

BBA 12152

## DIE ENZYMATISCHE ANALYSE VON COENZYM A

G. MICHAL UND H.-U. BERGMAYER  
unter Mitarbeit von E. DIETZ und G. DAISER

*C. F. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim,  
Biochemische Abteilung Tübingen/Obb. (Deutschland)*

(Eingegangen am 9. August 1962)

## SUMMARY

*The enzymic analysis of coenzyme A*

4 methods for coenzyme A determination were checked for reproducibility, specificity and application in assaying pure substances as well as crude extracts. Appropriate assays are given.

The test using  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase is applicable for all materials and allows differentiation between reduced and total CoA. However, it has low specificity.

The test with thiokinase (fatty acid activating enzyme) gave formerly erroneous results. The sources of error were eliminated and this specific assay for CoASH was used for crude and pure preparations.

Phosphotransacetylase is highly specific for CoA. In pure preparations CoASH may be assayed well, however, in crude extracts the test is often unreliable.

Citrate-cleavage enzyme is very specific for CoASH and suitable for its analysis in crude and pure preparations. However, the enzyme is too unstable for routine work.

## EINLEITUNG

Coenzym A nimmt vorwiegend in S-acylierter Form (z.B. als CoASAc<sup>1</sup>) an zahlreichen enzymatischen Stoffwechselreaktionen als notwendiger Reaktionspartner teil. Einige dieser Umsetzungen werden zur Analyse von CoA angewendet. Sie sind zweckmäßiger als rein chemische Methoden: die Ultraviolett-Absorption<sup>2</sup>, Nitroprussid-Reaktion<sup>3</sup>, *N*-Äthylmaleinimidreaktion<sup>4,5</sup> sind z.B. bei Anwesenheit verwandter Verbindungen unbrauchbar. Die mikrobiologischen Bestimmungen erfassen nur Bruchstücke von CoA<sup>7-10</sup>, weshalb CoA vor solchen Tests gespalten werden muß<sup>10,11</sup>.

Unter den enzymatischen Bestimmungsmethoden für CoA sind zwei Gruppen zu unterscheiden:

1. Reaktionen worin CoA stets wieder zurückgebildet wird und die CoA-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt ("katalytische Tests"<sup>12</sup>).

2. Reaktionen worin CoA quantitativ reagiert und der stöchiometrische Umsatz eines Reaktionsteilnehmers Meßgröße ist ("Stöchiometrische Tests"<sup>3</sup>, "Endwert-Methode").

Zur ersten Gruppe gehören vor allem der Sulfanilamid-acetylierungs-Test<sup>12,13</sup>, die *p*-Nitranilin-Acetylierung<sup>14</sup>, die Umsetzung mit Acetat-Thiokinase und Hydroxylamin<sup>3,15</sup>, die Reaktion mit Phosphotransacetylase und nachfolgender Arsenolyse<sup>16</sup> und der Test mit Ketoglutarat-Dehydrogenase<sup>17</sup>. Diese Methoden sind im allgemeinen zwar sehr empfindlich, aber wegen der Standardisierung eines Bezugspräparates kompliziert und störanfällig<sup>3,18</sup>.

Frei von diesen prinzipiellen Schwierigkeiten sind die stöchiometrischen Tests der zweiten Gruppe. Die wichtigsten wurden in vergleichenden Untersuchungen mit dem Ziel geprüft, den CoA-Gehalt verschiedenen Untersuchungsmaterials spezifisch und genau zu ermitteln.

#### MATERIAL

Wir verwenden für die Enzym-Aktivität folgende Definition: 1 Einheit ist die Enzymmenge, die bei 25° 1  $\mu$ Mol Substrat per min umsetzt<sup>19,20</sup>.  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase\*, spezifische Aktivität ca. 15 Einheiten/mg, Phosphotransacetylase\* aus *Clostridium kluyveri*, spezifische Aktivität ca. 1100 Einheiten/mg<sup>21,22</sup> und Malat-Dehydrogenase\*, spezifische Aktivität ca. 750 Einheiten/mg (gemessen in Phosphatpuffer), waren Handelspräparate von C. F. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim. Thiokinase\* wurde nach MAHLER *et al.*<sup>23</sup> bis zu einer Aktivität von 0.2 Einheiten/mg, citrate-cleavage enzyme im wesentlichen nach SRERE<sup>24</sup> bis zu einer Aktivität von 5 Einheiten/mg gereinigt.

ATP-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>·3 H<sub>2</sub>O (80% ATP) und DPNH-Na<sub>2</sub> (79%  $\beta$ -DPNH) waren Handelspräparate von Boehringer-Mannheim, Acetylphosphat (Lithiumsalz) von Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg. Diketen von Dr. T. SCHUCHARDT GmbH, München, wurde vor Gebrauch im Vakuum redestilliert ( $K_{p_{22 \text{ mm}}} = 68^\circ$ ) und höchstens zwei Wochen danach verwendet.

Die CoA-Präparate stammten von C. F. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim; Farmochimica Cutolo-Calosi S.p.A., Neapel, und Pabst Laboratories, Milwaukee, Wisc.

#### METHODEN

##### Zellaufschluß

Rohe Gewebsextrakte wurden von Albinoratten gewonnen. Das Gewicht der Tiere ist bei den Experimenten angegeben. Die Tiere wurden dekapitiert, das betreffende Organ entnommen, rasch 1–2.5 g davon im Potter-Elvehjem Glashomogenisator bei 0° mit 12 ml HClO<sub>4</sub> (8%, w/v) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand mit 2 N K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> unter gutem Rühren auf pH = 6.0–6.5 eingestellt. Nach 2-stündigem Stehen in der Kälte wurde vom ausgefallenen KClO<sub>4</sub> abdekantiert. Die

\* Die hier genannten Enzyme sind gemäß "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry"<sup>25</sup> in der internationalen Klassifikation wie folgt aufgeführt.  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase: 1.1.1.35 L-3-hydroxyacyl-CoA : NAD oxidoreductase; Phosphotransacetylase: 2.3.1.8 Acetyl-CoA : orthophosphate acetyl-transferase; L-Malat-Dehydrogenase: 1.1.1.37 L-Malate: NAD oxidoreductase; Thiokinase: 6.2.1.2. Acid : CoA ligase (AMP).

Gewebeextrakte von je 2 jüngeren, leichten Tieren wurden zur Analyse vereinigt.

Hefeextrakte: Von bis zu 3 Tagen im Kühlschrank gelagerter Bäckerhefe wurden 15 g in 50 ml kochendes Wasser eingetragen, 5 min gekocht, rasch abgekühlt und zentrifugiert. Der Rückstand wurde kalt mit weiteren 50 ml Wasser extrahiert und beide Extrakte vereinigt.

Die Berechnung berücksichtigte die Neutralisation und das Volumen der Zelltrümmer.

#### *Verfahren zur Bestimmung von CoA*

Die angegebenen Test-Volumina beziehen sich auf eine CoA-Konzentration der vorbereiteten Probe von ca. 1 mg/ml. Ist diese wesentlich geringer, kann in Meß- und Vergleichs-Küvette mehr Probe und entsprechend weniger Puffer eingesetzt werden. Alle Lösungen sind mit bidest. Wasser herzustellen und (ausgenommen Puffer) bis zum Test kühl zu halten. Folgende Verfahren haben sich bewährt<sup>25</sup>:

**$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test:** Vorbehandlung zur Bestimmung von Gesamt-CoA (CoASH + oxyd. CoA): 5–10 ml Probe mit 0.01 ml Thioglycolsäure versetzen, mit 2 N KOH auf pH 9.0 einstellen (Spezial-Indikator-Papier) und 15 min kalt stehenlassen. Dann 0.01 ml Diketen zusetzen und 3 min kräftig mischen. Dabei pH-Wert stets auf 7.4 halten. Volumen des Ansatzes durch Addition der zugegebenen Volumina berechnen.

Vorbehandlung zur Bestimmung von CoASH: 5–10 ml Probe im Eisbad mit 2 N KOH auf pH 8.0 einstellen; 0.01 ml Diketen zusetzen und 3 min kräftig mischen. pH-Wert stets auf 7.4 halten und Volumen wie oben berechnen.

**Bestimmungsansatz:** Messung gegen Wasser. In eine Küvette von 1 cm Lichtweg pipettieren und mischen: 2.74 ml Pyrophosphat-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.3), 0.20 ml vorbehandelte Probelösung, 0.05 ml DPNH-Lösung (10 mg DPNH-Na<sub>2</sub>/ml). Bei 366 m $\mu$  (oder 340 m $\mu$ ) Extinktion ablesen; 0.01 ml  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Suspension (5 mg Protein/ml) einmischen und erneut Extinktion ablesen, sobald keine Änderung mehr eintritt. Durch nochmalige Zugabe der gleichen Menge  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase die Eigenextinktion des Enzyms messen und bei der Rechnung berücksichtigen.

Zur Berechnung folgende Extinktionskoeffizienten von DPNH verwenden:  $\epsilon_{366 \text{ m}\mu} = 3.30 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  (HÖRST<sup>26</sup>);  $\epsilon_{340 \text{ m}\mu} = 6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  (HÖRCKER UND KORNBERG<sup>27</sup>).

**Thiokinase-Test:** Messung in 1-cm Quarzküvette gegen eine Vergleichsküvette mit 2.65 ml Tris-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.6), 0.30 ml Na-Sorbatlösung (0.1 M\*), 0.05 ml Probe-Lösung (pH 6–7).

In die Meßküvette pipettieren und mischen: 2.35 ml Tris-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.6), 0.30 ml Na-Sorbatlösung (0.1 M), 0.10 ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung (0.1 M), 0.15 ml ATP-Lösung (0.1 M), 0.05 ml Probe-Lösung (pH 6–7). Bei 296 m $\mu$  Extinktion ablesen, 0.04 ml Thiokinase-Suspension (20 mg Protein/ml) einmischen und erneut Extinktion ablesen, bis Stillstand erfolgt (ca. 20–30 min). Nochmals mit gleicher Enzymmenge die Eigenextinktion des Enzyms messen und bei der Rechnung berücksichtigen.

\* 0.112 g Sorbinsäure mit 1 ml 1 N NaOH mischen, auf 10 ml auffüllen, filtrieren.

Zur Berechnung folgenden Extinktionskoeffizienten von Sorbyl-CoA verwenden:

$$\epsilon_{296 \text{ m}\mu} = 24.11 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol (s.S. 604)}.$$

*Phosphotransacetylase-Test:* Messung in 1-cm Quarzküvetten gegen eine Vergleichsküvette mit 2.80 ml Tris-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.6), 0.20 ml Probe-Lösung (pH 6-7).

In die Meßküvette pipettieren und mischen: 2.69 ml Tris-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.6), 0.10 ml Acetylphosphat-Lösung (0.1 M), 0.20 ml Probe-Lösung (pH 6-7), bei 233 m $\mu$  Extinktion ablesen; 0.01 ml Phosphotransacetylase-Suspension (0.1 mg Protein/ml\*) einmischen und erneut Extinktion ablesen, sobald keine Änderung mehr eintritt (ca. 3-4 min). Nochmals mit gleicher Enzymmenge die Eigenextinktion des Enzyms messen und bei der Rechnung berücksichtigen.

Für die Berechnung folgenden Extinktionskoeffizienten für die Differenz der Extinktionen (CoASAc) - (CoA) verwenden:  $\epsilon_{233 \text{ m}\mu} = 4.44 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol (SEUBERT}^{20})$ .

*Citrate-cleavage enzyme-Test:* Inhalt der 1-cm Küvetten:

Volumen (ml)	Vergleichswert (ml)	
2.02	2.22	Tris-HCl-Puffer (0.1 M; pH 7.6)
0.30	0.30	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (0.1 M)
0.20	0.20	Natrium-Citrat-Lösung (ca. 0.28 M)
0.06	0.06	DPNH-Lösung (10 mg DPNH-Na <sub>2</sub> /ml)
0.005	0.005	Malat-Dehydrogenase-Suspension (10 mg Protein/ml)
0.20	0.20	ATP-Lösung (0.1 M)
0.20	—	Probe-Lösung (pH 6-7)

Bei 366 m $\mu$  Vergleichswert auf  $E = 0.300$  stellen. In beide Küvetten je 0.02 ml Citrate-cleavage enzyme-Suspension (20 mg Protein/ml) einmischen und Vergleichsküvette stets auf den Anfangswert einreguliert halten. Werte der Meßküvette ablesen, bis keine Änderung der Extinktion relativ zur Vergleichsküvette mehr eintritt. Bei langsamen Nachlauf der Reaktion auf  $t = 0$  extrapolieren.

Zur Berechnung die oben angegebenen Extinktionskoeffizienten von DPNH verwenden.

### Synthese von S-Sorbyl-N-Acetyl-cysteamin

Die Synthese wurde über folgende Stufen durchgeführt:

- Synthese von N-Acetyl-cysteamin nach KUHN UND QUADBECK<sup>29</sup>,
- Überführung von N-Acetyl-cysteamin in das Bleisalz nach SEUBERT<sup>30</sup>,
- Herstellung von Sorbylchlorid: 60 g Sorbinsäure und 20 ml PCl<sub>3</sub> wurden auf dem Wasserbad unter Rückfluß bis zum Aufhören der HCl-Entwicklung erhitzt, danach 24 Std bei Zimmertemperatur stehen gelassen, vom breiigen Niederschlag abgegossen und zweimal im Vakuum destilliert.  $Kp_{13 \text{ mm}} = 75-75.5^\circ$ .
- Umsetzung von Sorbylchlorid mit dem Bleisalz des N-Acetylcysteamins: 10 g Sorbylchlorid wurden (ähnlich SEUBERT<sup>30</sup>) in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und 25 g des Bleisalzes zugesetzt. Nach 20 Std Rühren bei Zimmer-

\* Täglich frisch aus Stammlösung von 1 mg Protein/ml durch Verdünnen mit 3.0 M Ammoniumsulfat-Lösung bereiten.

temperatur wurden nochmals 3 g Bleisalz zugegeben und 4 Std bei 30–40° weitergerührt. Während der Reaktion konnte in Proben spektralanalytisch das Auftreten einer Schulter an der Sorbyl-Absorptionskurve bei ca. 296 m $\mu$  festgestellt werden. Nach Reaktionsschluß war kein Cl<sup>-</sup> in mit Wasser versetzten Proben nachzuweisen. Es wurde vom Rückstand abfiltriert und dieser zweimal mit Tetrahydrofuran gewaschen.

Eine Destillation ist hier nicht zweckmäßig. Statt dessen wurde die im Vakuum auf 80 ml eingeeengte Lösung auf eine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säule aufgezogen und mit Äther eluiert. Bei etwa 700 ml Elutionsvolumen erschienen die ersten Fraktionen mit nur einem Maximum bei 296 m $\mu$ . Aus diesen Fraktionen kristallisierten beim Einengen weiße bis gelbliche Nadeln (insgesamt etwa 3 g). Die Löslichkeit dieser Substanz ist in Wasser gering, in Äther gut, in Chloroform, Äthanol und Methanol sehr gut. Fp = 89° (Zers.); Nitroprussid-Reaktion ist negativ.

Nach Eintragen einer Probe in 5% KOH und Stehenlassen für 10 min verschwand die Absorption bei 296 m $\mu$ , die Lösung absorbierte jetzt mit Maximum bei ca. 257 m $\mu$  (Sorbinsäure<sup>31</sup>). Die Nitroprussid-Reaktion war jetzt positiv.

Die Substanz wurde in wenig Chloroform gelöst und mit Petroläther fraktioniert gefällt, wobei eine gelbe, ölige Vorfraktion abgetrennt wurde. Die Hauptfraktion wurde nach dem Trocknen halbiert und die beiden Anteile 3- bzw. 4-mal aus Äther umkristallisiert. Farblose Nadeln in beiden Fällen. Diese zeigten bei der Elementaranalyse\* die in Tabelle I dargestellten übereinstimmenden Resultate.

TABELLE I

	Berechnet für C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> NS (%)	Gefunden (%)
C	56,30	56,78
H	7,09	7,12
N	6,57	6,66
S	15,04	15,10

Das Infrarot-Spektrum entsprach der angenommenen Struktur von S-Sorbyl-N-acetyl-cysteamin (M = 213,22)

3 Einwaagen, wovon (a) eine nur aus CHCl<sub>3</sub>-Petroläther, (b) und (c) zusätzlich 3- bzw. 4-mal aus Äther umkristallisiert waren, wurden in wässriger Lösung im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei einer mittleren Spaltbreite von 0,045 mm und einer Temperatur von 27°, verdünnt mit 3 Vol. Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,0) gegen den entsprechend verdünnten Phosphatpuffer gemessen. Die Volumen der Meßgefäße wurden temperaturkorrigiert. Die Spektralkurve (Fig. 1) zeigte ein Maximum bei 296 m $\mu$  (vgl. WAKIL UND HÜBSCHER<sup>32</sup>), die spezifische Extinktion betrug: (a)  $\epsilon = 24,18 \cdot 10^3$  cm<sup>2</sup>/Mol; (b)  $\epsilon = 24,06 \cdot 10^3$  cm<sup>2</sup>/Mol; (c)  $\epsilon = 24,51 \cdot 10^3$  cm<sup>2</sup>/Mol.

Mittel:  $\epsilon_{296 \text{ m}\mu} = (24,25 \pm 0,23) \cdot 10^3$  cm<sup>2</sup>/Mol =  $24,25 \cdot 10^3$  cm<sup>2</sup>/Mol  $\pm 1\%$ .

Der für die CoA-Analyse zu verwendende Extinktionskoeffizient ist um die

\* Herrn Dr. habil. H. SPINGLER danken wir für die Durchführung der Analysen.

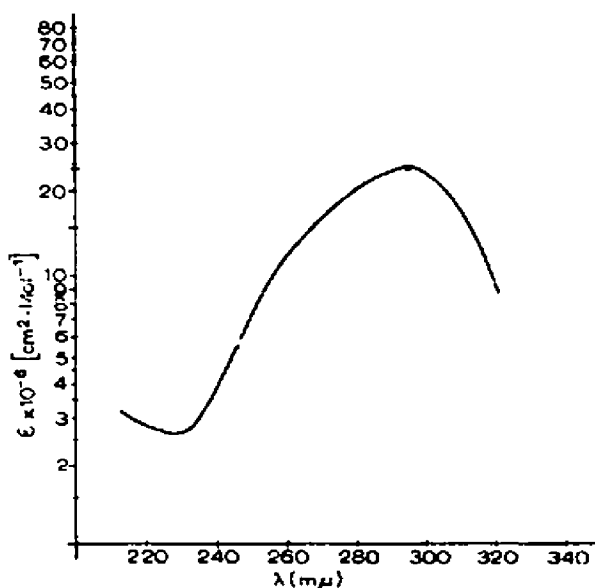


Fig. 1. Extinktionskurve von S-Sorbyl-N-acetyl-cysteamin.

molare Extinktion der bei der Reaktion verschwindenden Sorbinsäure zu verkleinern. Diese wurde aus reiner, durch Hydrolyse von Sorbylchlorid (s.o.) hergestellter Sorbinsäure zu  $\epsilon_{295 \text{ m}\mu} = (0.139 \pm 0.006) \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  gefunden. Somit ist  $\epsilon_{295 \text{ m}\mu} \text{ kor.} = (24.11 \pm 0.29) \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol} = 24.11 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol} \pm 1\%$ .

## ERGEBNISSE

### *$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase Test*

Der Test in der vorstehenden Ausführungsform beruht auf der DPNH-abhängigen Reduktion von Acetacetyl-CoA zu  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA und lehnt sich an die Vorschrift von DECKER<sup>33</sup> an. Ungereinigte CoA-Lösungen können damit zufriedenstellend getestet werden, sofern die CoA-Konzentration nicht zu gering ist (s. Tabelle X). Der Test gestattet, reduziertes und Gesamt-CoA nebeneinander zu bestimmen. Das Enzym ist unspezifisch (Arbeiten referiert in DECKER<sup>33</sup>), der Test erfaßt neben CoA z.B. auch 3'-Dephospho-CoA, Pantethein etc. Chromatographiert man Hefe-Kochsaft unter ähnlichen Bedingungen an Anionenaustauschersäulen, wie es LYNEN *et al.*<sup>34</sup> für Benzoyl-CoA beschrieben, so kann man in den Eluat-Fractionen mit reinem Dephospho-CoA in gleicher Weise wie in denen mit reinem CoA mit  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase die Konzentration bestimmen.

### *Thiokinase-Test*

WAKIL UND HÜBSCHER<sup>35</sup> beschrieben einen CoA-Test mit Thiokinase; die Autoren benützen den von MAHLER *et al.*<sup>33</sup> vorgeschlagenen Namen "Fatty acid-activating enzyme". Der Test beruht auf der Bildung von Sorbyl-CoA, dessen

Extinktion bei 300 m $\mu$  gemessen wird. Die Autoren geben für Sorbyl-CoA einen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{300 \text{ m}\mu} = 19 \cdot 10^6$  bis  $19.5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  an.

Wir haben bei sonst identischen Konzentrationen, aber mit 3 ml Gesamtvolumen und Tris-Puffer direkt in der Küvette bei Zimmertemperatur gemessen und konnten so die Kinetik verfolgen. Mit reinen CoA-Präparaten erhielten wir viel zu hohe Werte.

Nach dem Resultat von Tabelle II ergibt sich mit  $\epsilon_{300 \text{ m}\mu} = 19.0 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  ein Gehalt von 68.2  $\mu\text{g}$  CoA pro Küvette, das sind 136% des theoretisch möglichen Wertes. Ähnliche weit über 100% liegende Werte wurden noch mehrfach erhalten, sofern das Enzym hinreichend frei von Deacylase war (das für diesen Test verwendete Enzym besaß eine Spaltungsfähigkeit für Acetyl-CoA von 0.3% der Hauptaktivität).

Diese Befunde können nicht dadurch erklärt werden, daß die analysierten CoA-Proben etwa größere Mengen an Bruchstücken mit kleinem Molegewicht enthielten,

TABELLE II

MESSUNG EINES COA-REINPRÄPARATES MIT THIOKINASE  
(ANALOG WAKIL UND HÜBSCHER<sup>32</sup>)

Eingesetzt 0.05 ml CoA-Lösung (1.00 mg/ml) 50  $\mu\text{g}$  CoA; Meßvolumen 3.00 ml; 1 cm Lichtweg; Meßstrahlung 300 m $\mu$ .

Extinktion vor Reaktionsbeginn	0.002
Extinktion nach 25 min	0.565
$\Delta E$ (unter Berücksichtigung der Eigenextinktion des Enzyms)	0.563

die im Test reagieren. Die gleichen Proben zeigten im unspezifischen  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test (s. oben) sämtlich 70–80% CoASH.

Wir überprüften deshalb die von WAKIL UND HÜBSCHER<sup>32</sup> angegebenen Bedingungen und Meßgrößen, zunächst die spezifische Extinktion von Sorbyl-CoA. Nach dem "Additiven Prinzip" (s. DECKER<sup>3</sup>) erhält man das Spektrum der S-Acyl-Derivate von CoA durch Addition der Extinktionen des entsprechenden Thiolesters von N-Acetyl-cysteamin und Adenosin. Wir ziehen dieses Verfahren der Isolierung und Messung der Extinktion von Sorbyl-CoA<sup>32</sup> vor, weil die Reinheit der einfacheren synthetischen Verbindung durch Elementaranalyse zuverlässiger überprüft werden kann. Die Messung von S-Acyl-N-acetylcysteamin liefert direkt die gewünschte Extinktionsdifferenz zwischen CoA und dessen Acylderivaten, ohne daß die Extinktion von Adenosin eliminiert werden muß. Wie unter METHODEN angegeben, ergibt die entsprechende Sorbylverbindung  $\epsilon_{296 \text{ m}\mu} = 24.11 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ . Das entspricht  $\epsilon_{300 \text{ m}\mu} = 23.5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ , also erheblich mehr als WAKIL UND HÜBSCHER<sup>32</sup> finden.

Dennoch wurden auch mit diesem Extinktionskoeffizienten noch zu hohe Werte gefunden. Eine weitere Fehlerquelle wurde im Zusatz von GSH zum Testansatz ermittelt.

Der Befund aus Tabelle III läßt sich nach STADTMAN<sup>35</sup> erklären: GSH kann wie andere SH-Verbindungen bei alkalischem pH-Wert in nicht-enzymatischer Reaktion von Acyl-CoA die Acylgruppe übernehmen. Da die Wellenlänge des absorbierten Lichts nur durch das konjugierte System der Säure und die Thiolesterbindung bestimmt ist (bewiesen durch die Möglichkeit, Modellschubstanzen zu verwenden) dürfte S-Sorbyl-Glutathion bei 296 m $\mu$  eine deutliche Lichtabsorption be-

sitzen", seine Bildung also zu Pluswerten der Extinktion Anlaß geben". Nach STADTMAN<sup>28</sup> ist die Reaktion bei pH 8.1–9.0 schnell, bei pH 7 sehr langsam. Bei pH 7.6 findet offenbar noch eine geringe Reaktion statt (Testansatz (b) von Tabelle III). Enthalten weniger gereinigte CoA-Präparate noch GSH, ist dessen Einfluß aber zu vernachlässigen, weil die GSH-Mengen vergleichsweise klein sind und die Geschwindigkeit der Haupt-Reaktion genügend groß ist.

Systematische Variation der Reagentien-Mengen führte zu dem unter METHODEN

TABELLE III

EINFLUSS VON GLUTATHION AUF DIE MESSERGEBNISSE MIT THIOKINASE

Ansatz nach METHODEN mit untenstehenden Variationen. Eingesetzt 0.03 ml CoA-Lösung (0.80 mg/ml) = 40 µg CoA; Meßvolumen 3.00 ml; 1 cm Schichtlänge; Meßstrahlung 296 mµ.

	(a) Thiokinase-Test, pH 7.6 Standardansatz	(b) Thiokinase-Test, pH 7.6 Standardansatz + 10 µMol GSH	(c) Thiokinase-Test, pH 9.0 <sup>*</sup> Standardansatz + 10 µMol GSH
Lauf**	0.299	0.339	0.446
Analyse: µg CoA pro Küvette	28.5	32.4	42.5
Prozent der Einwaage	71.4	81.0	100
	(d) β-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test (CoASH)		(e) β-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test (Gesamt-CoA)
Prozent der Einwaage	71.0		78.5

\* Tris-puffer, 0.1 M, pH 9.0.

\*\* Unter Berücksichtigung der Eigenextinktion des Enzyms.

beschriebenen Testansatz. Wir halten ihn hinsichtlich Zusammensetzung und Reaktionsgeschwindigkeit für optimal. Der von WAKIL UND HÜBSCHER<sup>22</sup> vorgeschlagene 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer puffert bei pH 7.6 nicht mehr (LONG<sup>26</sup>), er ist zweckmäßig durch Tris zu ersetzen.

Gleiche Mengen von reinem 3'-Dephospho-CoA und reinem CoASH zeigten fast die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit. Es ist somit unmöglich, mit diesem Test beide Verbindungen getrennt zu erfassen. Nach MAHLER *et al.*<sup>23</sup> reagiert das Enzym jedoch nicht mit Pantethein oder Cystein, desgleichen nicht direkt mit DL-Thioct-säure oder GSH. Gegenüber diesen Verbindungen ist also Spezifität gegeben.

### Phosphotransacetylase-Test

Neben dem "kinetischen CoA-Test" mit Phosphotransacetylase<sup>18</sup> hat STADTMAN auch einen "stöchiometrischen Test" entwickelt<sup>29</sup>. Er beruht auf der Messung der Extinktion des bei der Reaktion gebildeten Acetyl-CoA bei ca. 233 mµ. Da diese Extinktion<sup>40</sup> jedoch nur als Differenz zur CoASH-Extinktion gemessen werden kann, ist es zweckmäßig, den genauen Wert ebenfalls mit einer Modellschubstanz zu ermitteln. SEUBERT<sup>25</sup> benutzte hierfür S-Acetyl-N-Succinyl-cysteamin und erhielt  $\epsilon_{233 \text{ m}\mu} = 4.44 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  (vgl. auch EGGERER<sup>41</sup> und STADTMAN<sup>42</sup>). Statt der in

\* Ein analoger Fall liegt bei S-Acetyl-GSH vor, das bei gleicher Wellenlänge wie S-Acetyl-N-Succinyl-Cysteamin gleiche Extinktion zeigt<sup>40,42</sup>.

\*\* Auch WAKIL UND HÜBSCHER<sup>22</sup> finden (Tabelle III und Abb. 3 ihrer Arbeit) auf Zusatz von GSH zu oxydiertem CoA mehr als 100% des Sollwertes.



der Literatur beschriebenen Rohextrakte konnte von uns das gereinigte Enzym verwendet werden, wodurch der Test sich vereinfachte<sup>43</sup>.

GSH im Testansatz würde oxydiertes CoA reduzieren und so der Analyse zugänglich machen. Aus dem gleichen Grunde wie beim Thiokinase-Test ist GSH aber unangebracht<sup>45</sup>, obwohl infolge der sehr kurzen Reaktionsdauer die Störung hier kleiner ist. In Abwesenheit von GSH oder anderen reduzierenden Substanzen wird CoA-S-S-CoA nicht erfaßt. Mit Jod oxydiertes CoA (Jod wurde nach der Reaktion durch Ausäthern entfernt) reagiert nicht. Das Enzym hat beim Arsenolyse-Test sein Aktivitätsmaximum<sup>44</sup> bei pH 7.6\*.

Frühere Untersuchungen<sup>46</sup> bewiesen, daß Phosphotransacetylase nicht mit Desamino-CoA reagiert. Nach WANG *et al.*<sup>46</sup> soll Phosphotransacetylase aus *Cl. kluyveri* auch nicht mit 3'-Dephospho-CoA reagieren<sup>47</sup>. Wir fanden jedoch unter den Bedingungen des Standardansatzes (1 µg Enzym pro Küvette) mit 3'-Dephospho-CoA (80.8 µg mit β-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase pro Küvette) eine langsame Reaktion von etwa  $\Delta E = 0.003/\text{min}$ . Dies steht in Einklang mit einem späteren Befund von WANG<sup>48</sup>. Da verglichen mit CoA in den meisten Untersuchungsmaterialien 3'-Dephospho-CoA höchstens in kleinen Mengen vorhanden ist<sup>49</sup>, dürfte der geringe Lauf die Messung kaum stören, wenn diese in 2–3 Minuten beendet ist. Bei größeren Mengen 3'-Dephospho-CoA kann die Meßgenauigkeit durch Extrapolation auf den Anfangs-

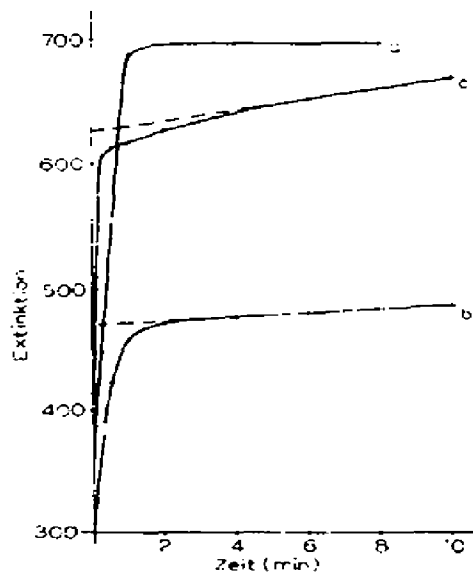


Fig. 2. Phosphotransacetylase-Test wie unter METHODEN mit (a) 200 µg CoA, (b) 100 µg CoA und 101 µg 3'-Dephospho-CoA, (c) wie (b), aber mit zehnfach höherer Enzymmenge (10 µg pro Küvette) (ohne Abzug der Eigenextinktion des Enzyms, vgl. Tabelle IV).

\* Inzwischen wurde festgestellt<sup>50</sup>, daß mit der kinetischen Abwandlung des vorstehend beschriebenen Testes das Aktivitätsmaximum bei pH 7.1 liegt. Einer Durchführung des Substrat-testes bei diesem pH steht nichts im Wege.

\*\* Die aus *Lactobacillus helveticus* erhaltene Phosphotransacetylase kann jedoch auch mit Pantethein reagieren<sup>47</sup>.

TABELLE IV

SPEZIFITÄT DES PHOSPHOTRANSACETYLASE-TESTES GEGENÜBER 3'-DEPHOSPHO-CoA  
Ansatz wie unter METHODEN.

	a		b
Eingewogen pro Küvette	200 µg CoA		100 µg CoA 101 µg 3'-Dephospho-CoA (etwa 40% rein)
Enzymmenge pro Küvette	1 µg		1 µg
ΔE (unter Berücksichtigung der Eigenextinktion des Enzyms)	0.320	0.158 (extrapoliert auf t = 0)	0.164 (nach 3 min ohne Extrapolation)
Berechneter CoA-Gehalt	82.7%	81.7%	[84.8%]

wert ( $t \rightarrow 0$ ) erhöht werden (s. Fig. 2 und Tabelle IV), ggfs. auch die Enzymmenge verringert werden.

Bei zehnfach höheren Enzymmengen (10 µg pro Küvette) ist der Lauf mit 3'-Dephospho-CoA nicht mehr zu vernachlässigen (s. Fig. 2). Im allgemeinen ist jedoch auch hier noch eine Extrapolation möglich. Vergleichsmessungen zeigten<sup>22</sup>, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit 3'-Dephospho-CoA als Substrat von Phosphotransacetylase etwa 0.5% derjenigen mit CoA ist. Es handelt sich hierbei offensichtlich nicht um eine Verunreinigung des Enzyms, sondern um eine Eigenschaft der Phosphotransacetylase, da bei fortschreitender Reinigung der Phosphotransacetylase sich das Verhältnis beider Aktivitäten zueinander nicht ändert.

Eine nennenswerte Störung des Tests durch kleinere biologische Bruchstücke des CoA ist nicht wahrscheinlich, da 3'-Dephospho-CoA dem CoA strukturmäßig am nächsten steht.

K<sup>+</sup> oder NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sind zur Erzielung der vollen Aktivität nötig<sup>44</sup>, wir fanden, daß in Tris-Puffer die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration der Enzymsuspension ausreicht. Tris-Puffer ist dem Triäthanolamin-HCl-Puffer vorzuziehen, weil Handelspräparate von Triäthanolamin bei 233 mµ mehr Licht absorbieren. Nach STADTMAN<sup>44</sup> ist Pyrophosphat-Puffer ein kräftiger Inhibitor. Versuche, die geringe Extinktion von Phosphatpuffern durch Einsatz von verestertem Phosphat nutzbar zu machen, blieben erfolglos: z.B. 0.1 M 3-PhosphoglyceratCyclohexylammoniumsalz als Puffer bewirkt gegenüber Tris-HCl ca. 80% Hemmung des Enzyms.

#### Citrate-cleavage enzyme-Test

Mit dem von SRERE UND LIPMANN<sup>30</sup> aufgefundenen Enzym wurde von SRERE<sup>51,52</sup> ein Test entwickelt, der die Citratspaltung mit der Bestimmung des gebildeten Oxalacetats mittels Malat-Dehydrogenase koppelt; letztere Reaktion ist DPNH-abhängig. Die Reaktion verläuft stöchiometrisch<sup>52</sup>, über die Reversibilität bestehen noch Zweifel<sup>52</sup>, doch ist quantitativer Ablauf stets anzunehmen (s.u.).

Wir starten die Reaktion mit Citrate-cleavage enzyme statt mit ATP, da weniger gereinigte CoA-Präparate ATP enthalten können. Mit Malat-Dehydrogenase kann wegen der Instabilität des Zwischenproduktes Oxalacetat und der Schwierigkeit, Citrate-cleavage enzyme frei von Malat-Dehydrogenase-Aktivität zu erhalten, nicht zuverlässig gestartet werden. Wir messen gegen eine Küvette mit dem kom-

pletten Ansatz außer Probe-Lösung. Nach Beendigung der Hauptreaktion wurde häufig auch mit reinen CoA-Präparaten ein Nachlauf von  $\Delta E = 0.0005$ – $0.002$  pro min bei  $366\text{ m}\mu$  beobachtet. Dieser ist jedoch leicht durch Extrapolation auf  $t = 0$  zu berücksichtigen.

Mit durch Jod oxydiertem CoA (der Jod-Überschuß wurde durch Ausäthern entfernt) konnte bei Abwesenheit von GSH und anderen reduzierenden Substanzen keine Reaktion erhalten werden, die Reaktion war jedoch auch bei Anwesenheit von  $5\text{ }\mu\text{Mol}$  GSH pro Küvette so langsam, daß sie durch Extrapolation auf  $t = 0$  völlig eliminiert werden konnte.

Mit 3'-Dephospho-CoA ( $80\text{ }\mu\text{g}$  mit  $\beta$  Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase testbarer Substanz pro Küvette) wurde eine konstante Abnahme der Extinktion von  $\Delta E = 0.004/\text{min}$  bei  $366\text{ m}\mu$  gemessen (s. Fig. 3). Sie ist also etwas höher als der Nachlauf der Reaktion beim Test mit reinem CoA, läßt sich jedoch bei Extrapolation auf  $t = 0$  völlig beseitigen. Somit kann CoA in Anwesenheit von 3'-Dephospho-CoA zuverlässig bestimmt werden. Nach SRERE<sup>52</sup> reagiert Pantethein nicht mit dem Enzym.

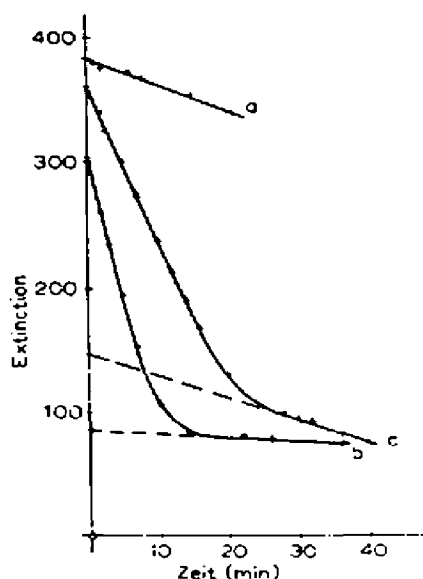


Fig. 3. Citrate-cleavage enzyme-Test wie unter METHODEN mit (a)  $80\text{ }\mu\text{g}$  3'-Dephospho-CoA, (b)  $151\text{ }\mu\text{g}$  CoA, (c)  $151\text{ }\mu\text{g}$  CoA + 1 ml  $\text{HClO}_4$ -Extrakt von Leber.

#### Überprüfung der Spezifität an reinen CoA-Präparaten

Wie oben dargestellt, haben die verschiedenen Testmethoden unterschiedliche Spezifität.

(a)  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase reagiert außer mit CoASH noch mit 3'-Dephospho-CoA, Pantethein, *N*-acetyl- $\beta$ -alanyl-cysteamin, *N*-acetylcysteamin und anderen Verbindungen<sup>5</sup>, erfaßt somit auch fast alle natürlichen Vorstufen des CoA.

(b) Thiokinase setzt neben CoASH noch 3'-Dephospho-CoA um, jedoch nicht mehr Pantethein<sup>53</sup>.

(c) Phosphotransacetylase und citrate-cleavage enzyme reagieren nur mit

TABELLE V

VERGLEICH VERSCHIEDENER MESSMETHODEN AN HANDELSÜBLICHEN COA-PRÄPARATEN

Angaben in Prozent der Einwaage.

Präparat	Chargen-Nummer	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test		Thiokinase-Test CoASH	Phosphotrans- acetylase-Test CoASH	Citrate- cleavage enzyme Test CoASH
		Gesamt-CoA	CoASH			
A	6 453 562	78.2	70.8	71.1	70.0	71.3
A	6 481 564	82.9	78.5	80.8	77.4	78.0
B	21	62.0	50.2	50.1	36.0	38.3
B	28	62.8	28.8	25.0	19.7	20.9
C	311	64.2	44.9	45.1	41.7	41.8
C	418	72.9	63.0	46.3	35.6	35.9

CoASH, die geringfügige Reaktion mit Dephospho-CoA kann durch das Testverfahren eliminiert werden.

Zum Vergleich der einzelnen Testverfahren wurden (1961) handelsübliche CoA-Präparate von 3 verschiedenen Herstellern untersucht. Die Resultate sind in Tabelle V wiedergegeben.

Die Methoden geben auch eine Vorstellung über den Gehalt an CoA-Bruchstücken: Wo bei den Präparaten größere, über den Meßfehler hinausgehende Differenzen bestehen, zeigen die Meßmethoden in der Reihenfolge zunehmender Spezifität stets abnehmenden CoASH-Gehalt an. Die Differenzen sind CoA-Bruchstücke. Noch besser ist das ersichtlich, wenn man ein reines CoA-Präparat etwa  $\frac{1}{2}$  Jahr bei

TABELLE VI

ANALYSE EINES ZERSETZTEN COA-PRÄPARATES

Angaben in Prozent der Einwaage.

$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test		Thiokinase-Test CoASH	Phosphotrans- acetylase-Test CoASH	Citrate-cleavage enzyme-Test CoASH
Gesamt-CoA	CoASH			
67	64.6	36.5	18.1	17.8

Feuchtigkeitszutritt und erhöhter Temperatur lagert und dann analysiert. Tabelle VI zeigt eine solche Analyse.

#### *Quantitativer Verlauf der Reaktionen, Anwendbarkeit auf rohe Aufschlüsse von biologischem Material*

Beim CoA-Test in biologischem Material sind wegen der niedrigen Konzentration an CoA sowie der zahlreichen Begleitstoffe Besonderheiten zu beachten:

In allen Fällen muß die eingesetzte Probemenge auf 1–1.5 ml erhöht werden. Die Puffermenge ist entsprechend zu reduzieren; dies ist immer möglich, wenn die Probe annähernd auf pH 7 eingestellt wird.

Für jeden Test muß der quantitative Ablauf der Reaktion sichergestellt sein. Dies ist bei Kohaufschlüssen noch wichtiger als bei Reinpräparaten, da durch die vielen Begleitstoffe u. U. eine stärkere Rückreaktion auftritt.

*Der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test:* Dieser Test wurde bei zahlreichen Analysen in verschiedenem Material als zuverlässig befunden. Die Erfassungsgrenze liegt bei etwa  $0.5 \mu\text{g/ml}$  Küvetteninhalt oder ca.  $2 \mu\text{g/ml}$  Probelösung. Der Umsatz ist wegen der günstigen Gleichgewichtslage der Reaktion<sup>53</sup>

$$K = \frac{[\text{CH}_3\text{---CHOH---CH}_2\text{---CO---S---CoA}][\text{DPN}^+]}{[\text{CH}_3\text{---CO---CH}_2\text{---CO---S---CoA}][\text{DPNH}][\text{H}^+]} = 5.25 \cdot 10^9$$

bei  $25^\circ$  bei pH-Werten  $< 7.5$  praktisch quantitativ, eine Störung (abgesehen von der geringen Spezifität) nicht zu erwarten.

*Der Thiokinase-Test:* Dieser Test hat den Vorteil des großen Extinktionskoeffizienten von Sorbyl-CoA (ca. 5 mal größer als von Acetyl-CoA im Phosphotransacetylase-Test; ca. 7 mal größer als von DPNH im  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase- und Citrate-cleavage enzyme-Test<sup>54</sup>). Die Erfassungsgrenze liegt somit bei ca.  $0.07 \mu\text{g CoA/ml}$  Küvetteninhalt bzw.  $0.2 \mu\text{g CoA/ml}$  Probelösung. Die Spezifität ist höher als bei  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, die Gleichgewichtslage ist zwar nicht so günstig (gemessen mit Önanthsaure bei  $38^\circ$  und pH 8.0—MAHLER *et al.*<sup>55</sup>—ist

$$K' = \frac{[\text{ADP}^+][\text{HP}_2\text{O}_7^{4-}][\text{R---CO---S---CoA}]}{[\text{ATP}^+][\text{CoASH}][\text{RCOO}^-]} = 1.11 \cdot 10^8$$

doch kann durch hohe Konzentrationen an ATP und Sorbat leicht ein praktisch quantitativer Umsatz von CoA erzielt werden. Die Reaktionsprodukte liegen im biologischen Material meist nur in geringer Konzentration vor und stören nicht im Sinne einer Rückreaktion. Diese Tests werden auch durch andere Substanzen in biologischem Material kaum gestört, wie Tabelle VII und untenstehender Ver-

TABELLE VII  
"RECOVERY"-EXPERIMENTE MIT THIOKINASE

Material	Aufschluss	Reines CoA ( $\mu\text{g}$ pro Küvette)	Probe ( $\mu\text{g}$ pro Küvette)	Summe	
				berechnet ( $\mu\text{g}$ pro Küvette)	gefunden ( $\mu\text{g}$ pro Küvette)
Leber	HClO <sub>4</sub> - Extrakt	62.2	6.75	68.95	68.6
Hefe	Kochsaft	35.0	16.2	51.2	49.0

gleich (Tabelle X) mit  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Testen zeigen, da Zusätze von reinem CoA zu biologischen Aufschlüssen praktisch quantitativ wiedergefunden werden können.

\* Gemessen bei  $366 \text{ m}\mu$ .

**Der Phosphotransacetylase-Test:** Dieser Test kann zur Analyse von biologischen Material nicht ohne weiteres eingesetzt werden, obwohl die Gleichgewichtskonstante günstiger als beim Thiokinase-Test ist: Bei pH 8.0 und 28° ist <sup>50</sup>

$$K' = \frac{[\text{CoASAc}] [\text{Phosphat}]}{[\text{Acetylphosphat}] [\text{CoA}]} = 74$$

Der Gehalt biologischen Materials an CoASAc<sup>1</sup> und an Phosphat ist meist für eine quantitative Reaktion zu hoch. Weiterhin ist das Enzym besonders gegen Na<sup>+</sup> sehr empfindlich, es wird z.B. durch 0.02 M Na<sup>+</sup> (ohne Anwesenheit anderer Kationen) fast völlig gehemmt<sup>44</sup>. Zu Hefeaufschlüssen zugesetztes CoA wird daher nicht quanti-

TABELLE VIII  
"RECOVERY"-EXPERIMENTE MIT PHOSPHOTRANSACETYLASE

Material	Aufschluss	Reines CoA (µg pro Küvette)	Probe (µg pro Küvette)	Summe	
				berechnet (µg pro Küvette)	gefunden (µg pro Küvette)
Hefe	Kochsaft	139	0	139	3.0
Hefe	Kochsaft	188	1.6	189.6	15.0

tativ wiedergefunden (Tabelle VIII). Für tierische Organe liegen die Verhältnisse meist günstiger, sind aber auch nicht befriedigend.

Die Erfassungsgrenze übertrifft die mit β-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Citrate-cleavage enzyme nur unwesentlich und liegt hinter der mit Thiokinase weit zurück.

#### Citrate-cleavage enzyme-Test.

$$K' = \frac{[\text{CoASAc}] [\text{Oxalacetat}] [\text{ADP}] [\text{Phosphat}]}{[\text{Citrat}] [\text{ATP}] [\text{CoA}]}$$

wurde bisher nicht gemessen. Aus der Gleichgewichtskonstante der Reaktion des "Condensing enzymes"<sup>54</sup> und derjenigen der ATP-Spaltung<sup>55</sup> läßt sich aber ein Wert von ~ 1 schätzen<sup>56</sup>. Durch die Kopplung mit der stark exergonischen Malat-Dehydrogenase-Reaktion, deren Gleichgewichtskonstante bei pH 7.2 und 22°

$$K' = \frac{[\text{Oxalacetat}] [\text{DPNH}]}{[\text{L-Malat}] [\text{DPN}]} = 2.33 \cdot 10^{-6}$$

beträgt<sup>54,56,57</sup>, ist der Ablauf des zusammengesetzten Tests aber stets als quantitativ anzunehmen. Rohen Extrakten zugesetzte CoA-Mengen werden demgemäß quantitativ wiedergefunden (Tabelle IX und Fig. 3).

TABELLE IX  
"RECOVERY"-EXPERIMENT MIT CITRATE-CLEAVAGE ENZYME

Material	Aufschluss	Reines CoA (µg pro Küvette)	Probe (µg pro Küvette)	Summe	
				berechnet (µg pro Küvette)	gefunden (µg pro Küvette)
Hefier	HClO <sub>4</sub> - Extrakt	151	0*	151	149

\* Der Extrakt wurde erst nach mehreren Tagen zum Test eingesetzt.

Auch in rohen Extrakten läßt sich CoA neben allen Bruchstücken mit Citrate-cleavage enzyme spezifisch erfassen. Die Erfassungsgrenze entspricht der des  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Tests. Leider ist das Enzym nur wenige Tage haltbar.

Als Beispiel für die praktische Anwendung (vgl. Tabelle XII) und zur Abschätzung der analytischen Streubreite wurden einige neutralisierte  $\text{HClO}_4$ -Extrakte von Rattenleber, -Herz und -Niere sowie Hefe-Kochsäfte mit  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Thiokinase getestet. Es war nicht der Zweck dieser Arbeiten, das geeignetste Aufschlußverfahren aufzusuchen. Somit erheben die mitgeteilten Werte nicht den Anspruch, exakte Zahlen über den Gewebsgehalt an CoA zu liefern. Die Resultate sind in Tabellen X und XI zusammengestellt.

TABELLE X

BEISPIEL FÜR DIE ANWENDUNG DER TESTS AUF TIERISCHE ORGANEXTRAKTE

Werte in Mikrogramm CoA pro Gramm Frischgewicht.

Tier	Gewicht (g)	Leber			Niere			Herz		
		$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase Gesamt CoA	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase CoASH	Thiokinase CoASH	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase Gesamt CoA	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase CoASH	Thiokinase CoASH	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase Gesamt CoA	$\beta$ -Hydroxyacyl-CoA- Dehydrogenase CoASH	Thiokinase CoASH
1 alte Ratte	330	151	89	86	40	49	35	35	—	25
1 alte Ratte	345	117	—	105	—	62	49	—	—	20
Mittelwert*	337	134	—	97	—	—	—	—	—	—
2 junge Ratten	140, 109	105	—	69	57	57	48	61	—	36
2 junge Ratten	130, 149	124	47	48	74	—	47	76	31	33
2 junge Ratten	133, 160	125	—	51	41	36	27	47	31	—
2 junge Ratten	137, 137	50	—	48	43	—	34	69	69	—
2 junge Ratten	130, 152	134	54	52	57	39	27	50	33	30
Mittelwert*	138	108	—	54	62	47	38	56	41	29

\* Die Mittelwerte sind für Leber bei großen und kleinen Ratten getrennt, für Niere und Herz von allen Tieren gemeinsam, berechnet worden.

Bei den Rattenorganen (Tabelle X) fällt der unterschiedliche CoA-Gehalt der Leber bei Tieren verschiedenen Alters auf. Es ist denkbar, daß der bei alten, verfetteten Tieren erhöhte Fettstoffwechsel die Ursache hierfür ist.

In früheren Arbeiten<sup>12</sup> wurden Gewebsproben mit dem Sulfanilamid-Acetylierungs-Test analysiert. Rechnet man diese in Lipmann-Einheiten angegebenen Werte in  $\mu\text{g}$  CoA um ( $413$  Lipmann-Einheiten =  $1$  mg Coenzym A<sup>50</sup>), erhält man bei Rattenorganen das 2- bis 3-fache der Werte von Tabelle X, bei Hefekochsäften (unter Berücksichtigung der Angabe pro Gramm getrockneter Hefe<sup>12</sup>) nur wenig mehr als in Tabelle XI angegeben ist. Es wurde nicht nachgeprüft, ob diese Unterschiede auf der Verschiedenheit der Analysenverfahren, der Aufschlußverfahren\* oder der Streubreite des biologischen Materials beruhen.

\* KAPLAN UND LIPMANN<sup>12</sup> stellten ausschließlich Kochsäfte her.

TABELLE XI

PRINZIPIELE FÜR DIE ANWENDUNG DER TESTS AUF HEFEKOCHSÄFTE

Werte in Mikrogramm CoA pro Gramm Frischgewicht.

	<i><math>\beta</math>-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase</i>		<i>Thiokinase CoASH</i>
	<i>Gesamt-CoA</i>	<i>CoASH</i>	
	49	35	34
	45	32	31
	45	31	31
	38	—	28
Mittelwert	44	33	31

## DISKUSSION

Bei CoA-Analysen ist häufig die Frage zu beantworten, ob ausschließlich CoASH oder auch oxyd. CoA, ferner ob und wie weit dem CoA nahe verwandte Bruchstücke noch mit dem Test erfaßt werden sollen. Entsprechend ihrer Spezifität können die geeigneten Testmethoden gewählt werden. Tabelle XII gibt entsprechende Auskunft. Von den hier diskutierten Verfahren ist bisher nur der  $\beta$ -Hydroxyacyl-

TABELLE XII

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER OBEN ERWÄHNTEN ENZYMTESTS

Test mit	Enzym bleibt bei 0-4° gebrauchsfähig	Erfaßt werden	Empfindlichkeit		Der Test ist (im Rahmen der Erfassungsgrenze)	
			Extinktion pro $\mu$ Mol CoA	Erfasßbar sind ( $\mu$ g CoA/ml Küvetten- inhalt)	geeignet für Rein- präparate	geeignet für rohe Aufschlüsse
$\beta$ -Hydroxyacyl- CoA-Dehydro- genase	> 6 Monate	CoA, Dephospho-	3.30 (366 m $\mu$ )	0.5	ja	ja
		CoA, Pantethein,	6.22 (340 m $\mu$ )	0.3		
		Cysteamin-	6.00 (344 m $\mu$ )	0.3		
		Derivate				
		Bestimmung der betr. oxydierten Verbindungen ist durchführbar				
Thiokinase	ca. 2 Monate	CoASH, Dephospho- CoASH	24.11 (296 m $\mu$ )	0.07	ja	ja
Phosphotrans- acetylase	> 6 Monate	CoASH	4.44 (233 m $\mu$ )	0.4	ja	nein
Citrate-cleavage enzyme	< 1 Woche	CoASH	3.30 (366 m $\mu$ )	0.5	ja	ja
			6.22 (340 m $\mu$ )	0.3		
			6.00 (334 m $\mu$ )	0.3		

CoA-Dehydrogenase-Test geeignet, auch das oxydierte CoA (neben den oxydierten Formen einiger Spaltstücke) zuverlässig zu testen. Bei den anderen Verfahren führt GSH-Zusatz (zur Reduktion des oxydierten CoA) zu falschen Ergebnissen. Andererseits sind reduzierende Substanzen zur Aktivierung der betreffenden Enzyme, z.B. Phosphotransacetylase (STADTMAN<sup>44</sup>) nicht erforderlich, da die Reaktion in



allen Fällen hinreichend schnell abläuft. Dadurch werden Komplikationen vermieden.

Die Miterfassung von Acyl-CoA-Derivaten erfolgt am zweckmäßigsten durch vorausgehende alkalische Spaltung (s. DECKER<sup>3</sup> und MICHAL UND BERGMAYER<sup>25</sup>). Die Bedingungen variieren in geringem Umfang bei verschiedenen Derivaten, jedoch tritt infolge der Alkalität praktisch immer eine Teiloxydation des gebildeten CoASH auf. Von den vorbeschriebenen Testen ist daher bisher nur der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Test auf Gesamt-CoA für Acylderivate geeignet. Für spezielle Acyl-Derivate existieren jedoch besondere Tests<sup>59</sup>.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Vier Verfahren zur Bestimmung von CoA wurden auf Reproduzierbarkeit, Spezifität und Anwendbarkeit auf Reinsubstanzen sowie Rohextrakte geprüft. Geeignete Testzusammensetzungen werden angegeben.

Der Test mit  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ist für alle Materialien geeignet, erlaubt eine Differenzierung von reduziertem und Gesamt-CoA, besitzt aber geringe Spezifität.

Der Test mit Thiokinase (fatty acid-activating enzyme) führte bisher zu irigen Resultaten; die Fehlerquellen wurden beseitigt und der für CoASH spezifische Test in rohen und reinen Präparaten angewendet.

Phosphotransacetylase ist streng spezifisch für CoA; man kann CoASH in reinen Präparaten damit vorteilhaft messen. Bei Rohextrakten ist der Test häufig unbrauchbar.

Citrate-cleavage enzyme ist sehr spezifisch für CoASH und für die Analyse von CoASH in rohen und reinen Präparaten geeignet; doch ist das Enzym für den Routinebetrieb zu wenig haltbar.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> F. LYNEN, E. REICHERT UND L. RUEFF, *Ann.*, 574 (1951) 1.
- <sup>2</sup> F. LYNEN, I. LERCH UND L. RUEFF, unveröffentlicht, zit. bei DECKER<sup>3</sup>.
- <sup>3</sup> K. DECKER, *Die aktivierte Essigsäure*, F. Enke Verlag, Stuttgart, 1959.
- <sup>4</sup> R. GRÜNERT UND P. PHILIPS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 30 (1951) 217.
- <sup>5</sup> E. ROBERTS UND G. ROUSEL, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1291.
- <sup>6</sup> N. M. ALEXANDER, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1292.
- <sup>7</sup> D. PENNINGTON, E. E. SNELL UND R. J. WILLIAMS, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 213.
- <sup>8</sup> H. R. SKEGGS UND L. D. WRIGHT, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 21.
- <sup>9</sup> L. LEVINTOW UND G. D. NOVELLI, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 761.
- <sup>10</sup> G. D. NOVELLI, N. O. KAPLAN UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 97.
- <sup>11</sup> F. LIPMANN, N. O. KAPLAN, G. D. NOVELLI, L. C. TUTTLE UND B. M. GUIRARD, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 869.
- <sup>12</sup> N. O. KAPLAN UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 37.
- <sup>13</sup> H. CHANTRENNE UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 757.
- <sup>14</sup> H. TABOR, A. H. MENLER UND E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 127.
- <sup>15</sup> F. LIPMANN UND L. C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
- <sup>16</sup> E. R. STADTMAN, G. D. NOVELLI UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 365.
- <sup>17</sup> R. W. VON KÖRFF, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 401.
- <sup>18</sup> H.-U. BERGMAYER, in H.-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962, S. 6-7.
- <sup>19</sup> J. COOPER, P. A. SREER, M. TABACHNICK UND E. RACKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 306.
- <sup>20</sup> *Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1961.

- <sup>21</sup> H.-U. BERGMAYER, H. KLOTZSCH UND G. LANG, *Angew. Chemie*, 73 (1961) 807.
- <sup>22</sup> H.-U. BERGMAYER, G. HOLZ, H. KLOTZSCH UND G. LANG, in Vorbereitung.
- <sup>23</sup> H. R. MAHLER, S. J. WAKIL UND R. M. BOCK, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 453.
- <sup>24</sup> P. A. SRERE, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2544.
- <sup>25</sup> G. MICHAL UND H.-U. BERGMAYER, in H.-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962, S. 512.
- <sup>26</sup> H. J. HOHORST, *Biochem. Z.*, 328 (1957) 509.
- <sup>27</sup> B. L. HORECKER UND A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 385.
- <sup>28</sup> W. SEUBERT, persönliche Mitteilung.
- <sup>29</sup> R. KUHN UND G. QUADBECK, *Ber.*, 84 (1951) 844.
- <sup>30</sup> W. SEUBERT, *Dissertation*, Univ. München, 1956.
- <sup>31</sup> D. MELNICK UND F. H. LUCKMANN, *Food Research*, 19 (1954) 20.
- <sup>32</sup> S. J. WAKIL UND G. HÜBSCHER, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1554.
- <sup>33</sup> K. DECKER, *Dissertation*, Universität München, 1955.
- <sup>34</sup> F. LYNEN, I. LERCH UND L. RUEFF, unveröffentlicht, zit. bei DECKER<sup>3</sup>.
- <sup>35</sup> E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 535.
- <sup>36</sup> E. R. STADTMAN, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, 1957, Bd. III, S. 931.
- <sup>37</sup> TH. WIELAND UND H. KÖPPE, *Ann.*, 581 (1953) 1.
- <sup>38</sup> C. LONG, *Biochemists' Handbook*, Verlag E. und F. N. Spon, London, 1961, S. 40.
- <sup>39</sup> E. R. STADTMAN, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41 (1953) 89.
- <sup>40</sup> K. DECKER UND F. LYNEN, in H. RÜHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Heidelberg, 1956, Bd. 12.
- <sup>41</sup> H. EGGERER, *Dissertation*, Univ. München, 1957.
- <sup>42</sup> E. R. STADTMAN, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, 1957, Bd. III, S. 935.
- <sup>43</sup> *Analytical methods applicable to Coenzyme A*, Circular OR 19 der Pabst Laboratories, Milwaukee, Wisc.
- <sup>44</sup> E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 527.
- <sup>45</sup> N. O. KAPLAN, zitiert bei E. R. STADTMAN, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, 1955, Bd. I, S. 596.
- <sup>46</sup> T. P. WANG, L. SHUSTER UND N. O. KAPLAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 3204.
- <sup>47</sup> G. M. BROWN, *Federation Proc.*, 16 (1957) 159.
- <sup>48</sup> T. P. WANG, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, 1955, Bd. II, S. 649.
- <sup>49</sup> G. D. NOVELLI, N. O. KAPLAN UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 97.
- <sup>50</sup> P. A. SRERE UND F. LIPMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4874.
- <sup>51</sup> P. A. SRERE, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2544.
- <sup>52</sup> P. A. SRERE, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 50.
- <sup>53</sup> F. LYNEN UND O. WIELAND, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymol.*, Academic Press, New York, 1955, Bd. I, S. 366.
- <sup>54</sup> J. R. STERN, S. OCHOA UND F. LYNEN, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 313.
- <sup>55</sup> E. A. ROBBINS UND P. D. HOYER, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 121.
- <sup>56</sup> F. SCHLENK, H. HELLSTRÖM UND H. V. EULER, *Ber.*, 71 (1938) 1471.
- <sup>57</sup> K. BURTON UND T. H. WILSON, *Biochem. J.*, 54 (1953) 86.
- <sup>58</sup> J. D. GREGORY, G. D. NOVELLI UND F. LIPMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 854.
- <sup>59</sup> K. DECKER, P. ROY VAGELOS, W. SEUBERT UND J. KNAPPE, in H.-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962, S. 419, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 452.