

# Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens

## Zur Biosynthese der Terpene, III<sup>1)</sup>

Von Prof. Dr. F. LYNEN, Dr. H. EGGERER, Dr. U. HENNING<sup>2)</sup>

und INGRID KESSEL

Max-Planck-Institut für Zellchemie, München

und Chemisches Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie

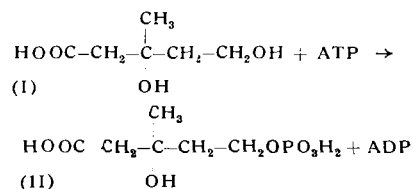
Zellfreie Hefeextrakte führen markierte Mevalonsäure in Squalen über. Es wird über Versuche berichtet, in denen zwei neue Zwischenprodukte isoliert und als Isopentenyl-pyrophosphat und Farnesyl-pyrophosphat identifiziert werden konnten. Die präparative Synthese von Isopentenyl-pyrophosphat wird beschrieben und seine biologische Umwandlung in Farnesyl-pyrophosphat und Squalen diskutiert. Die markierte Verbindung ließ sich mit Enzymen anderer Herkunft in Cholesterin und Kautschuk inkorporieren und erwies sich damit als der universelle Baustein der unter die „Isopren-Regel“ fallenden Naturstoffe.

Mit der Entdeckung der Mevalonsäure im Laboratorium von K. Folkers<sup>3, 4)</sup> ist das Studium der Biosynthese der Terpene und Steroide aus Essigsäure in eine neue Phase getreten. Nachdem *Tavormina*, *Gibbs* und *Huff*<sup>5)</sup> gezeigt hatten, daß zellfreie Leberextrakte radioaktive Mevalonsäure in Cholesterin einzubauen vermögen, erschienen in rascher Folge Veröffentlichungen, in denen die Inkorporation der Mevalonsäure in Squalen<sup>6-9)</sup>, in die Carotinoide<sup>10, 11)</sup>, in Mono-<sup>12, 13)</sup> und Triterpene<sup>14)</sup> oder in Kautschuk<sup>15)</sup> beschrieben wurde. Es war somit klar, daß aus Mevalonsäure das „aktive Isopren“ gebildet wird, das bei der Biosynthese der Terpene und damit verwandter Naturstoffe als Baustein dient. Auf die Existenz eines solchen gemeinsamen Bausteins mußte man wegen der Gültigkeit der „Isopren-Regel“ schließen, die L. Ruzicka<sup>16)</sup> bei seinen bahnbrechenden Forschungen über die chemische Konstitution der Terpene erkannt und formuliert hat.

Hinsichtlich des beteiligten Enzymsystems wurde bisher die Umwandlung der Mevalonsäure in Squalen am eingehendsten studiert. Es ist kaum daran zu zweifeln, daß die hierbei gewonnenen Erfahrungen für das Problem der Terpen-Biosynthese von allgemeinerer Bedeutung sind. Dies betrifft vor allem die Frage nach der Art und Weise, wie die Molekeln des Bausteins zu längeren Kohlenstoffketten zusammengefügt werden.

Wie *Popják* und Mitarbeiter<sup>17)</sup> bei ihren Komponentenstudien fanden, benötigen Enzyme der Leber zur Squalen-

Synthese aus Mevalonsäure: ATP\*), DPNH, TPNH und  $Mg^{2+}$ . Außerdem scheint auch Coenzym A beteiligt zu sein. Nach *Amdur*, *Rilling* und *Bloch*<sup>7)</sup>, die sich mit dem gleichen Enzymsystem der Hefe befaßten, ist außer ATP und DPNH  $Mn^{2+}$  eine unentbehrliche Komponente. Wir kamen in Versuchen an Hefezellen, die durch wiederholtes Einfrieren in flüssiger Luft aufgeschlossen wurden<sup>18)</sup>, zu einem etwas anderen Resultat. Zellfreie Extrakte, die durch Zerschlagen der vorbehandelten und gewaschenen Bäckerhefe mittels Glasperlen gewonnen wurden, konnten ohne  $Mn^{2+}$ , allein mit ATP, TPNH und  $Mg^{2+}$  Squalen aus Mevalonsäure aufbauen<sup>9)</sup>. Der erste Schritt dieser Biosynthese ist die Phosphorylierung der Mevalonsäure (I) durch ATP, wobei 5-Phospho-(+)-mevalonsäure (II) entsteht.



Der Phosphatester konnte aus Reaktionsansätzen mit Hefe-<sup>2, 19)</sup> oder Leberenzymen<sup>20)</sup> isoliert und durch Vergleich mit der von *Kirschner*<sup>21)</sup> in unserem Laboratorium synthetisierten Verbindung einwandfrei identifiziert werden. Die weitere Umwandlung in Squalen durch Hefeextrakt erfordert jedoch wie diejenige der Mevalonsäure nicht nur TPNH, sondern auch ATP und  $Mg^{2+}$ <sup>22, 23)</sup> (vgl. Tabelle 1).

### Zwischenprodukt Y = Farnesyl-pyrophosphat

Wird bei diesen Versuchen mit rohen Hefeextrakten kein TPNH zugesetzt, oder verwendet man als Enzymquelle Extrakte, die bei der Autolyse der Hefezellen mit Toluol erhalten werden, so verschwinden (+)-Mevalonsäure oder 5-Phospho-(+)-mevalonsäure mit der gleichen Geschwindigkeit, wie im kompletten Ansatz. Dabei entsteht aber kein

\*) Folgende Abkürzungen werden benutzt: Adenosintriphosphat = ATP; Adenosindiphosphat = ADP; oxydiertes und reduziertes Triphosphopyridin-nucleotid = TPN und TPNH; oxydiertes und reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid = DPN und DPNH.

<sup>18)</sup> F. Lynen u. H. W. Kalb, Ann. Acad. Scient. Fennicae, A. II. 60, 475 [1955].

<sup>19)</sup> T. T. Tchen, J. Amer. chem. Soc. 79, 6344 [1957]; Zusammenfassungen des IV. Internationalen Kongresses für Biochemie, Pergamon Press 1958, S. 47.

<sup>20)</sup> A. de Waard, Thesis, Rijksuniversiteit te Utrecht, 1958.

<sup>21)</sup> K. Kirschner, Diplom-Arbeit, Univers. München, 1958.

<sup>22)</sup> F. Lynen, Abstracts of Ciba-Symposium „Biosynthesis of Terpenes and Sterols“, London 1958, S. 7.

<sup>23)</sup> A. H. Phillips, T. T. Tchen u. K. Bloch, Federation Proc. 17, 289 [1958].

<sup>1)</sup> II. Mitteil.: F. Lynen u. M. Graßl, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 313, im Druck.

<sup>2)</sup> Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden von U. Henning auf dem IV. Internationalen Kongreß für Biochemie in Wien vorgetragen. Vgl. auch U. Henning, I. Kessel u. F. Lynen: Zusammenfassungen des IV. Internationalen Kongresses für Biochemie, Pergamon Press 1958, S. 47.

<sup>3)</sup> L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. MacRae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 78, 5273 [1956].

<sup>4)</sup> D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright u. K. Folkers, ebenda 78, 4499 [1956]; 79, 1486 [1957].

<sup>5)</sup> P. A. Tavormina, M. H. Gibbs u. J. W. Huff, J. Amer. chem. Soc. 78, 4498 [1956].

<sup>6)</sup> J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják u. I. Y. Gore, Biochem. J. 66, 10p [1957]; 69, 146 [1958].

<sup>7)</sup> B. H. Amdur, H. Rilling u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 79, 2647 [1957].

<sup>8)</sup> F. DiTuri, S. Gurin u. J. L. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. 79, 2650 [1957].

<sup>9)</sup> F. Lynen, International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo und Kyoto, 1957, Vortrag 129.

<sup>10)</sup> G. D. Braithwaite u. T. W. Goodwin, Biochem. J. 67, 13p [1957].

<sup>11)</sup> E. C. Grob, Chimia 11, 338 [1957].

<sup>12)</sup> R. G. Stanley, Nature [London] 182, 738 [1958].

<sup>13)</sup> A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp u. H. Smith, J. chem. Soc. [London] 1958, 369.

<sup>14)</sup> D. Arigoni, Experientia 14, 153 [1958].

<sup>15)</sup> R. B. Park u. J. Bonner, J. biol. Chemistry 233, 340 [1958].

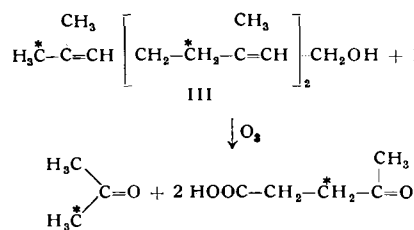
<sup>16)</sup> L. Ruzicka, Experientia 9, 357 [1953].

<sup>17)</sup> G. Popják, L. Gosselin, L. Y. Gore u. R. G. Gould, Biochem. J. 69, 238 [1958].

Squalen, sondern ein phosphat-haltiges Zwischenprodukt, das man dem wäßrigen Reaktionsansatz durch Extraktion mit Collidin entziehen und durch Verteilungs-chromatographie an feuchtem Silicagel mit Collidin-Äther-Wasser als Lösungsmittel reinigen kann. Wird die gereinigte Verbindung mit komplettem Hefeextrakt oder mit Hefepartikeln und TPNH inkubiert, so entsteht Squalen (vgl. Tabelle 1). Es ist somit gelungen, die TPNH-verbrauchende Reaktion der Squalen-Synthese von den vorbereitenden ATP-verbrauchenden Reaktionen zu trennen.

Das Zwischenprodukt, das wir „Y“ nannten, konnte als Farnesyl-pyrophosphat identifiziert werden. Seine hervorstechendste Eigenschaft ist die Empfindlichkeit gegenüber Säuren, was durch die Allyl-pyrophosphat-Gruppierung bedingt ist. Wird seine wäßrige Lösung mit 5% Trichloressigsäure oder Mineralsäuren versetzt und gleich anschließend mit Kalilauge auf  $p_H$  10 bis 12 gebracht, so kann man den organischen Teil der Molekel leicht mit Äther ausziehen. In der wäßrigen Phase verbleibt dabei anorganisches Pyrophosphat. Zum Nachweis verwendeten wir die durch  $^{14}C$  und  $^{32}P$  doppelt markierte Verbindung, die beim Inkubieren von 2- $^{14}C$ -Mevalonsäure-5- $^{32}P$ -phosphat mit ATP erhältlich ist. Das nach Zusatz von Orthophosphat und Pyrophosphat als Träger im Wasser verbliebene radioaktive,  $^{32}P$ -haltige Spaltstück wanderte bei der papierchromatographischen Analyse in Isopropanol-Trichloressigsäure-Wasser-Ammoniak als Lösungsmittel zusammen mit dem Pyrophosphat ( $R_F = 0,36$ ). Der Fleck des Orthophosphats ( $R_F = 0,64$ ) war praktisch frei von Radioaktivität.

Die Isotopenmethode wurde auch zur Identifizierung des organischen Rests herangezogen. Für diese Versuche wurde das Zwischenprodukt durch gereinigte Prostata-phosphatase bei  $p_H$  5,6 enzymatisch gespalten und der organische Rest mit Äther extrahiert. Das radioaktive, mit Wasserdampf flüchtige Spaltstück blieb bei der papierchromatographischen Analyse auf acetyliertem Schleicher & Schüll-Papier 2043b mit Essigester-Tetrahydrofuran-Wasser (1:6:8) als Lösungsmittel beim Farnesol (III) ( $R_F = 0,16$ ), begleitete nach Behandlung mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid in Pyridin den kristallisierten 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-ester des Farnesols (Fp 86 bis 88 °C)<sup>24)</sup> und lieferte beim Inkubieren mit kristallisierter Alkoholdehydrogenase aus Leber und DPN unter Dehydrierung Farnesal (IV), das als Semicarbazon<sup>25)</sup> kristallisiert wurde.



Beim Ozon-Abbau wurden radioaktives Aceton und radioaktive Lävulinsäure erhalten, wie man bei der durch die Sternchen gekennzeichneten  $^{14}C$ -Verteilung im Farnesol erwarten mußte. Diese Verteilung folgt aus der Tatsache, daß beim Zusammenfügen der Mevalonsäure-Reste zu den Terpenen C-5 der einen Molekel mit C-2 der nächsten in Verbindung tritt<sup>6,8)</sup> und die Carboxyl-Gruppe eliminiert wird<sup>26)</sup>.

<sup>24)</sup> E. Hecker, Chem. Ber. 88, 1666 [1955] und persönl. Mittlg.

<sup>25)</sup> M. Stoll u. A. Commarmont, Helv. chim. Acta 32, 1356 [1949].

<sup>26)</sup> P. A. Tavormina u. M. H. Gibbs, J. Amer. chem. Soc. 78, 6210 [1956].

## Vorstufe des Farnesyl-pyrophosphates:

„M<sub>1</sub>“ = Isopentenyl-pyrophosphat

Die Frage nach der biologischen Vorstufe des Farnesyl-pyrophosphats beantworteten Hemmungsversuche mit Jodacetamid. Wird dem Ansatz aus 2- $^{14}C$ -Mevalonsäure-5-phosphat,  $Mg^{2+}$ , ATP und Hefeenzymen m/200-Jodacetamid zugesetzt, dann bleibt die Bildung von Farnesyl-pyrophosphat aus. An seiner Stelle reichert sich ein anderes Zwischenprodukt an, das mittels Hochspannungs-Ionophorese abgetrennt werden kann. In Abb. 1 ist die Auswertung des ionophoretisch aufgetrennten Reaktionsansatzes

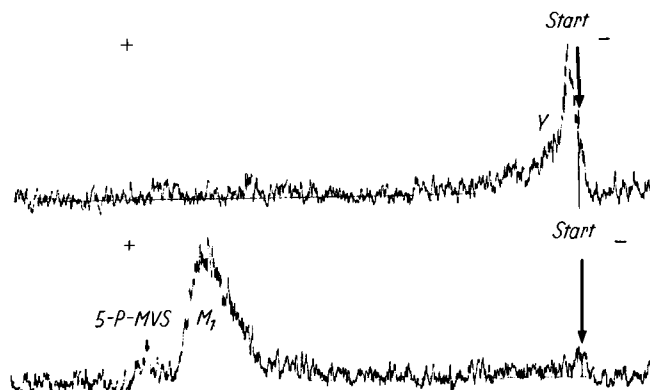


Abb. 1. Papier-ionophoretische Analyse der Versuche ohne und mit m/200-Jodacetamid

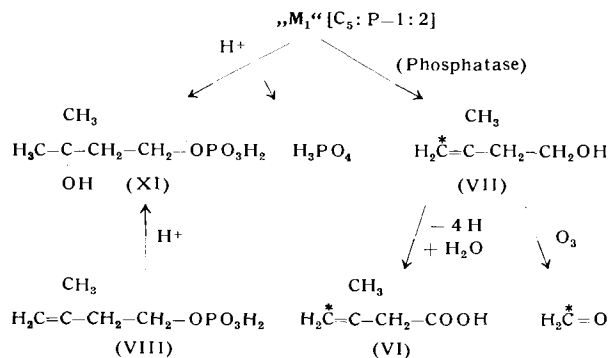
Ansatz: 10  $\mu M$  Trispuffer,  $p_H$  8,0; 10  $\mu M$  KF; 2  $\mu M$   $MgCl_2$ ; 2  $\mu M$   $MgK_2$ -äthylendiamin-tetraacetat; 2  $\mu M$  ATP; 0,078  $\mu M$  2- $^{14}C$ -Mevalonsäure-5-phosphat (3300 Imp/min); 300  $\gamma$  Enzymfraktion I und 140  $\gamma$  Enzymfraktion II. Die beiden Enzymfraktionen, wovon II 1 min auf 50 °C erhitzt war, wurden aus Hefeautolysaten durch Fraktionierung mit Aceton (0–30% bzw. 30–50%) und Entfernung von inaktiven Proteinen durch Ansäuern auf  $p_H$  5,5 bzw. 4,7 gewonnen. Der eine Versuch (untere Kurve) enthielt außerdem 1  $\mu M$  Jodacetamid. Vol. 0,2 ml; 1 h bei 37 °C inkubiert. — Papier-Ionophorese im Pherograph-Original-Frankfurt nach Wieland-Pfleiderer: Whatman-I-Papier; Pyridin-Acetat-Puffer,  $p_H$  6,2; 43 Volt/cm; 70 mA; 90 min. — Auswertung der getrockneten Papierstreifen im Radiopapierchromatograph FH 452 mit Linienschreiber PC 120 der Fa. Frieske und Hoepfner, Erlangen-Bruck

im Radiopapierchromatographen gezeigt. Die obere Kurve gehört zum Versuch ohne Jodacetamid; man erkennt nur die Bande des sich kaum vom Startpunkt entfernenden Farnesyl-pyrophosphats (Y). Im Versuch mit Jodacetamid — der unteren Kurve — fehlt diese Verbindung. An ihrer Stelle sind neben einem Rest des weit anodisch wandernden Ausgangsmaterials Mevalonsäure-5-phosphat große Mengen des langsamer wandernden Umwandlungsprodukts — von uns mit „M<sub>1</sub>“ bezeichnet — zu erkennen. Das radioaktive Material konnte mit verdünntem Ammoniak vom Papier eluiert und durch anschließende präparative Papierchromatographie in Äthanol-Wasser-konz. Ammoniak (8:1:1) als Lösungsmittel rein gewonnen werden. Wie die chemische Untersuchung ergab, handelt es sich um 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenyl-(1)-pyrophosphat oder abgekürzt Isopentenyl-pyrophosphat (X). Die analytischen Befunde, mit denen diese Formel gesichert wurde, sind die folgenden:

1. Während mit 2- $^{14}C$ -Mevalonsäure-5-phosphat oder Mevalonsäure-5- $^{32}P$ -phosphat das gebildete Produkt radioaktiv war, führte die Umwandlung von 1- $^{14}C$ -Mevalonsäure-5-phosphat zu keiner radioaktiven Verbindung. Es war daraus zu folgern, daß die Carboxyl-Gruppe des Mevalonsäure-5-phosphats bei der Bildung des Zwischenprodukts eliminiert wurde und somit das Derivat eines C<sub>5</sub>-Phosphats vorliegen mußte.

2. Beim Inkubieren der Verbindung mit gereinigter Prostata-phosphatase entstand ein ätherlösliches, leicht

flüchtiges Spaltstück, das sich durch direkten Vergleich mit synthetisch vorbereitetem 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenol-(1) (VII)



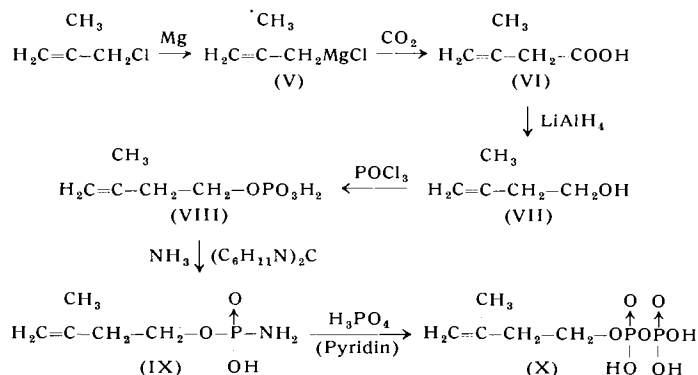
Identifizierung von „M<sub>1</sub>“ als 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenyl-1-pyrophosphat

identifizieren ließ. Es ließ sich mit diesem durch enzymatische Dehydrierung mittels DPN und TPN in Gegenwart von Leber-alkoholdehydrogenase und Hefe-aldehyddehydrogenase in  $\Delta^3$ -Isopentensäure (VI) überführen und lieferte beim Ozon-Abbau radioaktiven Formaldehyd, der als kristallisiertes Dimedon-Derivat identifiziert wurde.

3. Die Phosphat-Analyse ergab, daß zwei Phosphat-Reste je Isopentenol vorhanden waren, wovon einer bei 7 min langer Hydrolyse in 1n-HCl bei 100 °C als Orthophosphat abgespalten wurde. Der organische, phosphorhaltige Rest verhielt sich im Papierchromatogramm mit Amylenhydrat-Eisessig-Wasser als Lösungsmittel (4:1:2) und auch in anderen Eigenschaften wie 3-Methyl-1.3-butandiol-1-phosphat (XI), das aus synthetischem Isopentenylphosphat (VIII) bei kurzem Kochen mit Säure gebildet wird.

Der endgültige Beweis für die Struktur des Zwischenprodukts „M<sub>1</sub>“ konnte schließlich auf synthetischem Wege erhalten werden. Die Grignard-Verbindung des Methallylchlorids (V) wurde mit CO<sub>2</sub> in  $\Delta^3$ -Isopentensäure (VI; Fp 23 °C; Kp<sub>12</sub> 80–81 °C; n<sub>D</sub><sup>20</sup> = 1,4308; C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (100,1) Ber. C = 59,98; H = 8,06. Gef. C = 60,18; H = 8,03) übergeführt, deren Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenol-(1) (VII; Kp 128–129 °C; n<sub>D</sub><sup>20</sup> = 1,4326; C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O (86,1). Ber. C = 69,66; H = 11,70; Gef. C = 70,11; H = 11,99) lieferte. Bei der Umsetzung des ungesättigten Alkohols mit

POCl<sub>3</sub> in Pyridin entstand Isopentenylphosphat (VIII), das als Dicyclohexyl-ammoniumsalz (Fp 200 °C; C<sub>17</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>P·H<sub>2</sub>O (382,5) Ber. C = 53,38; H = 10,28; P = 8,10; Gef. C = 53,57; H = 9,80; P = 7,97) kristallisiert und mit Dicyclohexyl-carbodiimid und NH<sub>3</sub><sup>27)</sup> in Isopentenylphosphorsäure-amid (IX) (N,N'-Dicyclohexyl-guanidinium-salz; Fp 137 °C; C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>P (388,5) Ber. N = 14,42; P = 7,98; Gef. N = 14,29; P = 8,09) übergeführt werden konnte. Behandlung des Amids mit Phosphorsäure in Pyridin ergab Isopentenyl-pyrophosphat (X), das als in Wasser schwerlösliches Bariumsalz isoliert wurde und sich in allen Eigenschaften als identisch mit der Verbindung „M<sub>1</sub>“ erwies.



Wir verwendeten dann bei der Synthese der  $\Delta^3$ -Isopentensäure radioaktives CO<sub>2</sub> und erhielten auf diese Weise 1-<sup>14</sup>C-Isopentenyl-pyrophosphat. Seine Inkubation mit Mg<sup>2+</sup>, TPNH und Hefeextrakten lieferte radioaktives Squalen (Tabelle 1, Versuchsreihe II); beim Behandeln mit Hefeenzymen und Mg<sup>2+</sup>, aber ohne TPNH, entstand radioaktives Farnesylpyrophosphat.

### Zum Reaktionsablauf

Es ist somit nicht mehr zu bezweifeln, daß im Isopentenyl-pyrophosphat das „aktive Isopren“ vorliegt. Zudem ließ sich in noch laufenden Untersuchungen unseres Laboratoriums nachweisen, daß das synthetische <sup>14</sup>C-Iso-

<sup>27)</sup> R. W. Chambers u. J. G. Moffat, ebenda 80, 3752 [1958].

<sup>28)</sup> M. F. Utter, D. B. Keech u. P. M. Nossal, Biochem. J. 68, 431 [1958].

<sup>29)</sup> R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 129 [1953].

Tabelle 1. Inkorporation von Mevalonsäure-5-phosphat, synthetischem Isopentenyl-pyrophosphat, „M<sub>1</sub>“ und „Y“ in Squalen

40  $\mu\text{M}$  Trispuffer, p<sub>H</sub> 8,0; 30  $\mu\text{M}$  KF. Als reduzierendes System diente in den Versuchsreihen I und III: 2,5  $\mu\text{M}$  6-Phosphogluconat und 0,6  $\mu\text{M}$  TPN, in den Versuchsreihen II und IV: 1  $\mu\text{M}$  Glucose-6-phosphat, 0,2  $\mu\text{M}$  TPN und 10  $\gamma$  Zwischenferment. Vol. 0,6 ml; 60 min bei 37 °C inkubiert.

	I 0,035 $\mu\text{M}$ 2- <sup>14</sup> C-Mevalonsäure-5-phosphat (1500 Imp/min)		II 0,20 $\mu\text{M}$ 1- <sup>14</sup> C-Isopentenyl-pyrophosphat (570 Imp/min)		III 0,023 $\mu\text{M}$ „M <sub>1</sub> “ (980 Imp/min)		IV 0,0017 $\mu\text{M}$ „Y“ (350 Imp/min)
$\mu\text{M}$ ATP .....	—	5	—	—	—	—	—
$\mu\text{M}$ MgCl <sub>2</sub> .....	6	6	—	6	—	6	—
$\mu\text{M}$ K <sub>2</sub> Mg-äthylendiamin-tetraacetat .....	6	6	—	6	—	6	—
$\mu\text{M}$ K <sub>2</sub> -äthylendiamin-tetraacetat .....	—	—	6	—	6	—	6
ml Hefeextrakt*) .....	0,07	0,07	0,05	0,05	0,07	0,07	—
ml Hefepartikel**) .....	—	—	—	—	—	—	0,1
Imp/min im Squalen*** gemessen ...	10	780	3	250	34	550	205

\*) Zur Bereitung des Hefeextrakts wurden 10 g Bäckerhefe-Oberkotzau in 10 ml 0,1 m-Trispuffer, p<sub>H</sub> 8,0, suspendiert und nach Zusatz von 20 g Glasperlen (31/10) im mechanischen Zellohomogenisator zertrümmert. Der bei 30 min langem Zentrifugieren (20000  $\times$  g) erhaltene gelbe, trübe Extrakt mit 50 mg Protein/ml diente für die Versuche.

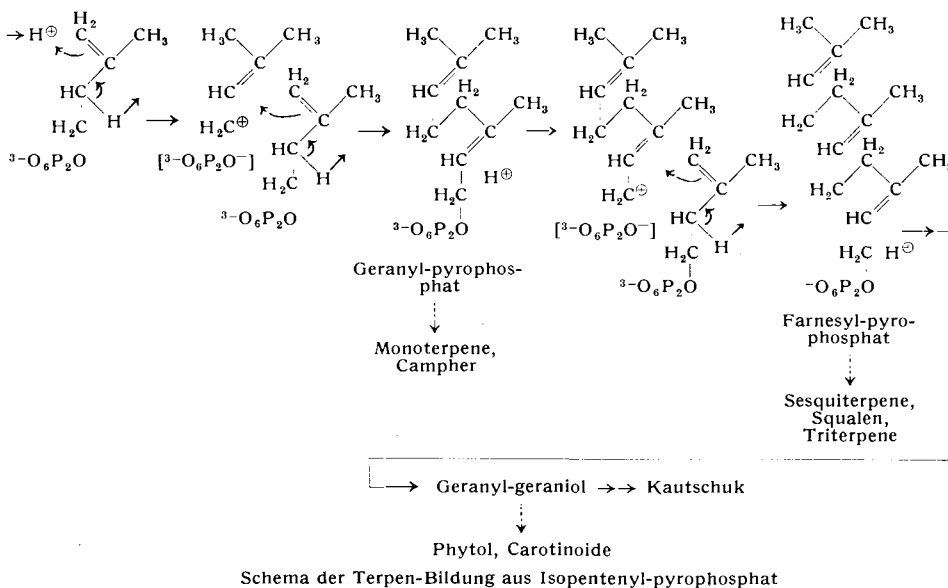
\*\*) Isolierung der Partikel aus 5 g Bäckerhefe nach Utter, Keech und Nossal<sup>28)</sup>. Die abzentrifugierte Partikelfraktion (15 min bei 20000  $\times$  g) wurde mit 5 ml 1proz. NaCl gewaschen und für die Versuche in 2 ml m/100-Trispuffer, p<sub>H</sub> 8,0, suspendiert (15 mg Protein/ml).

\*\*\* Das gebildete Squalen wurde durch Chromatographie an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gereinigt und nach Zusatz von Trägermaterial in das kristallisierte Hexahydrochlorid umgewandelt<sup>29)</sup>.

pentenyl-pyrophosphat durch Enzyme der Leber rasch in Cholesterin eingebaut wird<sup>33)</sup> und beim Inkubieren mit Latex aus *Taraxacum Kok saghyz* radioaktiven Kautschuk liefert<sup>31)</sup>.

Daß es sich beim „aktiven Isopren“ um ein Derivat des 3-Methyl-Δ<sup>3</sup>-butenols-(1) handeln könnte, ist zuerst von Bloch<sup>32)</sup> auf Grund von Versuchen über die Biosynthese des Squalens in schwerem Wasser vorausgesagt worden. Durch unsere Untersuchung wird nun bewiesen, daß in dem Zwischenprodukt „M<sub>1</sub>“, das unabhängig von unseren Studien auch im Blochschen Arbeitskreis<sup>33)</sup> gefunden und strukturell in gleicher Weise gedeutet wurde, der Ester dieses Alkohols mit Pyrophosphorsäure vorliegt und die Synthese des Squalens über Farnesyl-pyrophosphat abläuft, also zunächst drei Isopentenyl-Reste miteinander verknüpft werden.

Es ist anzunehmen, daß der Aufbau der Kohlenstoffkette mit der — wohl durch ein Proton ausgelöst — Isomerisierung des Isopentenyl-pyrophosphats zur Dimethylallyl-Verbindung eingeleitet wird, die dann mit einer zweiten Molekel Isopentenyl-pyrophosphat Geranyl-pyrophosphat und mit einer dritten schließlich Farnesyl-pyrophosphat liefert (s. Formelschema). Hier macht die

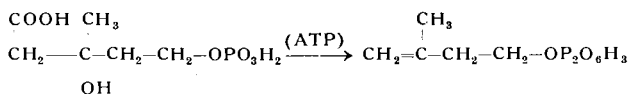


Kettenverlängerung dieser Art im Falle der Squalen-Synthese halt, während sie bei der Phytyl- oder der Kautschuk-synthese durch Wiederholung des gleichen Vorgangs noch weiterläuft. Aus der Vorstufe Geranyl-pyrophosphat könnten durch sekundäre Umwandlungen die verschiedenen Monoterpene und der Campher entstehen. Wir finden somit all das bestätigt, was Ruzicka<sup>16)</sup> prinzipiell schon vor langem vorausgesagt hat.

Die Triebkraft für die C-C-Verknüpfung kann im Angriff des zur Bildung des Carbonium-Ions besonders befähigten Allyl-Derivats auf die reaktionsfähige Methylene-Gruppe des Isopentenyl-pyrophosphats vermutet werden. Es ist aber noch etwas unbekannt in diesem Alkylierungsvorgang. So fanden wir, daß für diesen Prozeß außer einer Sulfhydryl-Gruppe, die durch Jodacetamid blockiert werden kann, auch Mg<sup>2+</sup> unentbehrlich ist. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, kann die Squalen-Synthese sowohl aus natürlichem („M<sub>1</sub>“) wie aus synthetischem Isopentenyl-pyrophosphat durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt, durch Zusatz von Mg<sup>2+</sup> aber wieder restituiert werden, während die Synthese aus Farnesyl-pyrophosphat („Y“) vom Komplexbildner

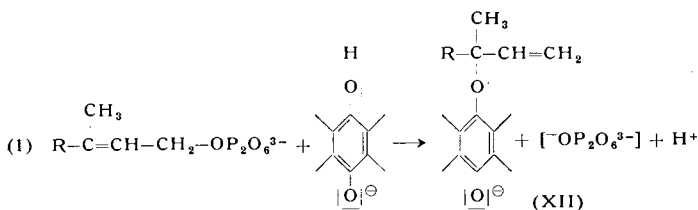
nicht beeinflusst wird. Außerdem hat es nach unseren letzten Versuchen den Anschein, als würde beim Aufbau des Farnesyl-pyrophosphats aus Isopentenyl-pyrophosphat nicht Pyrophosphat, sondern Orthophosphat freigesetzt, obwohl die den Enzympräparaten noch anhaftende Pyrophosphatase durch Fluorid gehemmt ist. Das würde aber bedeuten, daß die biologische C-Alkylierung nicht allein durch die Allyl-Resonanz, sondern auch durch die Spaltung der energiereichen Pyrophosphat-Bindung „getrieben“ wird.

Wir halten es in diesem Zusammenhang für bedeutsam, daß bei der biologischen Transmethylierung mit Methionin etwas Ähnliches geschieht. Wie aus den Untersuchungen Cantoni<sup>34, 35)</sup> hervorgeht, ist die Bildung des S-Adenosyl-methionins, des eigentlichen methylierenden Agens aus Methionin und ATP, an die Gegenwart von SH-Enzym und Mg<sup>2+</sup> gebunden und nur durch die Aufspaltung der Triphosphat-Kette des ATP in Orthophosphat und Pyrophosphat möglich. Die nach außen in Erscheinung tretende Übereinstimmung zwischen Terpen-Synthese und Alkylierung des Thioäthers könnte vielleicht ihren Grund in der Identität oder zumindest nahen Verwandtschaft der den beiden Synthesen zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen haben.



Noch mehr im Dunkel liegen die Reaktionen, durch welche 5-Phosphor-mevalonsäure mit ATP unter Dehydratisierung und Decarboxylierung Isopentenyl-pyrophosphat liefert. Wie Rilling, Tchen und Bloch<sup>32)</sup> auf Grund des geringfügigen Deuterium-Einbaus in Squalen beim Ablauf der Reaktion in schwerem Wasser vermuten, verläuft die Decarboxylierung in einem Mehrzentrenprozeß zusammen mit der Eliminierung der tertiären Hydroxyl-Gruppe. Doch ist über die Rolle des ATP bei dieser Reaktion noch nichts Genaues bekannt.

Ebensowenig Sicheres wissen wir über die chemischen Vorgänge, die der Bildung des Squalens aus Farnesyl-pyrophosphat zugrundeliegen. Nach unseren Versuchen sind die dabei beteiligten Enzyme fest in den Partikeln des Hefeextrakts oder den Mikrosomen des Leberhomogenats gebunden. Außerdem ist TPNH für die Reaktion unentbehrlich. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Wasserstoff-Transport in den Strukturelementen der Zelle, wie den Mitochondrien, lipophile Chinone bzw. Hydrochinone miteinbezieht<sup>36-38)</sup>, wird man vielleicht folgendem hypothetischen Reaktionsmechanismus Beachtung schenken können:



<sup>34)</sup> G. L. Cantoni, J. biol. Chemistry 204, 403 [1953].

<sup>35)</sup> G. L. Cantoni u. J. Durell, ebenda 225, 1033 [1957].

<sup>36)</sup> C. Martius, Proc. III. Internat. Congress of Biochemistry, Brussels 1955, Acad. Press, New York 1956, S. 1.

<sup>37)</sup> A. Nason u. I. R. Lehman, Science [Washington] 72, 19 [1955].

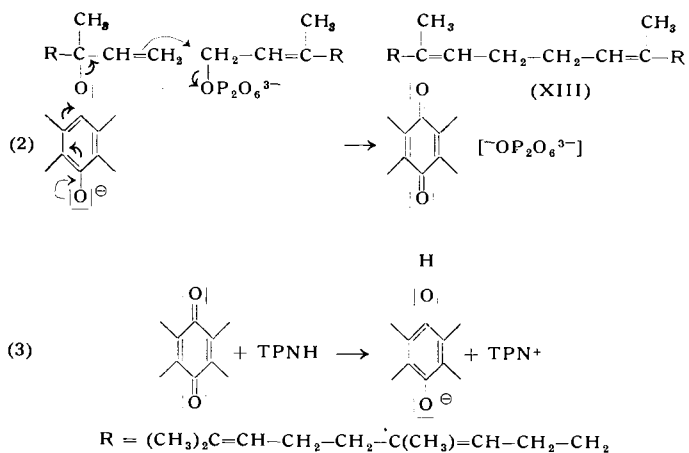
<sup>38)</sup> R. L. Lester, F. L. Crane u. Y. Hatefi, J. Amer. chem. Soc. 80, 4751 [1958].

<sup>30)</sup> N. Bucher, unveröffentl. Versuche.

<sup>31)</sup> B. Arreguin, unveröffentl. Versuche.

<sup>32)</sup> H. Rilling, T. T. Tchen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44, 167 [1958].

<sup>33)</sup> K. Bloch, Vortrag auf dem IV. Internat. Kongreß für Biochemie in Wien, 1958.



Es liegt ihm die Annahme zugrunde, daß Farnesyl-pyrophosphat unter Allyl-Umlagerung ein solches Hydrochinon zum Mono-nerolidyläther (XII) alkyliert (Gleichung 1) und dieser dann in einem Mehrzentrenprozeß mit einem zweiten Farnesyl-pyrophosphat unter Abspaltung des Chinons Squalen (XIII) liefert (Gleichung 2). Die

Aufgabe des für die Squalen-Synthese unentbehrlichen TPNH wäre es dann, das gebildete Chinon wieder zum Hydrochinon zu reduzieren (Gleichung 3).

Ein ähnlicher Kreisprozeß läßt sich auch mit dem Paar Dihydroliponsäure und Liponsäure an Stelle des Paares Hydrochinon und Chinon formulieren. Doch sollte man dann erwarten, daß die Squalen-Synthese aus Farnesyl-pyrophosphat durch As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gehemmt wird, was nach unseren Experimenten nicht der Fall ist. Die Entscheidung darüber, ob unsere Spekulationen den Vorgang richtig beschreiben, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben. Wir haben sie vorgetragen, weil sie eine einfache Erklärung dafür geben, wie die reaktionsmechanistisch sonst schwer zu formulierende Verknüpfung zweier Sesquiterpen-Einheiten „Schwanz an Schwanz“ zum Triterpen zustandekommt. Diese „irreguläre“ Verknüpfung von Terpen-Einheiten ist bei der Biogenese vieler Naturstoffe beteiligt<sup>16</sup>).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe, Dr. Karl Folkers für die Überlassung der 1-<sup>14</sup>C-Mevalonsäure und den Chemischen Werken Hüls für größere Mengen Methallylchlorid.

Eingegangen am 10. November 1958 [A 918]

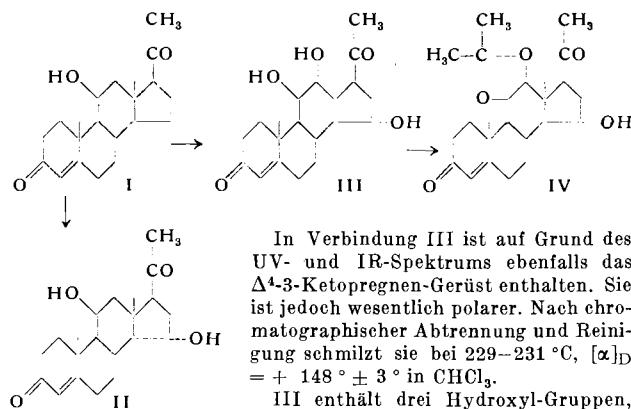
## Zuschriften

### Bildung eines vicinalen cis-Diols der Steroid-Reihe auf mikrobiellem Wege

Von Dr. rer. nat. ALFRED SCHUBERT,  
Dipl.-Chem. R. SIEBERT und cand. chem. L. KOPPE

Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

Bei der Einwirkung einer Submerskultur des Pilzes *Calonectria decora*, dessen Enzym im Steroid-Gerüst die 12- und 15-Stellung zu hydroxylieren vermag, auf 11 $\beta$ -Hydroxy-progesteron (I) wurden im Rohextrakt zwei Umsetzungsprodukte papierchromatographisch festgestellt, beim Umsatz des stereoisomeren 11 $\alpha$ -Hydroxy-progesterons nur eines<sup>1</sup>). Nach der Säulenchromatographie an Silicagel wird zuerst 11 $\beta$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxy-progesteron (II, Fp 173–175 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 230 ° ± 3° in CHCl<sub>3</sub>) isoliert; Monoacetat: Fp 224–228 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 165 ° ± 3° in CHCl<sub>3</sub>. Die Oxydation von II mit CrO<sub>3</sub> in Eisessig führt zu  $\Delta^4$ -Pregmentetraon(3.11.15.20)<sup>1</sup>).



In Verbindung III ist auf Grund des UV- und IR-Spektrums ebenfalls das  $\Delta^4$ -3-Ketopregnen-Gerüst enthalten. Sie ist jedoch wesentlich polarer. Nach chromatographischer Abtrennung und Reinigung schmilzt sie bei 229–231 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 148 ° ± 3° in CHCl<sub>3</sub>.

III enthält drei Hydroxyl-Gruppen, die mit Chromsäure in Eisessig oxydierbar sind. Das entstehende hydroxyl-freie, nicht kristallisierende Keton besitzt im IR-Spektrum eine 5-Ring-Keto-Bande bei 1748 cm<sup>-1</sup>, sowie eine sehr starke Bande bei 1710 cm<sup>-1</sup>. III bildet eine Diacetoxy-Verbindung, Fp 250–254 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 132 ° ± 3° in CHCl<sub>3</sub>. Außerdem entsteht mit Aceton IV und mit Monokaliumtriätylosmiat in Eisessig eine rot-violette Komplexverbindung<sup>2</sup>); im IR-Spektrum wird in Methylchlorid eine Schulter bei 1695 cm<sup>-1</sup> gefunden. Somit ergibt sich:

1. 2 sek. OH-Gruppen, von denen eine in 11 $\beta$ -Stellung steht, sind vicinal und in cis-Stellung angeordnet.
2. Eine OH-Gruppe besitzt eine innermolekulare Wasserstoff-Brückenbindung nach der Keto-Gruppe an C 20.
3. Eine OH-Gruppe steht im Ring D an C 15 oder C 16.

Unter Berücksichtigung früherer Ergebnisse<sup>1, 3</sup>) ist III 11 $\beta$ , 12 $\beta$ , 15 $\alpha$ -Trihydroxy-progesteron. Damit ist u.W. erstmalig mikrobiell ein vicinales cis-Diol in der Steroid-Reihe hergestellt worden.

Eingegangen am 12. August 1958 [Z 691]

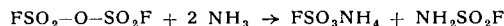
<sup>1</sup>) A. Schubert, G. Langbein u. R. Siebert, Chem. Ber. 90, 2576 [1957].  
— <sup>2</sup>) R. Criegee, B. Marchand u. H. Wannovius, Liebigs Ann. Chem. 550, 99 [1942]. — <sup>3</sup>) A. Schubert u. R. Siebert, Chem. Ber. 91, 1856 [1958].

### Amidosulfonsäurefluorid durch Ammonolyse von Disulfurylfluorid

Von Priv.-Doz. Dr. R. APPEL  
und cand. chem. G. EISENHAUER

Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Trisulfurylfluorid, S<sub>3</sub>O<sub>6</sub>F<sub>2</sub>, erleidet bei der Reaktion mit Ammoniak totale Ammonolyse der S–O–S-Bindung, wogegen die S–F-Bindungen größtenteils intakt bleiben<sup>1</sup>). Unter den Reaktionsprodukten wurde das Amidosulfonsäurefluorid vermutet<sup>2</sup>). Nachdem wir das NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>F näher studieren konnten<sup>3, 4</sup>), lag die Ammonolyse des Disulfurylfluorids, S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub>, nach



nahe, die auch tatsächlich so verläuft (S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub> in Acetonitril, –15 °C bis 0 °C, gasförmiges Ammoniak). Das Amidosulfonsäurefluorid bleibt im Lösungsmittel und kann leicht nach Entfernen des Ammoniumfluorsulfonats und des Acetonitrils erhalten werden. Es ist mit dem nach <sup>3</sup>) dargestellten Präparat identisch; Ausbeute bei 40 % d.Th.

Eingegangen am 10. November 1958 [Z 695]

<sup>1</sup>) R. Appel, G. Voigt u. E. H. Sadek, Naturwissenschaften 43, 496 [1956]. — <sup>2</sup>) R. Appel, Habilitationsschrift Heidelberg, 1955, S. 99. — <sup>3</sup>) R. Appel u. W. Senkpiel, diese Ztschr. 70, 572 [1958]. — <sup>4</sup>) Vgl. auch H. Jonas u. D. Voigt, ebenda 70, 572 [1958].

### Neue Darstellung von Disulfurylfluorid

Von Priv.-Doz. Dr. R. APPEL  
und cand. chem. G. EISENHAUER

Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Disulfurylfluorid kann durch Umsetzung von Schwefeltrioxyd mit Antimonpentafluorid sowie durch Reaktion von As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mit Fluorsulfonsäure gewonnen werden<sup>1</sup>). Wir erhielten es einfach und mit guter Ausbeute bei der Einwirkung von Chloreyan auf Fluorsulfonsäure. Man leitet gasförmiges ClCN in auf 90–100 °C erhitzte Fluorsulfonsäure ein. Die Reaktion verläuft unter CO<sub>2</sub>- und HCl-Abspaltung. Es wird von nicht umgesetzter Fluorsulfon-