

SUMMARY.

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

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

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

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

213. Über die Spezifität des Coenzym A¹⁾

von Olga Brenner-Holzach und F. Leuthardt.

(25. VIII. 56.)

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

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

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

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

Lynen und Mitarb.³⁾ ersetzten bei ihren Arbeiten über die Fettsäureoxydation das CoA durch das einfache Bruchstück N-Acetyl-Cysteamin. Die durch dieses CoA-Modell „aktivierten“ Substrate reagierten mit 3 Enzymen, mit der Äthylenhydrogenase, der β -Keto-hydrogenase und der β -Ketothiolase. Dazu waren allerdings, wie in den Versuchen von *Kunz & Leuthardt* mit dem Benzoylpantethein, sehr hohe Konzentrationen der künstlichen Verbindungen nötig; diese liegen offenbar weit über den Konzentrationen der wirklichen aktiven Zwischenprodukte, wie sie unter physiologischen Bedingungen auftreten.

*King & Strong*⁴⁾ und *Govier & Gibbons*⁵⁾ führten Untersuchungen durch, bei denen bei der Acetylierung von Sulfanilamid mit Taubenleberextrakt nach *Kaplan & Lipmann*⁶⁾ anstelle des CoA Pantethein verwendet wurde. Die Aktivität dieser Verbindung betrug 20% derjenigen des CoA. Da sich im Taubenleberextrakt Enzyme finden, die bei Gegenwart von ATP aus Pantethein CoA synthetisieren, der Acetylierungstest nach *Kaplan & Lipmann* aber zur Aktivierung des Acetats ATP verlangt, eignen sich diese Versuche zur Abklärung der Spezifität von CoA nicht. Es dürfte sich bei der Wirkung von Pantethein um die indirekte Wirkung des synthetisierten CoA handeln, worauf schon *Novelli*⁷⁾ hingewiesen hat.

Die oben genannten Versuche zeigen, dass Verbindungen von einer gewissen Reaktionsfähigkeit auch durch Vereinigung der Substrate (Benzoessäure, Crotonsäure, β -Hydroxybuttersäure, Acetessigsäure) mit Bruchstücken des CoA entstehen können, dass aber die Fermentproteine zu ihnen offenbar eine viel geringere Affinität zeigen als zu den natürlichen aktiven Verbindungen.

Das dem CoA am nächsten stehende Derivat ist das Dephospho-CoA, dem die Phosphatgruppe in Stellung 3' der Ribose fehlt. Es kann aus dem CoA durch spezifische enzymatische Dephosphorylierung erhalten werden und ist Zwischenprodukt beim Aufbau des CoA (*Hoagland & Novelli*⁸⁾). Es steht, was seine Struktur betrifft, zum CoA in einem ähnlichen Verhältnis wie das DPN zum TPN. Man kann sich daher die Frage vorlegen, ob nicht beide Stoffe Cofermentcharakter haben wie die beiden Pyridinnucleotide. Wenn dies zutrifft, wäre es sogar denkbar, dass beiden verschiedene Spezifitätsbereiche zukommen. Diese Überlegung war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

³⁾ *F. Lynen*, Fed. Proc. **12**, 683 (1953).

⁴⁾ *T. E. King & F. M. Strong*, J. biol. Chemistry **189**, 325 (1951).

⁵⁾ *W. M. Govier & A. J. Gibbons*, Arch. Biochem. Biophys. **32**, 347 (1951).

⁶⁾ *N. O. Kaplan & F. Lipmann*, J. biol. Chemistry **174**, 37 (1948).

⁷⁾ *G. D. Novelli, F. J. Schmetz & N. O. Kaplan*, J. biol. Chemistry **206**, 533 (1954).

⁸⁾ *M. B. Hoagland & G. D. Novelli*, J. biol. Chemistry **207**, 767 (1954).

Um Näheres über die Spezifität von CoA aussagen zu können, verglichen wir die Aktivität von CoA und einiger seiner Bruchstücke in zwei enzymatischen Reaktionsfolgen, der Acetylierung von p-Aminoazobenzol und der Oxydation von α -Ketoglutarensäure.

Die Acetylierung von p-Aminoazobenzol (AAB) nach *Handschumacher*⁹⁾ (Acetylierungstest) war eine der ersten Methoden zur Bestimmung von CoA. Sie verläuft in Gegenwart von Taubenleberextrakt nach *Berg*¹⁰⁾ über folgende Stufen:



Da das acetylierte Amin nicht gefärbt ist, kann die Reaktionsgeschwindigkeit an der Abnahme der Farbtintensitäten gemessen werden.

Die zweite von uns verwendete Methode ist der optische Test nach *Von Korff*¹¹⁾. Es handelt sich dabei um die enzymatische Oxydation der α -Ketoglutarensäure zu Bernsteinsäure mit CoA als Cofaktor. Die Reaktion verläuft in den folgenden zwei Stufen:



Die Bildung von reduziertem DPN pro Zeiteinheit, welche direkt als Extinktionszunahme im Photometer gemessen werden kann, ist ein Mass für die Reaktionsgeschwindigkeit, wobei das in katalytischer Menge zugesetzte CoA geschwindigkeitsbegrenzend ist.

Die Untersuchungen der Synthese des CoA durch *Novelli* und Mitarb.⁸⁾¹²⁾ haben ergeben, dass nacheinander Pantethein, 4-Phosphopantethein und Dephospho-CoA als Zwischenprodukte auftreten. Wir haben die Aktivität aller genannten Verbindungen mit Hilfe unserer beiden Testsysteme untersucht und dabei die in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellten Resultate erhalten.

Im optischen Test ist nur das CoA wirksam; Dephospho-CoA, Phosphopantethein und Pantethein sind in katalytischen Mengen (0,002–0,008 μ Mol/1,18 ml) vollständig inaktiv. Im Acetylierungstest konnte auch bei den Proben mit Pantethein eine leichte Aktivität, bei denjenigen mit Phosphopantethein und Dephospho-CoA volle Wirksamkeit festgestellt werden. Dies kann durch zwei Ursachen bedingt sein: Die CoA-Bruchstücke werden in CoA übergeführt und gelangen so indirekt zur Wirkung, oder aber es können sowohl CoA, als auch seine Teilstücke als Cofaktoren für die Acetylierung funktionieren.

⁹⁾ *R. E. Handschumacher, G. C. Mueller & F. M. Strong, J. biol. Chemistry* **189**, 335 (1951).

¹⁰⁾ *P. J. Berg, J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3163 (1955).

¹¹⁾ *R. W. Von Korff, J. biol. Chemistry* **200**, 401 (1953).

¹²⁾ *L. Lewintow & G. D. Novelli, J. biol. Chemistry* **207**, 761 (1954).

Während unseren ersten Untersuchungen über die Funktion von Dephospho-CoA im Acetylierungstest arbeiteten wir mit Dephospho-CoA-Lösungen, die wir durch Abbau von CoA mit Prostataphosphatase erhalten hatten. Im optischen Test war Dephospho-CoA inaktiv, im

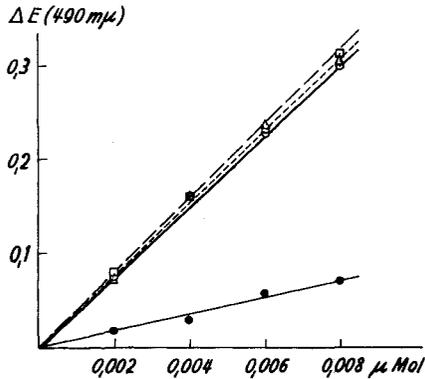


Fig. 1.

Acetylierung von p-Aminoazobenzol mit CoA, Dephospho-CoA, Phosphopantethein oder Pantethein als Cofaktor. Ansatz: 0,1 ml Glutathion 0,11-m.; 0,05 ml $MgSO_4$ 0,05-m.; 0,15 ml Trispuffer 0,1-m., pH 7,5; 0,2 ml eines Gemisches bestehend aus 10 ml Na-Citrat 0,2-m., 2,5 ml Na-Acetat 1-m. und 7 ml ATP-Lösung $6 \cdot 10^{-2}$ -m.; 0,25 ml des gealterten Taubenleberextraktes; 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ml Cofaktor $0,02 \mu\text{Mol/ml}$; Wasser ad 1,15 ml. Abszisse: Konzentration der Cofaktoren in $\mu\text{Mol/1,2 ml}$. Ordinate: Abnahme der Extinktion. — CoA; ---□--- Dephospho-CoA; -----Δ----- Phosphopantethein; —●— Pantethein.

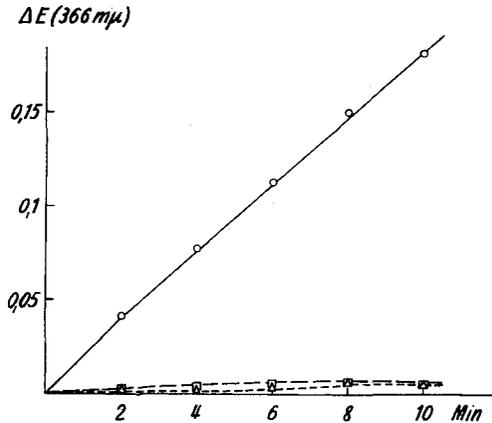


Fig. 2.

Optischer Test (Oxydation der α -Ketoglutar säure) mit CoA, Dephospho-CoA oder 4-Phosphopantethein als Cofaktor. Ansatz: 0,1 ml Cystein-HCl 0,1-m., pH 7; 0,1 ml α -Ketoglutarat 0,2-m., pH 7; 0,1 ml Glykokollpuffer 1-m., pH 9,85; 0,2 ml $CaCl_2$ 10^{-3} -m.; 0,05 ml Oxydase; 0,05 ml Desacylase; 0,4 ml CoA, Dephospho-CoA oder Phosphopantethein $0,02 \mu\text{Mol/ml}$; Wasser ad 2,9 ml. Abszisse und Ordinate wie Fig. 1. —○— CoA; ---□--- Dephospho-CoA; -----Δ----- Phosphopantethein.

Acetylierungstest betrug die Aktivität 100%. Wurde nun dieses Dephospho-CoA zur Resynthese zu CoA mit Taubenleberextrakt inkubiert, so erhielten wir im Acetylierungstest wieder die Aktivität von 100%, im optischen Test diesmal 65–70% (vgl. Fig. 3).

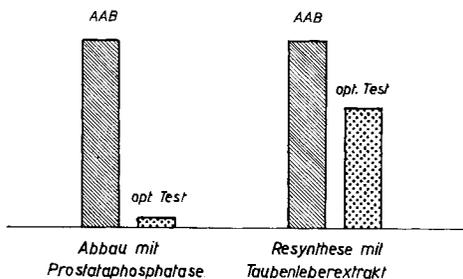


Fig. 3.

Abbau von CoA mit Prostataphosphatase und Resynthese durch Taubenleberextrakt; Aktivität der Reaktionsprodukte im Acetylierungs- (AAB)- und optischen Test.

Diese Versuchsergebnisse lassen vermuten, dass während der Inkubation mit dem Leberextrakt nicht alles Dephospho-CoA in CoA zurückgeführt wurde. Wenn der Acetylierungstest trotzdem eine anscheinend vollständige Resynthese ergibt, so kann dies zwei Ursachen haben: Entweder wird im Verlauf der Transacetylierungsreaktion durch die im Taubenleberextrakt vorhandene Dephospho-CoA-Kinase die Resynthese des CoA vervollständigt, oder das Dephospho-CoA zeigt bei der Transacetylierung die gleiche Aktivität wie das CoA. Die erste Möglichkeit scheint uns weniger wahrscheinlich, weil die Vorinkubation zur vollständigen Resynthese ausreichen sollte. Um die zweite Möglichkeit weiter zu prüfen, wählten wir eine andere Versuchsanordnung.

Es ist bis jetzt nicht gelungen, die CoA-synthetisierenden Enzyme vom Enzym, das die Übertragung des Acetylrestes auf das CoA katalysiert, zu trennen. Es können aber alle diese Enzyme zusammen mittels Acetonfraktionierung nach *Chou & Lipmann*¹³⁾ von der Acetokinase (dem Enzym, das die Acetylgruppe vom CoA auf das p-Aminoazobenzol überträgt) abgetrennt werden. Man kann mit Hilfe dieses Enzyms die stöchiometrische Reaktion zwischen dem acetylierten CoA oder Dephospho-CoA und dem Acetylakzeptor getrennt untersuchen. Die Möglichkeit einer Resynthese der CoA-Bruchteile zu CoA ist ausgeschaltet, weil diese Transacetylierung kein ATP benötigt.

Wir vergleichen im folgenden drei Substanzen in bezug auf ihre Wirksamkeit im optischen Test und im stöchiometrisch verlaufenden Acetylierungstest: CoA, Dephospho-CoA und Phosphopantethein. Für den Acetylierungstest verwendeten wir die S-Acetylverbindungen,

¹³⁾ *T. C. Chou & F. Lipmann, J. biol. Chemistry* **196**, 89 (1952).

die wir durch Behandeln der SH-Verbindungen mit Essigsäureanhydrid herstellen. Alle diese Versuche wurden mit dem reinen CoA und Dephospho-CoA durchgeführt, deren Herstellung in der vorangehenden Arbeit beschrieben ist¹⁴). Phosphopantethein war ein synthetisches Produkt, das uns von Prof. *Baddeley* freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Da wir im Acetylierungsversuch wegen des stöchiometrischen Verlaufs der Reaktion grössere Mengen des Cofaktors einsetzen mussten (0,1–0,2 $\mu\text{Mol/Ansatz}$), verwendeten wir, um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, auch im optischen Test etwas höhere Konzentrationen. Es ergeben sich mit den drei Substanzen CoA, Dephospho-CoA und Phosphopantethein die in Fig. 4 und Fig. 5 dargestellten Resultate.

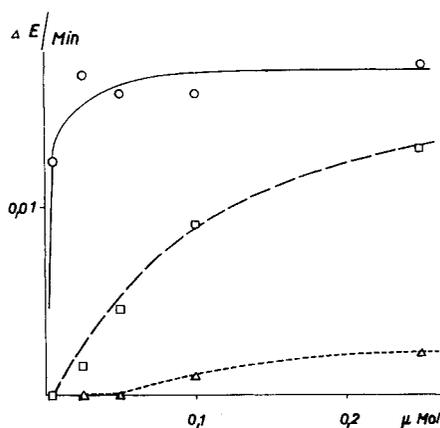


Fig. 4.

Cofaktorwirkung von CoA, Dephospho-CoA und 4-Phosphopantethein im optischen Test. Abszisse: Konzentration der Cofaktoren in $\mu\text{Mol/3ml}$. Ordinate: Zunahme der Extinktion pro Minute bei 366 $m\mu$. Ansatz: siehe Fig. 1. Cofaktoren 0,5–1 $\mu\text{Mol/ml}$.
—○— CoA; —□— Dephospho-CoA; ·····△····· Phosphopantethein.

Bei der Oxydation des α -Ketoglutarats (optischer Test) ist das Dephospho-CoA stets weniger wirksam als das CoA; bei 0,025 $\mu\text{Mol/3 ml}$ erreicht es nur ca. 15%, bei 0,1 μMol 50% und bei 0,2 μMol ca. 70% der Aktivität des CoA. Bei der Acetokinase-reaktion dagegen lässt sich im Bereich der verwendeten Konzentrationen kein Unterschied zwischen Dephospho-CoA und CoA feststellen. Dagegen war das acetylierte Phosphopantethein auch bei dieser Versuchsanordnung als Acetyl-donator gänzlich unwirksam.

Die obigen Versuche zeigen, dass unter gewissen Bedingungen, die eine Rephosphorylierung ausschliessen, CoA durch Dephospho-CoA ersetzt werden kann. Das S-Acetyldephospho-CoA scheint zur Acetokinase die gleiche Affinität zu besitzen wie das CoA. Aus der

¹⁴) *Olga Brenner-Holzach, R. Adler & F. Leuthardt, Helv. 39, 1790 (1956).*

mangelnden Aktivität des Phosphopantetheins kann man schliessen, dass für die Bindung an das Fermentprotein die Adenylsäurehälfte des Coenzym von wesentlicher Bedeutung ist; dass die letztere die Reaktionsfähigkeit der Acylmercaptanbindung beeinflusst, scheint nur wenig wahrscheinlich.

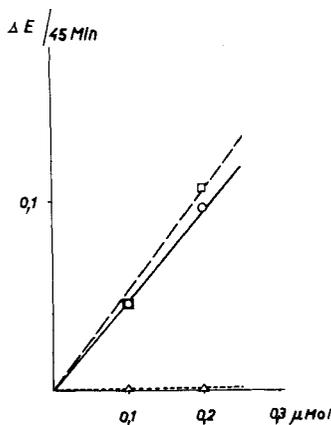


Fig. 5.

Cofaktorwirkung von CoA, Dephospho-CoA und 4-Phosphopantethein im Acetylierungstest (AAB). Abszisse: Konzentration des Cofaktors $\mu\text{Mol}/1,2$ ml. Ordinate: Abnahme der Extinktion pro 45 Minuten bei $490\text{ m}\mu$. Ansatz: siehe Fig. 1. Abweichung: An Stelle des Gemisches von Citrat, Acetat und ATP werden $0,2$ ml Na-Citrat $0,2$ m. zugesetzt. Cofaktor $0,1$ und $0,2$ ml ($1\ \mu\text{Mol}/\text{ml}$). —○— CoA; —□— Dephospho-CoA; Phosphopantethein.

Wir wissen z. Zt nicht, ob auch eine „Aktivierung“ der Essigsäure oder anderer Säuren durch Dephospho-CoA möglich ist, oder ob vielleicht auch das acylierte CoA dephosphoryliert werden kann. Erst dann könnte der oben beschriebenen Reaktion eine physiologische Bedeutung zukommen. Es ist geplant, diese Fragen weiter zu verfolgen.

Experimenteller Teil.

Substanzen: Das verwendete CoA war ein Produkt der *Pabst Laboratories*, Milwaukee, USA. Pantethin stellte uns Prof. *Viscontini* von der Universität Zürich, 4-Phosphopantethein Prof. *Baddiley*, London, in verdankenswerter Weise zur Verfügung.

Für die ersten Versuche bereiteten wir Dephospho-CoA durch Abbau von CoA *Pabst* mit Prostataphosphatase. Wir verwendeten für die Versuche das gesamte Inkubationsgemisch ohne Isolierung des Depospho-CoA. Später stellten wir es nach der in der vorhergehenden Arbeit¹⁴⁾ beschriebenen Methode durch Abbau des gereinigten CoA mit Raygras-Phosphatase her. DPN wurde von der Firma C. F. Boehringer und Söhne GmbH., Mannheim, bezogen.

Optischer Test nach *Von Korff*¹¹⁾ siehe *Brenner & Raaflaub*¹⁵⁾.

Acetylierungstest nach *Handschemacher*⁹⁾. *Enzyme*: Der Taubenleberroh-extrakt wurde nach *Kaplan & Lipmann*⁶⁾ mit den Modifikationen von *Handschemacher*⁹⁾ hergestellt und 3 Std. gegen in Glas destilliertes Wasser dialysiert. Die für den stöchiometrischen Acetylierungstest verwendete Acetokinase wurde durch Fraktionierung eines

¹⁵⁾ *Olga Brenner-Holzach & J. Raaflaub*, Helv. **39**, 863 (1956).

Taubenleberextraktes nach *Chou & Lipmann*¹³) gewonnen. Es wurden dazu 1 Teil Aceton-trockenpulver mit 9 Teilen eines Aceton-Tris-Puffergemisches (25 Vol. Aceton + 75 Vol. 0,1-m. Trispuffer pH 8,2) extrahiert und der Extrakt mit Aceton fraktioniert. Die aktive Fraktion fällt zwischen 40 und 65%.

Test: a) *katalytisch:* In Abweichung von der Vorschrift *Handschumacher's* wurde zur Stabilisierung des pH die Natriumhydrogencarbonatlösung durch Trispuffer ersetzt. Da die Acetylierung Magnesium-abhängig ist, wurde ferner $MgSO_4$ zugegeben.

Ansatz: 0,1 ml 0,11-m. Glutathion, 0,05 ml 0,05-m. $MgSO_4$, 0,15 ml 0,1-m. Trispuffer pH 7,5, 0,2 ml eines Gemisches bestehend aus 10 ml 0,2-m. Na-Citrat, 2,5 ml 1-m. Na-Acetat und 7,5 ml $6 \cdot 10^{-2}$ -m. ATP, 0,25 ml des gealterten Rohextrakts, 0,2, 0,3 und 0,4 ml $2 \cdot 10^{-5}$ -m. CoA, Dephospho CoA oder Phosphopantethein. Wasser ad 1,15 ml, 0,03 ml 0,0165-m. AAB in 60% Alkohol.

Die Abmessung des p-Aminoazobenzols erfolgte mit einer „Agla“-Mikrometerpipette. Nach der Inkubation bei 38° während 40 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml frisch hergestellter 20-proz. Trichloressigsäure (in 50-proz. Alkohol) unterbrochen und die entstehende Fällung abzentrifugiert. 1 ml des Überstehenden wurde mit 3 ml 10-proz. Trichloressigsäure (in 25-proz. Alkohol) verdünnt und die Absorption bei 490 $m\mu$ abgelesen.

b) *stöchiometrisch:* Der Test wurde in der gleichen Weise ausgeführt wie oben beschrieben. Abweichungen: An Stelle des Gemisches von Citrat, Acetat und ATP wurde nur Citrat zugegeben. CoA, Dephospho-CoA und Phosphopantethein wurden als Acetylverbindungen in 10^{-3} -m. Lösungen verwendet (0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml). Die Konzentration von CoA und Dephospho-CoA wurde aus der Extinktion bei 260 $m\mu$ berechnet, unter Zugrundelegung einer Molekularextinktion von 14,7.

Acetylierung von CoA, Dephospho-CoA und Phosphopantethein¹⁶). Eine $5 \cdot 10^{-3}$ -m. Lösung von CoA, Dephospho-CoA oder Phosphopantethein wurde mit wenig festem $NaHCO_3$ auf ein pH von 7 gebracht und durch Zugabe von einigen Tropfen Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach 5 Min. wurde der Überschuss an Acetanhydrid durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt und der Äther durch einen N_2 -Strom vertrieben.

Abbau von CoA mit Prostataphosphatase. *Enzym:* Die saure Prostataphosphatase wurde nach *Kutscher & Wörner*¹⁷) aus menschlicher Prostata mit Wasser extrahiert und nach *Brandenberger & Hanson*¹⁸) mit o-Carboxyphenylphosphorsäure auf ihre Aktivität geprüft. Bei 3–4⁰ aufbewahrt behielt sie ihre Aktivität über mehrere Monate bei.

Abbau von CoA.: Das folgende Gemisch wurde 20 Min. bei 38° inkubiert: 0,05 ml wässrige CoA-Lösung (ca. 0,1 mg CoA *Pabst*), 0,05 ml Acetattuffer 0,02-m. pH 5,4, 0,015 ml Prostataphosphatase. Die Denaturierung des Proteins erfolgte durch Erhitzen während 5 Min. auf 100°. Nach der Abtrennung des Niederschlags durch Zentrifugation wurde die Lösung mit 0,1-n. $NaHCO_3$ auf pH 6,5 bis 7 gebracht.

Resynthese mit Taubenleberextrakt. Der mit Prostataphosphatase inkubierte, vom Eiweiss befreite und neutralisierte Ansatz (0,115 ml) wurde 40 Min. bei 38° zusammen mit 0,3 ml folgenden Gemisches inkubiert: 0,12 ml 0,05-m. $MgSO_4$, 0,16 ml 0,2-m. Na-Citrat, 0,04 ml 0,1-m. Na-Acetat, 0,12 ml $6 \cdot 10^{-2}$ -m. ATP, 0,4 ml Taubenleberrohextrakt und 0,2 ml Trispuffer (0,1-m., pH 7,5). Die Denaturierung des Proteins erfolgte durch Erhitzen (5 Min. auf 100°). Nach einer ersten Verdünnung von ca. 1 : 20 wurde das Eiweiss durch Zentrifugation entfernt und darauf die Lösung für den optischen Test und den Acetylierungstest in geeigneter Weise verdünnt.

Abbau von CoA mit Raygras-Phosphatase (vgl. vorhergehende Arbeit¹⁴)).

Herrn A. Schmid möchten wir für seine Mithilfe bei der Durchführung der Versuche bestens danken.

¹⁶) J. B. Wilson, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3205 (1952).

¹⁷) W. Kutscher & A. Wörner, Z. physiol. Chem. **239**, 109 (1936).

¹⁸) H. Brandenberger & R. Hanson, Helv. **36**, 900 (1953).

SUMMARY.

The activities of CoA, dephospho CoA and 4-phosphopantetheine as cofactors in the oxidation of α -ketoglutarate and in the acetylation of p-aminoazobenzene are compared.

In the oxidation of α -ketoglutarate (optical test of *Von Korff*) dephospho CoA may replace CoA only when it is added in rather high concentrations (0,1 – 0,2 μ mols/ml). Phosphopantetheine is inactive.

When acetyl CoA and acetyl dephospho CoA are incubated, in the presence of p-aminoazobenzene, with a fractionated pigeon liver extract (freed from the CoA synthetizing enzymes), CoA and dephospho CoA show the same activity as acetyl donors. Phosphopantetheine was again inactive.

We conclude that the α -ketoglutarate oxidizing enzyme has only a slight affinity for dephospho CoA, whereas the acetyl transferring enzyme reacts with acetyl dephospho CoA as well as with acetyl CoA.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

214. Über Pyridyl-Steroide. I. ¹⁾

Über Steroide, 141. Mitteilung²⁾

von **J. Heer** und **K. Hoffmann**.

(25. VIII. 56.)

Im Zusammenhang mit unsern Arbeiten über Alkylenimin-Derivate³⁾⁴⁾ haben wir auch die Verwendung von metallorganischen Pyridin-Verbindungen, insbesondere von Pyridyl-(2)-lithium⁵⁾, studiert, um zu neuen zentralerregenden Pyridin- bzw. Piperidin-Derivaten zu gelangen. Es bestätigte sich dabei, dass sich das Pyridyl-lithium⁶⁾ unter milden Bedingungen mit Aldehyden und Ketonen umsetzt und dass sich auch mit sonst träge reagierenden Ketonen die entsprechenden Pyridyl-carbinole in ausgezeichneten Ausbeuten herstellen lassen. Es erschien uns nun reizvoll, dieses Reagens auch mit verschiedenen leicht zugänglichen Steroidketonen umzusetzen, und die neuen Pyridyl-Steroide als solche oder nach ihrer Hydrierung zu den entsprechenden Piperidin-Derivaten pharmakologisch zu prüfen. Als wir mit unsern Untersuchungen begannen, war auf dem

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. *A. Wettstein* für seine wertvollen Ratschläge.

²⁾ 140. Mitt. siehe *J. G. Llaurado, R. Neher & A. Wettstein*, Clin. chim. Acta **1**, 236 (1956).

³⁾ *E. Sury & K. Hoffmann*, Helv. **37**, 3133 (1954).

⁴⁾ *J. Heer, E. Sury & K. Hoffmann*, Helv. **38**, 134 (1955).

⁵⁾ Noch unveröffentlichte Arbeiten.

⁶⁾ Betr. Pyridyl-lithium siehe z. B. *H. Gilman*, J. org. Chemistry **16**, 1788 (1951).