/BR. UND

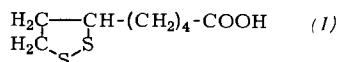
PRIV.-DOZ. DR. H. W. GOEDDE

ABT. BIOCHEMISCHE GENETIK, INSTITUT FÜR HUMANGENETIK UND ANTHROPOLOGIE,
UNIVERSITÄT FREIBURG/BR.

*Die physiologische Aufgabe der Liponsäure scheint hauptsächlich die Coenzymfunktion bei der oxydativen Decarboxylierung von α -Oxosäuren zu sein. Um zu prüfen, ob Liponsäure ein essentieller Wirkstoff für den höheren Organismus ist, wurden strukturveränderte Liponsäuren hergestellt, in der Hoffnung, Antagonisten zu erhalten. Nur 4-Oxa-liponsäureamid fördert das Wachstum von *S. faecalis* 8043; die anderen geprüften Substanzen verhalten sich inert oder hemmen das Wachstum. Bei Versuchen zur Hemmung und Substratspezifität der Lipoamid-oxydoreduktase mit strukturveränderten Liponsäuren wurden keine stark wirksamen Inhibitoren gefunden. — Im Hinblick auf die biologische Funktion der Liponsäure und ihre Reaktionsfähigkeit werden Ringspannung, Spektren und Öffnung des Rings bei Verbindungen mit dem 1,2-Dithiolanring diskutiert.*

A. Einführung

Liponsäure (1) wurde zuerst unter dem Namen Acetat-Ersatz-Faktor oder Protogen A als Wachstumsfaktor für manche Bakterien und Protozoen bekannt [1–7]. Sie ist in Tieren und Pflanzen weit verbreitet [*] und wirkt in vielen enzymatischen Reaktionen, vornehmlich bei oxydativen Decarboxylierungen, als Coenzym. Auf frühere Übersichten zur Chemie und Biochemie der Liponsäure sei



[1] B. M. Guirard, E. E. Snell u. R. J. Williams, Arch. Biochem. Biophysics 9, 381 (1946).

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

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

[4] L. J. Reed, B. G. de Busk, P. M. Johnston u. M. E. Getzen-daner, J. biol. Chemistry 192, 851 (1951).

[5] E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffman, M. A. Regan, D. Fordham u. T. H. Jukes, Arch. Biochem. Biophysics 20, 75 (1949).

[6] E. E. Snell u. H. P. Broquist, Arch. Biochem. Biophysics 23, 326 (1949).

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

[*] Zum chromatographischen Nachweis siehe [142].

hingewiesen [8–10]. Hier soll ausführlich über die chemischen Eigenschaften und die enzymatische Funktion der Liponsäure referiert werden. Die bislang noch umstrittene Wirkung der Liponsäure bei photosynthetischen Prozessen und in pharmakologischen Reaktionen wird nur kurz erwähnt werden. — Tabelle I zeigt die Enzyme, die bei liponsäureabhängigen Reaktionen eine

[8] H. Grisebach, Angew. Chem. 68, 554 (1956).

[9] L. J. Reed, Advances in Enzymol. 18, 319 (1957).

[10] L. J. Reed in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York 1960, S. 195.

[11] S. Korkes, A. Del Campillo u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 195, 541 (1952).

[12] D. R. Sanadi u. R. L. Searls, Biochem. biophysica Acta 24, 220 (1957).

[13] S. Kaufmann, C. Gilvarg, O. Cori u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 203, 869 (1953).

[14] R. S. Schweet u. K. Cheslock, J. biol. Chemistry 199, 749 (1952).

[15] M. Goldberg u. D. R. Sanadi, J. Amer. chem. Soc. 74, 4972 (1952).

[16] D. R. Sanadi u. J. W. Littlefield, J. biol. Chemistry 193, 683 (1951).

Tabelle 1. Enzyme und Enzymkomplexe, die bei liponsäureabhängigen Reaktionen eine Rolle spielen.

Enzym	Herkunft	Substrat	Lit.
Pyruvat-dehydrogenase-Komplex	Schweineherzmuskel	[a]	[11–13]
	Taubenbrustmuskel		[14–21]
	Pflanzen		[22]
	Hefe		[23, 24]
	<i>E. coli</i>		[21, 25–39]
	<i>S. faecalis</i>		[21, 38–43]
	<i>M. tuberculosis</i>		[44–46]
	<i>Cl. sporogenes</i>		[47, 48]
	<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>		[49]
	<i>Cl. saccharobutyricum</i>		[50]
	<i>A. aerogenes</i>		[51]
α -Oxoglutarat-dehydrogenase-Komplex	Schweineherzmuskel	[b]	[12, 13, 15, 21, 52–62]
	Taubenbrustmuskel		[13, 16]
	<i>E. coli</i>		[21, 27, 32, 33, 36]
	<i>S. faecalis</i>		[42, 43]
Liponsäure-reduktase-transacetylase oder -succinylase	<i>S. faecalis</i>	[c]	[63]
	<i>E. coli</i>		[26, 29–31, 64]
Lipoamid-oxydoreduktase	Schweineherzmuskel	[d]	[53–58, 65–77]
	Hefe		[78]
	<i>E. coli</i>		[26, 28, 30, 31, 37, 73, 79–81]
Lipo-amidase	Taubenleber	[d]	[82]
	<i>S. faecalis</i> od. Hefe		[84–86]
Liponsäureaktivierendes System	<i>E. coli</i>	[d]	[64, 83, 84, 87]
	<i>S. faecalis</i>		[41, 83, 84]

[a] Pyruvat; [b] α -Oxoglutarat; [c] (–)-6-S-Acetyl-dihydroliponsäure; [d] α -Liponsäure.

Rolle spielen. Die α -Oxosäure-oxidasen (oder -dehydrogenasen), z.B. Pyruvat-oxydase und α -Oxoglutarat-dehydrogenase, sind Multienzymkomplexe.

[17] R. S. Schweet, M. Fuld, K. Cheslock u. M. H. Paul in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1951, Bd. 1, S. 246.
 [18] S. Korkes in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1951, Bd. 1, S. 259.
 [19] V. Jagannathan u. R. S. Schweet, J. biol. Chemistry 196, 551 (1952).
 [20] R. S. Schweet, B. Katchman, R. M. Bock u. V. Jagannathan, J. biol. Chemistry 196, 563 (1952).
 [21] S. Ochoa, Advances in Enzymol. 15, 183 (1954).
 [22] D. A. Walker u. H. Beevers, Biochem. J. 62, 120 (1956).
 [23] H. Holzer u. H. W. Goedde, Biochem. Z. 329, 175 (1957).
 [24] A. Alvarez, E. Vanderwinkel u. J. M. Wiame, Biochim. biophysica Acta 28, 333 (1958).
 [25] H. Fernandez-Moran, L. J. Reed, M. Koike u. R. Willens, Science (Washington) 145, 930 (1964).
 [26] L. J. Reed: Abstr. 6. int. Congr. Biochem., New York, 1964.
 [27] M. L. Das, M. Koike u. L. J. Reed, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 753 (1961).
 [28] L. P. Hager, J. biol. Chemistry 229, 251 (1957).
 [29] A. D. Gounaris u. L. P. Hager, J. biol. Chemistry 236, 1013 (1961).
 [30] L. P. Hager u. H. L. Kornberg, Biochem. J. 78, 194 (1961).
 [31] M. Koike u. L. J. Reed, J. biol. Chemistry 236, Nr. 6, PC 33 (1961).
 [32] M. Koike u. L. J. Reed, J. biol. Chemistry 235, 1931 (1960).
 [33] H. Nawa, W. T. Brady, M. Koike u. L. J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 82, 896 (1960).

B. Zur Struktur liponsäurehaltiger Enzyme

Das bestuntersuchte liponsäurehaltige Enzym ist die Pyruvat-oxydase aus *E. coli*, ein Multienzymkomplex vom Molekulargewicht ca. $4,8 \cdot 10^6$ [25, 26].

Der Proteinkomplex konnte in Pyruvat-decarboxylase (2), Liponsäure-reduktase-transacetylase (3) und Lipoamid-oxydoreduktase (4) getrennt werden. Die Molekulargewichte der drei Enzyme betragen $1,83 \cdot 10^5$, $1,6 \cdot 10^6$ und $1,12 \cdot 10^5$; die Liponsäure-reduktase-transacetylase soll aus Untereinheiten vom Molekulargewicht 26000 bestehen.

Der Gesamtkomplex soll etwa 16 Moleküle Decarboxylase, 64 Untereinheiten der Liponsäure-reduktase-transacetylase und 8 Moleküle Lipoamid-oxydoreduktase enthalten. Die Enzymkomponenten sollen räumlich fixiert sein. Diese Vorstellung stützten Reed und Mitarbeiter [25, 26] durch elektronenmikroskopische Untersuchungen. Für den Gesamtkomplex diskutierten sie eine Art Scheibe mit ≈ 350 Å Durchmesser und ≈ 250 Å Höhe. Für die Enzymkomponenten (2), (3) und (4) wurden Durchmesser von 75, 40 bzw. 64 Å eingesetzt. Zwei übereinanderliegende Ringe aus je 8 Molekülen Pyruvat-decarboxylase (2) und 4 Molekülen Lipoamid-oxydore-

[34] C. H. Chin u. I. C. Gunsalus, Federat. Proc. 13, 191 (1954).
 [35] M. Koike u. L. J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 81, 505 (1959).
 [36] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, J. biol. Chemistry 235, 1924 (1960).
 [37] L. J. Reed u. M. Koike, Federat. Proc. 18, 308 (1959).
 [38] S. Korkes, A. Del Campillo, I. C. Gunsalus u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 193, 721 (1951).
 [39] S. Korkes, J. R. Stern, I. C. Gunsalus u. S. Ochoa, Nature (London) 166, 439 (1950).
 [40] I. C. Gunsalus, Federat. Proc. 13, 715 (1954).
 [41] F. R. Leach, K. Yasunobu u. L. J. Reed, Biochem. biophysica Acta 18, 297 (1955).
 [42] M. I. Dolin u. I. C. Gunsalus, Federat. Proc. 11, 203 (1952).
 [43] I. C. Gunsalus, J. cellular comparat. Physiol. 41 (Suppl. 1), 113 (1953).
 [44] D. S. Goldman, Biochim. biophysica Acta 45, 279 (1960).
 [45] L. J. Reed in: Proc. int. Sympos. Enzyme Chemistry. Maruzen, Tokio 1958, S. 71.
 [46] D. S. Goldman, Biochim. biophysica Acta 27, 513 (1958).
 [47] B. Nisman, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 230, 248 (1950).
 [48] B. Nisman u. S. B. Wiesendanger, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 238, 292 (1954).
 [49] M. J. Wolin, J. B. Evans u. C. F. Niven, Arch. Biochem. Biophysics 58, 356 (1955).
 [50] B. Nisman u. J. Mager, Nature (London) 169, 709 (1952).
 [51] H. J. Strecker u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 209, 313 (1954).
 [52] D. R. Sanadi, M. Langley u. R. L. Searls, J. biol. Chemistry 234, 178 (1959).
 [53] V. Massey, Biochim. biophysica Acta 38, 447 (1960).
 [54] R. L. Searls u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 236, 580 (1961).
 [55] R. L. Searls, J. M. Peters u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 236, 2317 (1961).
 [56] R. L. Searls u. D. R. Sanadi, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 697 (1959).
 [57] R. L. Searls u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 235, 2485 (1960).
 [58] R. L. Searls u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 235, Nr. 8, PC 32 (1960).
 [59] D. R. Sanadi, J. W. Littlefield u. R. M. Bock, J. biol. Chemistry 197, 851 (1952).
 [60] D. R. Sanadi u. R. L. Searls, Federat. Proc. 16, 241 (1957).
 [61] S. Kaufman in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1951, Bd. 1, S. 370.

duktase (4) umgeben dabei ein Aggregat aus 64 Untereinheiten der Liponsäure-reduktase-transacetylase (3), die in vier Stapeln angeordnet sind. Die Abbildung 1 zeigt ein Modell für diese Vorstellungen.

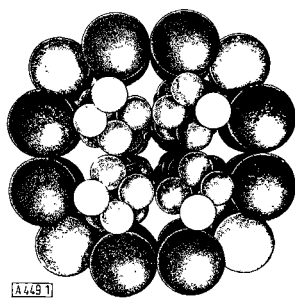
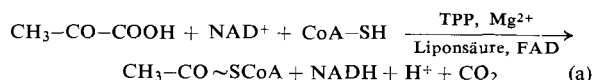


Abb. 1. Modell zur Struktur der Pyruvat-dehydrogenase [25, 26]. Große Kugeln: Pyruvat-decarboxylase (2); mittlere Kugeln: Liponamid-oxydoreduktase (4); kleine Kugeln: Untereinheiten der Liponsäure-reduktase-transacetylase (3). Nachgedruckt aus Science 145, 930 (1964) mit Erlaubnis des Copyright-Inhabers.

C. Coenzymwirkung der Liponsäure in Oxydase- und Dehydrogenase-Systemen

Die Reaktionsweise dieser Oxydasen soll am Beispiel der Umsetzung des bestuntersuchten Substrates, des Pyruvates, erklärt werden: Die Gesamtreaktion der oxydativen Decarboxylierung benötigt als Coenzyme Thiamin-

pyrophosphat (TPP) Mg^{2+} , Nicotinamidadenin-dinucleotid (NAD), Liponsäure (4), Coenzym A und Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) [Gl. (a)][*].



Die im Abschnitt B genannten Enzyme (2), (3) und (4) katalysieren die Reaktion. Sie wird durch die Bildung des „aktiven Acetaldehyds“, des 2-(α -Hydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphates (HETPP) [88–91], über eine Thiaminpyrophosphat-(TPP)-Pyruvatverbindung [91] eingeleitet. Abbildung 2 zeigt schematisch die Teilreaktionen.

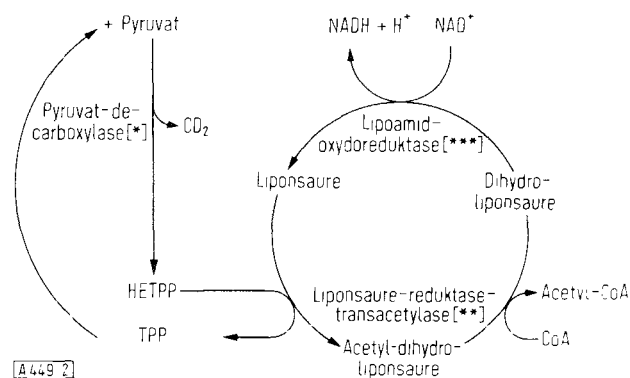


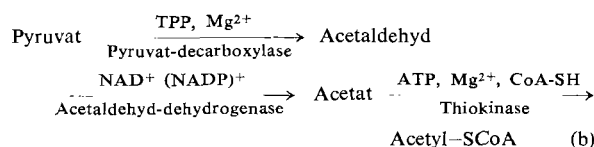
Abb. 2. Teilreaktionen der Oxydation von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A durch den Pyruvatoxydase-Multienzymkomplex.

[*] Obwohl die drei angegebenen Enzymproteine tatsächlich isoliert wurden, werden in der neuen Nomenklatur der „Enzyme Commission“ die decarboxylierenden, liponsäurereduzierenden und -acetylierenden Aktivitäten zusammengefaßt unter der Bezeichnung Pyruvat-Lipoat-oxydoreduktase (Acceptor acetylierend) EC 1. 2. 4. 1. (entsprechend beim 2-Oxoglutarat-Abbau: 2-Oxoglutarat-Lipoat-oxydoreduktase (Acceptor acetylierend) EC 1. 2. 4. 2).

[**] Die transacetylierende Aktivität zum Coenzym A wird von der „Enzyme Commission“ als Acetyl-CoA: Dihydrolipoat-S-acetyltransferase EC 2. 3. 1. 12. bezeichnet.

[***] EC 1. 6. 4. 3.

Der Abbau des Pyruvats in Hefezellen ist besonders interessant, weil hier zwei Wege für die Reaktion des Pyruvats zum Acetyl-Coenzym-A möglich sind. Gleichung (b) zeigt einen



[*] Abkürzungen:

HETPP = 2-(α -Hydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphat
 TPP = Thiaminpyrophosphat
 FAD = Flavin-adenin-dinucleotid
 NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid
 NADH = hydriertes NAD
 NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
 CoA = Coenzym A
 ATP = Adenosintriphosphat
 ADP = Adenosindiphosphat
 LipS₂ = Liponsäure
 Lip(SH)₂ = Dihydroliponsäure
 P = Phosphat
 DCP = 2,6-Dichlorphenolindophenol

[87] L. J. Reed u. B. G. De Busk, Federat. Proc. 13, 723 (1954).

[88] H. Holzer, Angew. Chem. 73, 721 (1961).

[89] H. W. Goedde, Int. Z. Vitaminforsch. 33, 18 (1963).

[90] H. W. Goedde, C. Stahlmann, B. Ulrich u. H. Holzer, Biochem. Z., 1964 (im Druck).

[91] H. Holzer u. K. Beaucamp, Biochim. biophysica Acta 46, 225 (1961).

von *Das* und Mitarbeitern [27] machten das Auftreten von Acetyl-TPP bei Reaktionen mit unphysiologischen Elektronenacceptoren wahrscheinlich. *Holzer* und *Goedde* [99] konnten in einer TPP-abhängigen Reaktionsfolge an Hefepyruvat-decarboxylase bei Gegenwart von 2,6-Dichlorphenolindophenol und in Abwesenheit von Liponsäure die Bildung von Acetat aus Pyruvat nachweisen. Weitere Versuche [100] ließen auf die intermediäre Bildung von Acetyl-TPP in der Reaktionsfolge (f) schließen.

Pyruvat \rightarrow 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP

$$\begin{array}{c}
 \text{I}_3\text{-CO-CO}_2\text{H} + \text{H}_3\text{C-N}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-N}^+\text{CH}_3\text{S-}(\text{CH}_2)_2\text{-OP}_2\text{O}_6\text{H}_3 \\
 \text{TPP} \\
 \downarrow \\
 \text{CO}_2 + \text{H}_3\text{C-N}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-N}^+\text{CH}_3\text{S-}(\text{CH}_2)_2\text{-OP}_2\text{O}_6\text{H}_3 \\
 \text{HETPP}
 \end{array}
 \quad (c)$$

Bei Wiederholung dieser Versuche mit mehreren Enzymen [11,23,51,101] und Acceptoren und ausgehend von [¹⁴C]-HETPP statt Pyruvat ließ sich jedoch kein [¹⁴C]-Acetyl-TPP nachweisen. Bislang ist über das Auftreten von Acetyl-TPP bei Pyruvat- und α -Oxoglutarat-Oxydationen unter physiologischen Bedingungen nichts bekannt.

Liponsäure-reduktase-transacetylase wurde von *Sanadi* und Mitarbeitern [52, 104] sowie von *Goldmann* [44] ausgehend von Pyruvat-oxydase aus *M. tuberculosis* dargestellt. Die Reinigung des Enzyms aus *E. coli*-Mutanten gelang *Hager* und Mitarbeitern [28–30]. Nach *Reed* [84] reagiert das Enzym mit beiden enantiomorphen Formen von Liponsäureamid. *Hager* und *Kornberg* [30] entwickelten einen Test für die Liponsäure-transsuccinylase aus *E. coli*-Mutanten. Sie stellten zunächst Succinyl-Coenzym A mit Hilfe von Succinathiokinase her [Gl. (g)], das sie mit Dihydroliponsäure umsetzten [Gl. (h)]. Diese Reaktion wird von der Liponsäure-transsuccinylase katalysiert.

$$\text{ATP} + \text{Succinat} + \text{CoA-SH}$$
$$\text{Succinyl-S-CoA} + \text{Lip(SH)}_2$$
$$\begin{array}{ccc} \text{---S---}(\text{CH}_2)_4\text{---CO}_2\text{H} & + \text{HETPP} \rightarrow & \text{HS---}(\text{CH}_2)_4\text{---CO}_2\text{H} \\ (1) & & (1a) \end{array} \quad + \text{TPP} \quad (d)$$

Die aus S-Succinyl-dihydroliponsäure und Hydroxylamin erhaltene Succinylhydroxamsäure wurde quantitativ bestimmt (siehe auch [105]).

Bei den in Abbildung 2 geschilderten Reaktionen scheint (-)-Dihydroliponsäure die biologisch aktive Form zu sein. Versuche von *Reed* [32,84] ergaben, daß Liponsäure-reduktase-transacetylase mit enzym-gebundener und mit freier S-Acetyl-dihydroliponsäure reagieren kann. Auch die Lipoamid-oxydoreduktase-Reaktion ist nicht abhängig von proteingebundener Liponsäure. Dagegen wird für Reaktion (d) enzym-gebundene Liponsäure benötigt.

- [99] *H. Holzer u. H. W. Goedde, Biochem. Z. 329, 192 (1957).*
 [100] *H. Holzer u. R. M. M. Crawford, Nature (London) 188, 410 (1960).*
 [101] *H. W. Goedde u. B. Ulrich, unveröffentlicht.*
 [102] *I. C. Gunsalus, J. Vitaminol. (Kyoto) 4, 52 (1958).*
 [103] *I. C. Gunsalus: Abstr. Amer. chem. Soc. 133. Meeting 1958, 3c.*
 [104,105] *D. R. Sanadi, M. Langley u. F. White, J. biol. Chemistry 234, 183 (1959).*

a) *Enzymatische Abspaltung enzymgebundener Liponsäure mit Lipoamidase und Reaktivierung des Apoenzyms*

Liponsäure-reduktase-transacetylase ist das einzige Enzym des Pyruvat-oxydase-Komplexes, das protein-gebundene Liponsäure enthält. Sie läßt sich mit einem Enzym aus Taubenleberextrakt abspalten [82, 106]. Nach *Reed* [33] ist die Liponsäure peptidähnlich mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Enzymprotein verbunden. Dem entspricht, daß Liponsäureamid und Dihydroliponsäureamid in Modellreaktionen wirksamer sind als freie Liponsäure [34, 107, 108]. *Reed* [33, 109] zeigte, daß die Reduktion von N(ϵ)-DL-Lipoyl-L-lysin durch NADH mit Lipoamid-oxydoreduktase aus *E. coli* dreimal so schnell verläuft wie die Reduktion von DL-Liponsäureamid.

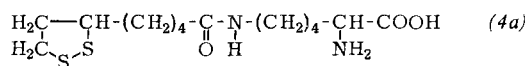
Zur Bindung der Liponsäure an das Apoenzym werden zwei enzymatische Reaktionen benötigt: 1. Die ATP-abhängige Aktivierung der Liponsäure, wobei Lipoyl-adenylat gebildet wird und 2. der Übergang des Lipoylrestes zum Apoenzym. Man inkubiert das Apoenzym mit ATP und Liponsäure (oder synthetischem Lipoyl-adenylat) und einem „liponsäureaktivierenden System“ aus *S. faecalis* oder *E. coli* [83, 109] und kann Liponsäure-reduktase-transacetylase, von der Liponsäure abgespalten wurde, dadurch reaktivieren.

b) *Bindungsart und Aminosäuresequenz an der Stelle der Liponsäure-Protein-Bindung*

Oxosäure-oxydasen mit radioaktiv markierter Liponsäure lassen sich auf zwei Wegen gewinnen:

1. *E. coli*-Stämme werden unter Zusatz von [^{35}S]-Liponsäure gezüchtet.
2. Nach Einwirkung von Lipoamidase auf Oxosäure-oxydase wird das Apoenzym durch Ultrazentrifugation bei 144000 g isoliert und dann mit ATP, [^{35}S]-Liponsäure und „liponsäure-aktivierendem System“ reaktiviert.

Oxosäure-oxydasen, die markierte Liponsäure gebunden enthielten, wurden mit Perameisensäure oxydiert und mit 12 N HCl 3 Std. bei 100 °C hydrolysiert. Anschließend konnte N(ϵ)-Lipoyl-L-lysin (4a) isoliert werden [*],



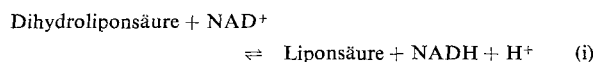
dessen vollständige Hydrolyse L-Lysin und Liponsäure im Verhältnis 1:1 ergab [41, 45, 83]. *Goldman* bestätigte diese Ergebnisse.

- [106] G. R. Seaman, J. Amer. chem. Soc. 76, 1712 (1954).
 [107] V. Massey, Biochim. biophysica Acta 30, 205 (1958).
 [108] H. W. Goedde, unveröffentlicht.
 [109] H. Nawa, W. T. Brady, M. Koike u. L. J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 81, 2908 (1959).
 [110] R. L. Peck, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 74, 1999 (1952).
 [111] L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, T. R. Wood, R. L. Peck, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 74, 1996 (1952).
 [*] Auch Biotin, das bei Carboxylierungsreaktionen eine große Rolle spielt (z.B. bei der Synthese der Fettsäuren) kommt ebenfalls an Lysin gebunden vor. Aus Hefeautolysaten konnte Biotinyl-L-lysine [N(ϵ)-Biotinyl-L-lysin] isoliert werden [110, 111].

Hochgereinigte Enzympräparate aus *E. coli* mit gebundener [^{35}S]-Liponsäure behandelte *Reed* mit Perameisensäure und hydrolysierte sie partiell. Die [^{35}S]-Peptide der Liponsäure wurden isoliert und identifiziert. Pyruvat-dehydrogenase zeigte die Sequenz Glycin-Asparagin-Lipoyllysin-Alanin, Oxoglutarat-dehydrogenase die Sequenz Threonin-Asparagin-Lipoyllysin-Valin-(Valin, Leucin)-Glutamin [112].

III. Lipoamid-oxydoreduktase

Dieses Flavin-adenin-dinucleotid-Enzym katalysiert die Reoxydation der Dihydroliponsäure durch NAD [Gl. (i)].



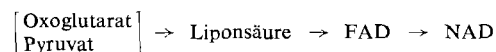
Seit 1958 wurde die Lipoamid-oxydoreduktase von mehreren Arbeitskreisen untersucht [35, 53–58, 65–73, 79, 84, 104, 107, 113–117]. Dieses Enzym ist das gleiche wie die von *Straub* [118] und *Savage* [74] aus Herzmuskel isolierte Diaphorase, die 1937 gleichzeitig durch v. *Euler* [119] und durch *Dewan* und *Green* [120, 121] entdeckt wurde. Das Enzym kann im optischen Test nach Gleichung (i) nachgewiesen werden [75] oder nach Gleichung (j),



wobei als Wasserstoffacceptoren Hexacyanoferrat(III) oder 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCP) benutzt werden können.

Anders als Liponsäure-reduktase-transacetylase zeigt Lipoamid-oxydoreduktase keine Spezifität für (+)- oder (–)-Liponsäure. *Basu* und *Burma* [122] erhielten jedoch aus *Spinacia oleracea* eine Lipoamid-oxydoreduktase, die im Gegensatz zu den Enzymen aus tierischen Organismen und Bakterien stereospezifisch nur mit der (–)-Dihydroliponsäure reagiert.

Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) vermag reversibel vom Enzym zu dissoziieren. Durch NADH oder Dihydroliponsäure wird das Enzym entfärbt, bei Zugabe von Liponsäure wird es wieder gelb. Daraus läßt sich schließen, daß Dihydroliponsäure durch FAD oxydiert wird und nicht direkt durch NAD, wie man früher annahm [63]. Die Folge bei der Elektronenübertragung ist demnach wahrscheinlich [37, 80]:



- [112] K. Daigo u. L. J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 84, 666 (1962).
 [113] V. Massey, Q. H. Gibson u. C. Veeger, Biochem. J. 77, 341 (1960).
 [114] C. J. Lusty, J. biol. Chemistry 238, 3443 (1963).
 [115] H. W. Goedde, P. Grafen u. U. Schmidt, Biochem. Z. 339, 23 (1963).
 [116] H. W. Goedde, C. Stahlmann, P. Grafen u. U. Schmidt, Arch. Mikrobiol. 45, 359 (1963).
 [117] H. W. Goedde u. U. Schmidt, unveröffentlicht.
 [118] F. B. Straub, Biochem. J. 33, 787 (1939).
 [119] H. v. Euler u. H. Hellström, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 252, 31 (1938).
 [120] J. G. Dewan u. D. E. Green, Nature (London) 140, 1097 (1937).
 [121] J. G. Dewan u. D. E. Green, Biochem. J. 32, 626 (1938).
 [122] D. K. Basu u. D. P. Burma, J. biol. Chemistry 235, 509 (1960).

a) Eigenschaften der Lipoamid-oxydoreduktase

Lipoamid-oxydoreduktase wurde in den Pyruvat-oxydase- und Oxoglutarat-dehydrogenase-Komplexen vieler Organismen [36, 53, 57, 80, 81] nachgewiesen (Tabelle 1) [123]. Hochgereinigte Enzymfraktionen der Lipoamid-oxydoreduktase sind sehr stark gelb, fluoreszieren und zeigen Absorptionsmaxima bei 273, 359 und 456 m μ sowie eine Schulter bei 480 m μ [37].

Das hochgereinigte Enzym enthält 1,16% FAD = 0,56% Riboflavin [74, 76]. Bei Überschuß von NADH verschwinden die Fluoreszenz und die Absorption bei 456 m μ . p-Chlorquecksilberbenzoat hemmt das Enzym; Glutathion hebt die Hemmung wieder auf [124].

Für Liponsäure und DL-Lipoamid ergeben sich pH-Optima von 5,6 bis 5,9 bzw. 6,5 bis 7,0 [107]. Sanadi erhielt für Lipoamid-oxydoreduktase aus Schweineherz-Oxoglutarat-dehydrogenase ein Reduktionspotential von etwa -0,34 Volt bei pH = 7,0 und 22 °C. Dazu wurde die Reduktion des Flavoproteins bei verschiedenen NADH/NAD-Gleichgewichten gemessen [56, 77].

Wechselzahl: Nach Messungen in der Acceptorreaktion (j) werden 8500 Mol Substrat pro Minute durch 10⁵ g Enzymprotein umgesetzt [76]. (Über Messungen bei der Liponsäureumsetzung siehe [71, 115] sowie Tabelle 2.)

Die ursprünglich diskutierte Möglichkeit, daß Lipoamid-oxydoreduktase durch Abbau aus Cytochrom-reduktase entsteht, konnte Massey [71] durch getrennte Aufarbeitung der beiden Enzyme aus Schweineherz und ihren folgenden Vergleich ausschließen.

b) Untersuchungen zur Wirkungsweise der Lipoamid-oxydoreduktase

Enzyme, die gebundene Liponsäure enthalten, wie z.B. Liponsäure-reduktase-transacetylase, werden durch Arsenit schon in Konzentrationen von 10⁻³ bis 10⁻⁵ M gehemmt [40, 52, 59, 66, 125-128]. (Über Hemmversuche mit anderen Arsenverbindungen sowie mit Schwermetallkationen siehe [104, 105, 128, 129]). Zusatz von Dithiolen, z.B. 2,3-Dimercaptopropanol, hebt die Arsenithemmung auf.

Auch hochgereinigte Lipoamid-oxydoreduktase, die keine gebundene Liponsäure enthält, wird durch Arsenit (oder Cd²⁺) gehemmt, jedoch nur, wenn man das Enzym durch gleichzeitige Inkubation mit NADH reduziert [55, 72, 66, 75]. Nach der Reduktion mit NADH sind 2 Mol SH-Gruppen pro Mol Enzym nachweisbar [55]. Offenbar spaltet das NADH eine im nativen Enzym vorhandene Disulfidbrücke zwischen zwei Cystein-

[123] Anmerkung bei der Korrektur: Nach Lusty und Singer, J. biol. Chemistry 239, 3733 (1964), ist die in Herzmitochondrien enthaltene Lipoamid-oxydoreduktase zu 23% in der α -Oxoglutaratdehydrogenase und zu 52% in der Pyruvat-oxydase gebunden. Die restlichen 25% liegen entweder als freies Enzym vor oder sind an einen noch unbekannten Enzymkomplex gebunden. In Lebermitochondrien betragen die Zahlen 6%, 66% und 28%. Die als „freie Lipoamid-oxydoreduktase“ bezeichnete Fraktion zeigt die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, Substratspezifität und Hemmung durch Arsenit wie Lipoamid-oxydoreduktase, die nach üblichen Verfahren aus Schweineherz oder Rinderleber angereichert worden ist.

[124] M. M. Weber u. N. O. Kaplan, Science (Washington) 123, 844 (1956).

[125] D. R. Sanadi, M. Langley u. F. White, Biochim. biophysica Acta 29, 218 (1958).

[126] R. A. Peters, Symposia Soc. exp. Biol. 3, 36 (1949).

[127] R. A. Peters, H. M. Sinclair u. R. H. S. Thompson, Biochem. J. 40, 516 (1946).

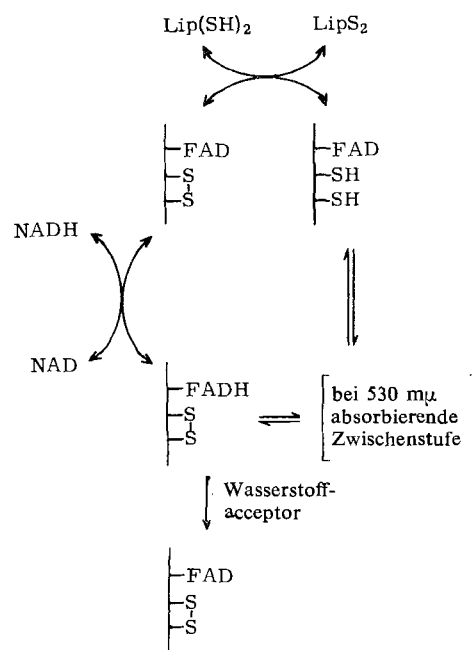
[128] O. K. Reiss, J. biol. Chemistry 233, 789 (1958).

[129] O. K. Reiss u. L. Hellermann, J. biol. Chemistry 231, 557 (1958).

resten. Da Massey [65, 130] bei der Ultrazentrifugation in 6,5 M Harnstofflösung für die reduzierte Form des Enzyms nur ein halb so großes Molekulargewicht fand wie für die native Form, ist anzunehmen, daß die Disulfidbrücke im nativen Enzym zwei Peptidketten miteinander verknüpft.

Die Arsenithemmung der Lipoamid-oxydoreduktase betrifft jedoch nur die Fähigkeit des Enzyms, Dihydroliponsäure zu oxydieren (oder Liponsäure zu reduzieren), d. h. Reaktion (i) wird vom gehemmten Enzym vermindert katalysiert. Hingegen wird die Katalyse der Wasserstoffübertragung vom NADH auf Hexacyanoferrat(III) oder 2,6-Dichlorphenolindophenol, d. h. die Katalyse der Reaktion (j), durch Arsenit nicht beeinträchtigt [55, 72]. Daraus scheint zu folgen, daß NADH zunächst das im Enzym enthaltene FAD reduziert (Schema 1). Erst vom FADH wird der Wasserstoff auf die Disulfidbrücke im Enzym unter Bildung zweier SH-Gruppen übertragen. Unter physiologischen Bedingungen reagiert das Enzym mit Dihydroliponsäure unter Reduktion der Disulfidbrücke. FAD übernimmt intermediär den Wasserstoff von den beiden SH-Gruppen (Rückbildung der Disulfidbrücke) und gibt ihn an NAD weiter. Künstliche Wasserstoffacceptoren (Hexacyanoferrat(III) oder 2,6-Dichlorphenolindophenol) übernehmen den Wasserstoff direkt vom FADH, d. h. ohne Mitwirkung von Thiolgruppen des Enzyms. Aus diesem Grund ist die Katalyse der Reaktion (j) arsenit-unabhängig.

Savage [74] zeigte, daß Zusatz von NADH zu Lipoamid-oxydoreduktase das Spektrum verändert. Die entstehende Verbindung ist stabil; es scheint ein Analogiefall zum Auftreten eines Flavin-semichinons vorzuliegen [131] (siehe auch [57, 113]). Das Maximum bei 530 m μ , das dem Enzym im reduzierten Zustand zuzuordnen ist, verschwindet bei Zugabe von Arsenit- oder Cadmium-Ionen. Im reduzierten



Schema 1. Wirkungsweise der Lipoamid-oxydoreduktase [55, 72].

[130] V. Massey, T. Hofmann u. G. Palmer, J. biol. Chemistry 237, 3820 (1962).

[131] H. Beinert, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

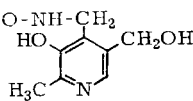
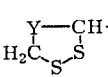
Enzym ließen sich ESR-spektroskopisch keine freien Radikale nachweisen. Der intramolekulare Elektronenübergang vom Enzym-Dithiol zum Flavin verläuft über ein Zwischenprodukt, welches ein Absorptionsmaximum bei etwa 530 m μ aufweist. Eine Zwischenverbindung des Enzyms, als „Charge-transfer-Komplex“ oder auch als „rote Form“ bezeichnet, untersuchten *Sanadi* und Mitarbeiter sowie *Massey* und Mitarbeiter [30, 52, 55, 58, 65, 66, 68, 69, 72, 113]. Die Struktur der Verbindung ist noch nicht gesichert.

D. Untersuchungen mit strukturveränderten Liponsäuren [133]

Bisher sind keine Avitaminosen oder Stoffwechselseitenwege bei Liponsäuremangel beschrieben worden. Die Frage, ob Liponsäure für den höheren Organismus ein essentieller Wirkstoff ist, scheint sich nur mit

In unserem Arbeitskreis wurden ebenfalls liponsäureähnliche Verbindungen synthetisiert [138, 139a, 139b]. Vor allem sollte geprüft werden, ob der vier Methylgruppen betragende Abstand zwischen Carboxygruppe und Ring oder die Länge der Kohlenstoffkette von insgesamt acht Gliedern charakteristisch und notwendig für die Wirkung der Liponsäure sei. Deshalb wurden Liponsäuren dargestellt, bei denen CH₂-Gruppen durch Heteroatome (O, S) ersetzt waren; außerdem wurde eine Liponsäure synthetisiert, in der der heterocyclische Kern in Richtung der Carboxygruppe verschoben war. Ferner wurden in Ring oder Seitenkette Hydroxygruppen und Carbonylsauerstoff eingeführt, da durch diese Substituenten häufig antagonistische Eigenschaften bei Wirkstoffen hervorgerufen werden. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die synthetisierten Verbindungen.

Tabelle 2. Michaelis-Konstanten und Wechselzahlen bei der Umsetzung abgewandelter Liponsäuren an Lipoamid-oxydoreduktase [a].

Abgewandelte Liponsäuren	Verb.	Michaelis-Konst. [Mol/l · 10 ⁻³]	Wechselzahl · 10 ³ [83]	Lit.
H-Z-(CH ₂) ₄ -COOH	(1)	2,3	3,15	[181]
H-Z-(CH ₂) ₄ -CONH ₂	(5)	2,8	14,0	[181]
H-Z-(CH ₂) ₄ -CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -OH <div style="text-align: center;">  </div>	(6)	1,54	—	[140]
Y-CH-(CH ₂) ₄ -COOH <div style="text-align: center;">  </div>	Y = CH-CH ₃ (7) Y = CH-OH (8) Y = CO (9)	— — 3,7	— — 4,65	[139a] [139a] [139a]
H-Z-CH ₂ -O-(CH ₂) ₂ -COOH	(10)	6,25	2,4	[138]
H-Z-CH ₂ -O-(CH ₂) ₂ -CONH ₂	(11)	4,0	13,1	[138]
H-Z-CH ₂ -CH(CH ₃)-(CH ₂) ₂ -COOH	(12)	11,0	2,54	[139a]
H-Z-(CH ₂) ₂ -S-CH ₂ -COOH	(13)	—	—	[139c]
H-Z-CO-(CH ₂) ₃ -COOH	(14)	5,0	0,96	[139a]
H-Z-(CH ₂) ₃ -CHF-COOH	(15)	3,2	9,87	[139b]
CH ₃ -(CH ₂) ₃ -Z-COOH	(16)	—	—	[138]

[a] Z = $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}- \\ | \quad | \\ \text{HC}-\text{S}-\text{S} \end{array}$

Hilfe von Liponsäure-Antagonisten klären zu lassen. Eine liponsäurefreie Diät ist kaum durchzuführen, weil Liponsäure in Nahrungsmitteln weit verbreitet ist und vermutlich auch durch die Darmflora gebildet wird.

Mehrere Arbeitskreise [134–137] synthetisierten liponsäureähnliche Verbindungen, bei denen die Carboxygruppe und die Zahl der Ringglieder variiert wurden. Im Bakterienwachstumsversuch zeigte lediglich ein Diastereomeres der 8-Methyl-liponsäure eine Hemmung.

Das Wachstum folgender Mikroorganismen ist liponsäureabhängig: *Tetrahymena pyriformis*, *Coryne bact. bovis*, *E. coli*-Mutanten und Milchsäurebakterien; absolut liponsäureabhängig ist das Wachstum der beiden erstgenannten Stämme. Bei anderen Bakterien (*Lactobacillus casei*, *L. arabinosis*, *S. lactis*, *S. faecalis* R., *S. faecalis* 8043) kann die Hemmung des Wachstums durch Substanzen wie Propionat durch Liponsäure wieder aufgehoben werden. Wir benutzten *S. faecalis* 8043, der von Propionat in einer Konzentration von 1–3 mg/ml gehemmt wird, nach Zusatz von Liponsäure sowie einigen abgewandelten Liponsäuren aber weiterwächst (vgl. Abb. 3). Die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmten wir im Trübungstest mit dem Photometer Zeiss PMQ II bei 660 m μ durch Messung der Extinktion [116].

[133] Zum chromatographischen Nachweis von Liponsäure siehe [142].

[134] M. W. Bullock, J. J. Hand u. E. L. R. Stokstad, J. Amer. chem. Soc. 79, 1975 (1957).

[135] R. C. Thomas u. L. J. Reed, J. Amer. chem. Soc. 78, 6150 (1956).

[136] E. L. R. Stokstad, Federat. Proc. 13, 712 (1954).

[137] E. L. Patterson, J. V. Pierce, E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffman, J. A. Brockman jr., F. P. Day, M. E. Macchi u. T. H. Jukes, J. Amer. chem. Soc. 76, 1823 (1954).

[138] U. Schmidt, H. Alpes, J. C. Loewenguth, P. Grafen u. H. W. Goedde, Liebigs Ann. Chem. 666, 201 (1963).

[139a] U. Schmidt, P. Grafen u. H. W. Goedde, Liebigs Ann. Chem. 670, 157 (1963).

[139b] U. Schmidt, J. Malone u. H. W. Goedde, unveröffentlicht.

[139c] D. Sorg, Dissertation, Universität Freiburg, 1961; A. Lütt-ringhaus u. D. Sorg, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

[140] DBP.-Anm. M 57881 IVD/12 p (20. Aug. 1963), E. Merck, Erf.: U. Schmidt.

I. Wachstums- und Hemmversuche an *S. faecalis* 8043 mit abgewandelten Liponsäuren [116, 138, 139a, 139b]

Die Ergebnisse des Wachstumstests zeigt Abbildung 3 [116]. Ersatz einer CH₂-Gruppe in der Kette zwischen Carboxygruppe und Ring durch ein S-Atom [3-Thialiponsäure (13)] oder ein O-Atom [4-Oxa-liponsäure

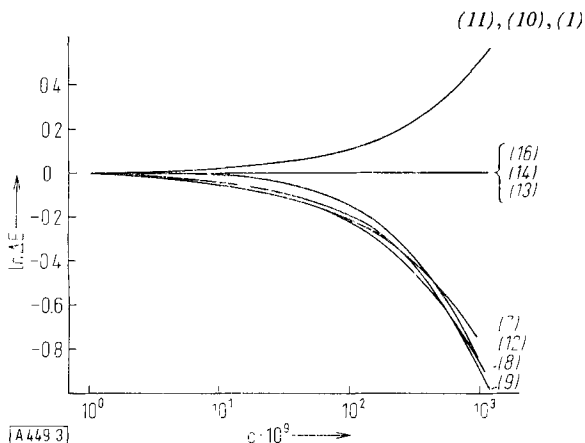


Abb. 3. Wachstumsgeschwindigkeit von *S. faecalis* 8043 unter Einwirkung abgewandelter Liponsäuren [116].

Abszisse: Konzentration *c* der abgewandelten Liponsäuren in 10⁻⁹ Mol/l. Ordinate: nat. Logarithmus der Extinktionsänderung ΔE pro Zeiteinheit bei $\lambda = 660$ m μ im Trübungstest (bezogen auf die Extinktion einer gleichen Lösung ohne Bakterien), für alle Kurven normiert auf $\Delta E = 1$ bei $c = 5 \cdot 10^{-9}/6,00$ Mol/l.

ΔE -Meßwerte für jeweils ein Derivat und eine Derivatkonzentration wurden arithmetisch gemittelt. Von diesen Mittelwerten ausgehend, wurden die einzelnen Meßreihen durch Ausgleichspolynome approximiert.

(7), (12), (8) und (9) hemmen das Wachstum; (16), (14) und (13) beeinflussen es nicht, während (11), ähnlich wie Liponsäure (1) selbst und auch 4-Oxa-liponsäure (10), es fördert.

(10)] ergibt Verbindungen, die sich entweder inert verhalten oder nur sehr schwach aktivierend auf das Wachstum von *S. faecalis* 8043 wirken.

Einführung einer Methylgruppe [4-Methyl-liponsäure (12)] in die CH₂-Kette erzeugt hemmende Wirkung; die Einführung einer Ketogruppe [5-Oxo-liponsäure (14)] hat keinen Einfluß. Substitution an den C-Atomen des Ringes ergibt Verbindungen mit Inhibitorwirkung: 7-Methyl-liponsäure (7), 7-Hydroxy-liponsäure (8), 7-Oxo-liponsäure (9) wie auch die von Stockstad synthetisierte 8-Methyl-liponsäure. Eine Änderung der Ringgröße oder der Stellung der Disulfidbrücke [2,4-Liponsäure, (16)] führt zu inertem Verhalten.

II. Versuche zur Hemmung und zur Substratspezifität der Lipoamid-oxydoreduktase mit abgewandelten Liponsäuren [115, 138, 139a, 139b]

Da Lipoamid-oxydoreduktase, die abgewandelte Liponsäuren enthält, auch mit freier Liponsäure nach Gleichung (i) reagiert, eignet sie sich besonders für Untersuchungen der Hemmung und Substratspezifität. In dem von Massey [53, 66, 71, 107] beschriebenen Test wurden Michaeliskonstanten, Wechselzahlen und Inhibitorkonstanten ermittelt (s. Tabelle 2). Eine konkurrierende Hemmung der Reduktion von Liponsäure tritt nur

mit 7-Methyl-liponsäure (7) und 3-Thialiponsäure (13) auf.

Die Inhibitorkonstante für 7-Methyl-liponsäure betrug $2,8 \cdot 10^{-3}$, für 3-Thia-liponsäure $8,0 \cdot 10^{-4}$. Die Ergebnisse erlauben folgende Aussagen:

2,4-Liponsäure (16) verhält sich inert; sie vermag offensichtlich keine Enzym-Substrat-Verbindung zu bilden. Ersetzt man das C-Atom 3 oder 4 in Liponsäure (1) durch ein Heteroatom, so tritt bei 3-Thia-liponsäure (13) völliger Verlust der Enzymaktivität ein, bei 4-Oxaliponsäure (10) herabgesetzte Affinität der Liponsäure zum Enzymprotein. 4-Oxaliponsäureamid (11) zeigt als einziges Liponsäurederivat fast die gleiche Aktivität wie Lipoamid. 4-Methyl- (12) und 5-Oxo-liponsäure (14) haben ähnliche Eigenschaften wie 4-Oxaliponsäure: Umsatzgeschwindigkeit und Affinität der Liponsäure zum Enzym sind herabgesetzt.

Substitution an C-7 ergibt unterschiedliche Effekte: 7-Methyl-liponsäure (7) wird an Lipoamid-oxydoreduktase nicht mehr umgesetzt, hemmt jedoch; 7-Hydroxy-liponsäure (8) verhält sich völlig inert; 7-Oxo-liponsäure (9) wird schneller umgesetzt als das physiologische Substrat, was auf einen aktivierenden Einfluß der Carbonylgruppe auf die S-S-Brücke schließen läßt. Die Amide der Liponsäure und Oxaliponsäure zeigen hohe Wechselzahlen und relativ große Michaeliskonstanten, ähnlich auch Lipoyl-pyridoxamin (6) (siehe auch [71, 107]). 2-Fluorliponsäure (15) [117] wirkt nicht inhibierend.

E. Weitere Reaktionen der Liponsäure

Die physiologische Rolle der Liponsäure scheint hauptsächlich in der Coenzymfunktion bei der oxydativen Decarboxylierung von α -Oxosäuren zu liegen. Für die oxydative Spaltung von Diacetyl durch *S. faecalis* [141] ist außer TPP und Mg²⁺ auch Liponsäure notwendig. Dabei wird intermediär Acetyl-dihydroliponsäure gebildet.

Calvin und Mitarbeiter [143–150] diskutierten eine Beteiligung von Liponsäure bei photosynthetischen Prozessen. In Versuchen mit [³⁵S]-Liponsäure bei Grünalgen charakterisierten sie mehrere biologisch aktive Formen der Liponsäure und forderten eine Beteiligung bei der Hill-Reaktion. Andere Untersuchungen [151] erbrachten jedoch widersprechende Resultate. Für eine Beteiligung von Dihydroliponsäure bei der Hill-Reaktion spricht, daß diese durch Chloroplastenpräparate aus Spinatblättern katalysierte Reaktion sehr empfindlich gegen Arsenit ist [152].

- [141] M. Brenner, A. Niederwieser u. C. Pataki, *Experientia* 17, 145 (1961).
- [142] L. Reio, *J. Chromatogr.* 4, 458 (1960).
- [143] M. Calvin, H. Grisebach u. R. C. Fuller, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 2659 (1955).
- [144] M. Calvin u. J. A. Barltrop, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 6153 (1952).
- [145] D. F. Bradley u. M. Calvin, *Arch. Biochem. Biophysics* 53, 99 (1954).
- [146] M. Calvin, *Angew. Chem.* 68, 263 (1956).
- [147] J. A. Barltrop, P. M. Hayes u. M. Calvin, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 4348 (1954).
- [148] M. Calvin, *Federat. Proc.* 13, 697 (1954).
- [149] D. F. Bradley u. M. Calvin, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 41, 563 (1955).
- [150] H. Grisebach, R. C. Fuller u. M. Calvin, *Biochim. biophysica Acta* 23, 34 (1957).
- [151] R. Lumry, J. D. Spikes u. H. Eyring, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 5, 271 (1954).
- [152] D. I. Arnon, M. B. Allen u. F. R. Whatley, *Biochim. biophysica Acta* 20, 449 (1956).

F. Pharmakologie der Liponsäure

Die therapeutische Anwendung der Liponsäure bei Leberkrankheiten ergab bisher keine übereinstimmenden Resultate. Enthusiastisch bewertete Befunde über Aufhebung des Leberkomas durch Liponsäure sind nicht bestätigt worden. Über einen günstigen Einfluß auf Leberaffektionen wird jedoch vielfach berichtet [153–159]. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über protektive und kurative Wirkungen der Liponsäure bei Vergiftungen mit Schwermetallen (As, Pb, Hg, Se, $\text{Ni}(\text{CO})_4$) – die Wirkung soll häufig der von BAL [*] überlegen sein – und bei experimentellen Leberschädigungen durch CCl_4 , Allylalkohol und Narkotika. Aussichtsreich erscheint die klinische Prüfung gut resorbierbarer Liponsäure-derivate, z. B. (6) [140], die auch besonders leicht in die liponsäurehaltigen Enzyme eingebaut werden können (Liponsäure: $\text{DL}_{50}(\text{Maus})$ 160–275 mg/kg intraperitoneal).

G. Reaktionsfähigkeit, Ringspaltung und UV-Absorption von Dithiolanen

Die biologische Aktivität der Liponsäure beruht auf der großen Reaktionsfähigkeit der Disulfidbindung des Dithiolanrings. Frühere Versuche, die gegenüber offenkettigen Disulfiden und (sechsgliedrigen) 1,2-Dithianen gesteigerte Reaktionsfähigkeit der (fünfgliedrigen) 1,2-Dithiolane mit der Spannung des Fünfrings [160] zu deuten und diese aus der nach langen Wellen verschobenen UV-Absorption der Dithiolane zu berechnen [161], sind gescheitert. Die Ringspannung der 1,2-Dithiolane beträgt nur 4–6 kcal/Mol [162, 163]. Auch ist es unzulässig, thermodynamische Größen wie den Energieinhalt, ausgedrückt durch die Ringspannung, zur Interpretation kinetischer Fakten (Reaktionsfähigkeit) heranzuziehen.

Nur in den einfachsten Fällen, etwa beim Vergleich des unsubstituierten 1,2-Dithiolans und 1,2-Dithians – wenn Einflüsse mesomeriefähiger Gruppen auf die S–S-Bindung ausgeschaltet sind, keine Deformation des Ringes durch gegenseitige Behinderung von Substituenten möglich ist und demnach die Größe der bathochro-

men Verschiebung und der Ringspannung vorwiegend durch den Interplanarwinkel bestimmt sind – lassen sich Zusammenhänge zwischen Reaktionsfähigkeit, Ringspannung und UV-Absorption erkennen, die jedoch nicht quantitativ erfaßbar sind.

I. Ringspannung der Dithiolane

Der Interplanarwinkel φ , den die beiden R–S-Bindungen in spannungsfreien, offenkettigen Disulfiden miteinander bilden, beträgt etwa 90° [164]. Bei dieser Stellung ist die gegenseitige Abstoßung der freien p_z -Elektronenpaare

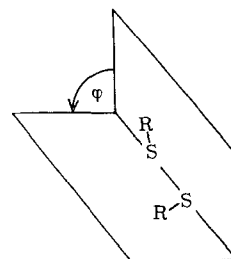


Abb. 4. Interplanarwinkel φ bei aliphatischen Disulfiden.

der Schwefelatome am geringsten, und es ist eine Wechselwirkung dieser Elektronen mit den freien d-Niveaus der Nachbarschwefelatome möglich, wodurch die S–S-Bindung den Charakter einer partiellen Doppelbindung erhält (p_π – d_π -Bindung) [165–167]. Für die Rotationsbarriere der S–S-Bindung – d. h. die Energie, die aufgewendet werden muß, um den Interplanarwinkel von 90° auf 0° zu verkleinern – wurden 3–14 kcal/Mol bestimmt [168–170]. Durch Messungen von Fehér an Disulfan scheint der Wert von 3 kcal/Mol gesichert zu sein [168].

Allerdings ist ungeklärt, ob die Bindung zwischen „normalen“ zweibindigen Schwefelatomen durch Überlappung von reinen p- oder sp-hybridisierten Orbitalen zustande kommt; aus der Bindungslänge läßt sich hier nicht auf den Bindungscharakter schließen, da ja die „normale“ Länge der S–S-Einfachbindung unbekannt ist. Bei Disulfiden mit mesomeriefähigen Gruppen in Konjugation zur Disulfidbrücke (z. B. bei den aromatischen Disulfiden) werden die Elektronen der Schwefelatome in die Mesomerie einbezogen. Die Homolyse der S–S-Bindung bei aromatischen Disulfiden hängt von der Polarität der p-Substituenten an den Benzolkernen ab [171]: Je stärkere Elektronendonatoren sie sind, um so leichter wird die S–S-Bindung von Diaryldisulfiden radikalisch gelöst.

Nur in große Ringe läßt sich die Disulfidgruppe ohne Deformation des etwa 90° großen Interplanarwinkels einbauen. Mit abnehmender Ringgliederzahl ($7 \rightarrow 6 \rightarrow 5$) muß φ kleiner werden und damit die Ringspannung zu-

[153] Pharm. Symp. on Thioctic Acid, Neapel 1955; Chem. Abstr. 51, 8153 (1957).

[154] Shutari Nakai, Naika Hôkan 6, 1189 (1959); Chem. Abstr. 54, 11274 (1960).

[155] S. Tasaka: The second Japanese Symp. on Thioctic Acid. Tokyo 1959.

[156] T. Yoshida: The third Japanese Symp. on Thioctic Acid. Osaka 1960.

[157] H. Redetzki, H. Bloedorn u. H. W. Bans, Klin. Wschr. 34, 845 (1956).

[158] W. Eger, Arzneimittel-Forsch. 7, 601 (1957).

[159] W. Eger, Ärztl. Forsch. 11, 251 (1957).

[*] 2,3-Dimercaptopropanol.

[160] J. G. Affleck u. G. Dougherty, J. org. Chemistry 15, 865 (1950).

[161] J. A. Baltrop, P. M. Hayes u. M. Calvin, J. Amer. chem. Soc. 76, 4348 (1954); M. Calvin, Federat. Proc. 13, 697 (1954).

[162] S. Sunner, Nature (London) 176, 217 (1955).

[163] A. Fava, A. Iliceto u. E. Camera, J. Amer. chem. Soc. 79, 833 (1957).

[164] O. Foss in N. Kharasch: Organic Sulfur Compounds. Pergamon Press, London 1961, Bd. I, S. 75.

[165] H. Krebs, Z. Naturforsch. 12b, 795 (1957).

[166] O. Foss u. O. Tjomsland, Acta chem. scand. 44, 1799 (1958).

[167] G. Cilento, Chem. Reviews 60, 147 (1960).

[168] F. Fehér u. R. Schulze-Rettmer, Z. anorg. allg. Chem. 295, 262 (1958).

[169] D. W. Scott et al., J. Amer. chem. Soc. 72, 2424 (1950); 74, 2478 (1952); 76, 1488 (1954); 80, 3547 (1958).

[170] L. Pauling: Die Natur der chemischen Bindung. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 132.

[171] U. Schmidt u. A. Müller, Liebigs Ann. Chem. 672, 90 (1964).

nehmen. Beim 1,2-Dithiolanring beträgt φ nur etwa 27° . Dadurch verschwindet der Doppelbindungscharakter der S-S-Bindung (p_π - d_π -Bindung), und es tritt fast maximale Abstoßung der p_z -Elektronen ein. – Die Spannung des Dithiolanringes wird außerdem von der Deformation und Veränderung der Bindungswinkel am Kohlenstoff und Schwefel bestimmt.

Durch Röntgenstrukturanalysen der 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure [172] haben Schotte und Bergson [173] Bindungslängen und Winkel ermittelt und daraus die Spannung des 1,2-Dithiolanrings zu 16–26 kcal/Mol berechnet [*]. Nach neueren thermochemischen Messungen beträgt die Ringspannung im unsubstituierten Dithiolan jedoch nur 4 und in der Liponsäure nur 3,5 kcal [162].

II. UV-Absorption der Dithiolane

Gegenüber der UV-Absorption offenkettiger Disulfide ist die der 1,2-Dithiolane stark nach längeren Wellen verschoben [161]. Schließt man Substituenteneffekte in der Nachbarschaft der Disulfidgruppe aus, so lassen sich einfache Zusammenhänge zwischen der UV-Absorption cyclischer Disulfide und ihrem Interplanarwinkel φ erkennen: Mit abnehmender Ringgliederzahl wird der Interplanarwinkel kleiner und die UV-Absorption bei gleichzeitig fallender molarer Extinktion nach größeren Wellenlängen verschoben (Sechsring: $\varphi = 60^\circ$ [172], $\lambda_{\max} = 286 \text{ m}\mu$; Fünfring: $\varphi = 27^\circ$ [172], $\lambda_{\max} = 330 \text{ m}\mu$). Durch Einbau in polycyclische Systeme [172a] kann der Dithiolanring weiter eingeebnet werden, wodurch das UV-Maximum noch stärker langwellig verschoben wird [174]. Tetramethylsubstitution an C-3 und C-5 bewirkt eine bathochrome Verschiebung [175, 175a].

Tabelle 3. Abhängigkeit der UV-Absorption organischer Disulfide von Substituenten und Ringspannung.

Disulfid	Absorptionsmaximum [m μ]
Dimethyl-disulfid	255
Di-t-butyl-disulfid	≈ 230
1,2-Dithiolan	330
3-Aminomethyl-1,2-dithiolan-hydrochlorid	322
3,3,5,5-Tetramethyl-dithiolan	358
1,2-Dithiolan-3-carbonsäure	280
1,2-Dithiolan-3,5-dicarbonensäure	250
3-Acetyl-1,2-dithiolan	307
Liponsäure (1)	333
7-Methyl-liponsäure (7)	350
7-Hydroxy-liponsäure (8)	340
5-Oxo-liponsäure (14)	312

[172] O. Foss u. L. Schotte, Acta chem. scand. 11, 1424 (1957); O. Foss u. T. Reistad, ibid. 11, 1427 (1957); O. Foss u. O. Tjomsland, ibid. 12, 1810 (1958).

[172a] G. Bergson, Acta chem. scand. 14, 222 (1960).

[173] G. Bergson u. L. Schotte, Acta chem. scand. 12, 367 (1958); Ark. Kemi 13, 43 (1958).

[*] Dabei wurden 12–14 kcal/Mol für die Rotationsbarriere der S-S-Bindung angenommen, ein Wert, der sicher viel zu hoch ist.

[174] L. Schotte, Ark. Kemi 9, 309 (1956).

[175] G. Claeson, Svensk kem. Tidskr. 69, 395 (1957).

[175a] Nicht entschieden ist, ob dieser Effekt durch induktive Einflüsse der Methylgruppen auf die S-S-Bindung zustandekommt oder eine Folge der Einebnung des Dithiolanrings durch die gegenseitige Behinderung der Methylgruppen ist. – Auch Disubstitution an benachbarten Kohlenstoffatomen durch Alkyl- oder Hydroxygruppen kann die UV-Absorption verschieben, wenn die Substituenten infolge gegenseitiger sterischer Behinderung den 1,2-Dithiolanring einebnen (7-Hydroxy-liponsäure: $\lambda_{\max} = 340,5 \text{ m}\mu$; 7-Methyl-liponsäure: $\lambda_{\max} = 350 \text{ m}\mu$).

Polare und mesomeriefähige Substituenten beeinflussen die UV-Absorption des Dithiolanringes beträchtlich. Elektronenanziehende Gruppen wirken schwach hypsochrom [176]. Carbonylgruppen in Nachbarschaft der Schwefelatome verschieben die Absorption nach kleineren Wellenlängen. Nach Bergson [177] handelt es sich hier jedoch nicht um das Spektrum des S-S-Chromophors, sondern um das der Carbonylgruppe, welches durch die S-Atome gestört ist (Tabelle 3).

In seiner Theorie der Elektronenspektren aliphatischer Disulfide betrachtet Bergson [178] den S-S-Chromophor als isoliertes π -Elektronensystem und die Anregung dieses Systems als Übergang eines Elektrons dieses Systems von einem nichtbindenden π ($3p\pi$)-Niveau zu einem nichtbindenden σ ($3p\pi$)-Niveau (Abb. 5).

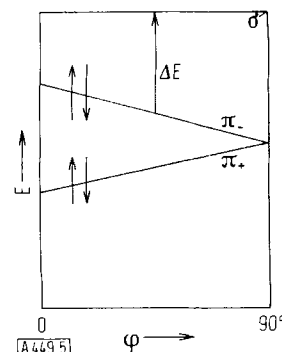


Abb. 5. Abhängigkeit der Anregungsenergie ΔE vom Interplanarwinkel φ bei den Elektronenspektren aliphatischer Disulfide [178].

Wegen der unterschiedlichen Symmetrie von π - und σ -Niveaus bezüglich der S-S-Bindungsachse muß die Energie des Grundzustandes vom Interplanarwinkel φ abhängen, die des angeregten Zustandes dagegen nicht. Daraus ergibt sich die Winkelabhängigkeit der Anregungsenergie ΔE (Abb. 5).

III. Reaktionsfähigkeit der 1,2-Dithiolane

Die gegenüber offenkettigen Disulfiden gesteigerte Reaktionsfähigkeit der 1,2-Dithiolane an der S-S-Bindung äußert sich bei radikalischen, elektrophilen und nucleophilen Reaktionen:

Charakteristisch für den 1,2-Dithiolanring ist die Polymerisation zu linearen Disulfiden, die beim unsubstituierten Dithiolan so schnell verläuft, daß dieser Stoff nur in Lösung kurze Zeit haltbar ist. Die von Calvin [161] gemessene niedrige Aktivierungsenergie (8,6 kcal/Mol) und der sehr kleine Stoßfaktor für die thermische Polymerisation des Dithiolans in Isooctan deuten auf einen Radikal-Ketten-Mechanismus hin. – Auch von Cyanpropyl-Radikalen wird die S-S-Bindung des Dithiolanringes wesentlich schneller als die des Dithianrings geöffnet. Im Gegensatz zur nucleophilen Spaltung verläuft die radikalische Öffnung der S-S-Brücke im (sechsgliedrigen) Dithianring schneller als bei offenkettigen Disulfiden [171].

Bei der elektrophilen Persulfatoxydation zu Thiosulfonaten reagieren offenkettige Disulfide und (siebengliedrige) Dithiepane nicht, Dithiane langsam, Dithiolane am schnellsten [161]. Der elektrophile Angriff des Oxydationsmittels auf ein p_z -Elektronenpaar eines der S-Atome der Disulfidgruppe verläuft also um so schneller

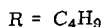
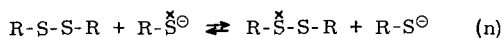
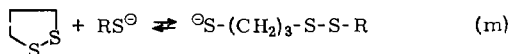
[176] G. Bergson, Acta Univ. Upsaliensis 13, 24 (1962).

[177] G. Bergson u. A. L. Delin, Ark. Kemi 18, 489 (1962).

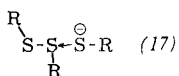
[178] G. Bergson, Ark. Kemi 12, 233 (1958); 18, 409 (1962).

(die Aktivierungsenergie wird um so kleiner), je weniger diese Elektronen am π -Elektronensystem der S-S-Bindung beteiligt sind. Die Beteiligung der p_z -Elektronen nimmt mit kleiner werdendem Interplanarwinkel φ ab (wird also beim Übergang von offenkettigen zu Sieben-, Sechs- und Fünfring-Disulfiden kleiner). Daneben ist bei einer bimolekularen Reaktion an einem Glied eines relativ starren Ringes eine kleinere Aktivierungsentropie zu erwarten als bei der Reaktion an einem Glied einer flexiblen Kette. Die Steigerung der Geschwindigkeit des elektrophilen Angriffs auf die Disulfidbindung, die man beim Übergang von offenkettigen Disulfiden über den Dithiepan- und Dithian- zum Dithiolanring feststellt, ist also durch die Abnahme der Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie bedingt. Die Änderung der Reaktionsfähigkeit und des Interplanarwinkels (und damit der Ringspannung) von Disulfiden zeigt also beim elektrophilen (wie beim radikalischen) Angriff auf die Disulfidgruppe den gleichen Gang.

Die nucleophile Substitution am Schwefel cyclischer Disulfide ist bisher nur wenig untersucht. Die Aktivierungsenergien der Umsetzung von Dithiolan (13 kcal/Mol, Gl. (m)) und Dibutyldisulfid (14,45 kcal/Mol, Gl. (n)) mit Butanthiolat differieren nur wenig [163]. Der Unterschied dürfte innerhalb der Fehlergrenze liegen (die Arrheniuskurve der Umsetzung (m) ist nicht gerade).



Die um fast vier Zehnerpotenzen größere Geschwindigkeit bei der Umsetzung des Dithiolans (Gl. (m)) muß demnach vorwiegend durch eine viel weniger negative Aktivierungsentropie bedingt sein: Im Übergangszustand (17) der nucleophilen Öffnung eines Disulfids durch Thiolat liegen alle drei Schwefelatome auf einer Geraden bei gleichen S-S-Abständen; der Valenzwinkel am angegriffenen Schwefelatome ist auf 90° gestaucht und die zu öffnende Bindung ist geweitet.



Der Grundzustand des Dithiolans (Valenzwinkel am S = 92° ; S-S-Abstand = 2,1 Å) ist dem Übergangszustand also räumlich viel ähnlicher als der Grundzustand eines offenkettigen Disulfids (Valenzwinkel am S = 107° ; S-S-Abstand = 2,05 Å). Vom Grundzustand des Dithiolans ist der Übergangszustand also mit größerer Wahrscheinlichkeit zu erreichen als vom Grundzustand des offenkettigen Disulfids.

Der etwas größere S-S-Abstand im cyclischen Disulfid ist vielleicht für die etwas kleinere Aktivierungsenergie der Reaktion (m) verantwortlich [*].

Dagegen ist, wie Modellbetrachtungen zeigen, die Ausbildung eines analogen Übergangszustandes bei Dithianen sehr erschwert und nur unter erheblicher Deformation der C-C-Valenzwinkel und unter Aufhebung der

[*] Auf den allgemeinen Zusammenhang zwischen S-S-Bindungslänge (die zwischen 1,97 Å und 2,2 Å variiert) und Aktivierungsenergie bei der nucleophilen S-S-Öffnung hat R. E. Davis, J. Amer. chem. Soc. 85, 3050 (1963), hingewiesen. Für viele Verbindungen gilt für die Cyanidsplaltung: $E_a = 99,9/r^3$ und für die Sulfidsplaltung: $E_a = 110/r^3$ in kcal/Mol.

im Grundzustand gestaffelten Anordnung der CH_2 -Gruppen möglich. Übereinstimmend damit sind gegen die nucleophile Cyanidsplaltung [179] Dithiolane empfindlicher, Dithiane dagegen stabiler als offenkettige Disulfide.

H. Neue Liponsäure-Synthesen [180]

Zahlreiche Wege führen zu Octansäuren mit Halogen, Hydroxy- oder Äthergruppen an C-6 und C-8, aus denen durch Umsetzung mit HJ/Thioharnstoff [181], mit Natriumdisulfid [182a, 182b], Rhodanid [182b], Thiosulfat [182b] oder Thioacetat [182b] Liponsäure oder Dihydroliponsäure entsteht. Der Aufbau der Kohlenstoffkette aus Heptensäure durch Prins-Reaktion [183] oder durch Acylierung von Ketonen und Enaminen, z. B. durch Umsetzung von Cyclopentenylpyrrolidin mit β -Butoxypropionsäurechlorid [184], kann technisch nicht mit der Synthese durch Anlagerung von Adipinsäureester-chlorid an Äthyliden zum 8-Chlor-6-oxo-octansäureester [185] konkurrieren. Nach HCl-Abspaltung zur 6-Oxo-oct-7-ensäure wird mit $\text{H}_2\text{S}/\text{H}_2$ in Gegenwart von MoS_x unter sehr energischen Bedingungen direkt zur Dihydroliponsäure umgesetzt [186]. Die technische Durchführung dieser Reaktion scheint jedoch schwierig zu sein. Besonders einfach ist die Reduktion des 8-Chlor-6-oxo-octansäureesters mit NaBH_4 zur 6-Hydroxy-Verbindung, die über 6,8-Dichloroctansäure zu Liponsäure umgesetzt wird [187]. Auch Anlagerung von Alkohol oder Carbonsäuren an die 6-Oxo-7-octensäure und katalytische Hydrierung zu Äthern bzw. Estern der 6,8-Dihydroxyoctansäure, die sich leicht in Liponsäure umwandeln lassen, sind beschrieben worden [188].

[179] A. Schöberl u. H. Gräffe, Liebigs Ann. Chem. 614, 66 (1958).

[180] Zur Synthese optisch aktiver Liponsäure vgl. K. Folkers et al., J. Amer. chem. Soc. 77, 5144 (1955); [182a]. Synthese wichtiger Liponsäurederivate: Liponsäureamid, Liponsäurechlorid, Lipol [A. F. Wagner, E. Walton, G. E. Boxer, M. P. Pruss, F. W. Holly u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 78, 5079 (1956); T. Kishi, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 81, 787 (1961); Chem. Abstr. 55, 24718i (1961)], Acetyldihydroliponsäuren [J. Nakano, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 76, 943, 1207 (1956)].

[181] siehe [185]; U. Schmidt u. P. Grafen, Chem. Ber. 92, 1177 (1959); A. Segre, R. Viterbo u. G. Parisi, J. Amer. chem. Soc. 79, 3503 (1957).

[182a] D. S. Acker u. W. J. Wayne, J. Amer. chem. Soc. 79, 6483 (1957).

[182b] S. Yurugi, T. Fushini u. M. Murata, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 80, 1686 (1960); Chem. Abstr. 55, 12287 (1961).

[183] E. A. Braude, R. P. Linstead u. K. R. H. Woolridge, J. chem. Soc. (London) 1956, 3074; K. Hägele, Dissertation, Universität Freiburg i. Br. 1956; DAS 1046016 (13. Okt. 56), Merck, Erf.: A. Lüttringhaus u. K. Hägele.

[184] S. Yurugi, T. Fushini u. M. Murata, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 80, 1165 (1960); Chem. Abstr. 55, 4503 (1961).

[185] M. W. Bullock, J. A. Brockman, E. L. Patterson, J. V. Pierce u. E. L. R. Stockstad, J. Amer. chem. Soc. 74, 3455 (1952); M. W. Bullock, J. A. Brockman, E. L. Patterson, J. V. Pierce, M. H. v. Saltz, F. Sanders u. E. L. R. Stockstad, ibid. 76, 1828 (1954).

[186] M. W. Bullock, J. H. Hand u. E. L. R. Stockstad, J. Amer. chem. Soc. 79, 1978 (1957).

[187] siehe [183]; L. J. Reed u. Ching-J Niu, J. Amer. chem. Soc. 77, 416 (1955).

[188] S. Yurugi, M. Murata u. T. Fushini, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 81, 299 (1961); 80, 1317, 1686 (1960); Chem. Abstr. 55, 14302, 5335, 12287 (1961).

