

Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk

Von Prof. Dr. F. LYNNEN*) und Dr. U. HENNING

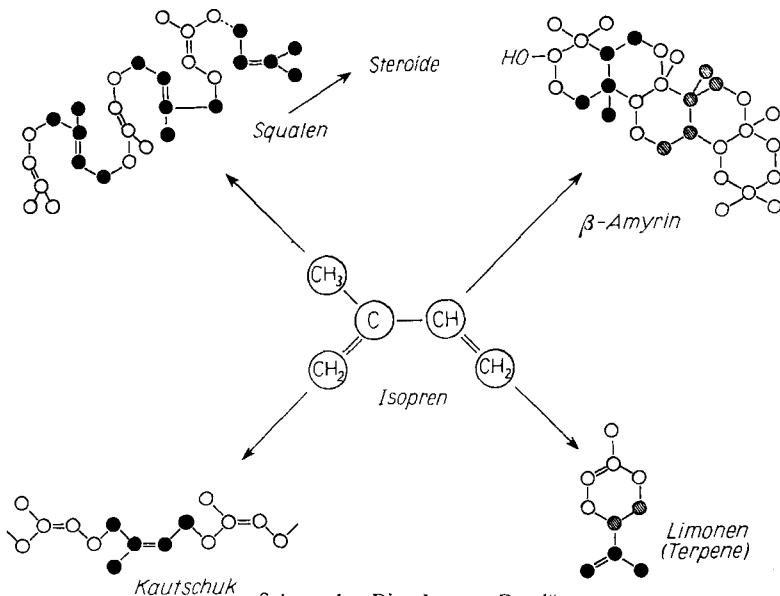
Max-Planck-Institut für Zellchemie, München und Chemisches Universitätslaboratorium, München, Institut für Biochemie

Von der Entdeckung des Isoprens als Abbauprodukt und Baustein des natürlichen Kautschuks führt eine Fülle von Arbeiten zu der Erkenntnis, daß auch viele andere, teils höchst kompliziert gebaute Naturstoffe ein Polyisopren-Gerüst besitzen. Ruzickas „Isopren-Regel“ hat sich als ungemein fruchtbar erwiesen. Der Ablauf der biologischen Kautschuk-Synthese ist heute prinzipiell als gelöst zu betrachten. Die hier näher beschriebene Reaktionsfolge läßt einerseits manche Eigenschaften des Kautschuks verstehen und zeigt andererseits noch bestehende Forschungsprobleme auf.

Zur Isopren-Regel

Der erste Einblick in die chemische Struktur des Kautschuks wurde zu Ende des vorigen Jahrhunderts auf dem Wege der trockenen Destillation gewonnen. Nachdem sich eine Reihe bedeutender Chemiker, wie Dalton, Dumas, Liebig und Faraday (vgl.¹⁾) bereits mit der dabei gebildeten niedrigsiedenden Fraktion ungesättigter Kohlenwasserstoffe beschäftigt hatte, führten schließlich die sorgfältigen Untersuchungen Williams²⁾ zur richtigen Bruttoformel C₅H₈ des Isoprens und die Arbeiten Ipatjew³⁾ und Wittorf³⁾ zur Aufklärung der Strukturformel. Sie wurde kurz darauf von Euler⁴⁾ durch Synthese endgültig bewiesen. Die Isopren-Bildung beim pyrogenen Zerfall des Kautschuks veranlaßte Bouchardat⁵⁾, der die Versuche von Williams wiederholt hatte, Isopren als Baustein des Kautschuks und diesen somit als ein polymeres Isopren zu betrachten, was dann später in erster Linie durch die Untersuchungen von Harries⁶⁾ und Staudinger⁷⁾ streng bewiesen wurde.

Es hat sich später herausgestellt, daß Isopren nicht nur dem Kautschuk als Bauelement zugrundeliegt, sondern vielen Naturstoffen. Die klassischen Untersuchungen von Wallach⁸⁾ u. a. (vgl.¹⁾), vor allem aber von Ruzicka^{1,9)} führten



*) Nach einem Vortrag auf der Tagung der GDCh-Fachgruppe „Kunststoffe und Kautschuk“ in Bad Nauheim, 2. Mai 1960.

¹⁾ L. Ruzicka, Proc. Chem. Soc. [London] 1959, 341.

²⁾ G. Williams, Philos. Trans. Roy. Soc. London 150, 241 [1860]; J. chem. Soc. [London] 15, 110 [1862].

³⁾ W. Ipatjew u. N. Wittorf, J. prakt. Chem. [2], 55, 1 [1897].

⁴⁾ W. Euler, J. prakt. Chem. [2], 57, 131 [1898].

⁵⁾ G. Bouchardat, Bull. Soc. chim. France [2] 24, 109 [1875]; C.R. hebd. Séances Acad. Sci. 80, 1447 [1875].

⁶⁾ C. D. Harries: Untersuchungen über die natürlichen und künstlichen Kautschukarten, Berlin 1919.

⁷⁾ H. Staudinger: Die hochmolekularen organischen Verbindungen Kautschuk und Cellulose. Verlag Springer, Berlin 1932.

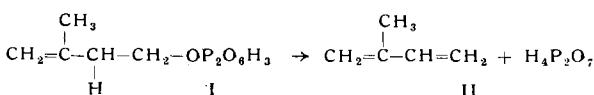
⁸⁾ O. Wallach, Liebigs Ann. Chem. 227, 277 [1885].

⁹⁾ L. Ruzicka, Experientia 9, 357 [1953].

zu der Erkenntnis, daß sich nicht nur der Aufbau der Monoterpe und des Kautschuks durch Aneinanderlagerung von Isopren-Resten erklären läßt, sondern dieses Bauprinzip auch bei vielen anderen Naturstoffen, auch solchen mit höchst komplizierter Struktur, gültig ist. Dieser Bauplan der Polyterpene tritt am klarsten zutage, wenn man von den in der Moleköl anwesenden funktionellen Gruppen absieht und nur die fortlaufend aneinander gebundenen Kohlenstoffatome berücksichtigt. Wie Formelschema 1 zeigt, läßt sich das Kohlenstoffgerüst der Polyterpene schematisch in Isopren-Reste zerlegen, die in der Moleköl mehrfach enthalten sind.

Wir können heute feststellen, daß sich die Ruzickasche „Isopren-Regel“¹⁰⁾ bei der chemischen Konstitutionsermittlung vieler Naturstoffe als ungemein fruchtbar erwiesen hat. Insbesondere als man erkannte, daß ihr Geltungsbereich nicht auf die Klasse der Mono- und Polyterpene begrenzt ist, sondern auch auf die Sterine und Gallensäuren, die Carotinoide und lebenswichtige Wirkstoffe, wie die Vitamine A, E und K, oder das erst vor kurzem entdeckte Ubichinon ausgedehnt werden kann. In den aus dieser C₅-Einheit aufgebauten Kohlenstoffketten liegt eines der Bauprinzipien vor, das in der lebendigen Substanz mit am weitesten verbreitet ist.

Für den Biochemiker stellte sich damit die Aufgabe, den chemischen Grundlagen dieser Biosynthesen nachzuspüren, denn das Bestehen einer „Isopren-Regel“ ließ sich nur dadurch erklären, daß beim Aufbau aller dieser Verbindungen, also bei der Synthese des Kautschuks, der Monoterpe oder des Cholesterins, ein gemeinsamer Baustein Verwendung findet. Es war überraschend, zeigte aber für den feinen Spürsinn der Begründer der Isopren-Hypothese, als dieser Baustein nach langem Suchen schließlich 1958 im Laboratorium von Bloch¹⁰⁾ und im Münchener Arbeitskreis¹¹⁾ tatsächlich mit einem verkappten Isopren, mit Δ³-Isopentenyl-pyrophosphorsäure(I), identifiziert wurde. Wie ein Blick auf die Strukturformel dieses sogenannten „aktiven Isoprens“ erkennen läßt, würde es durch Abspaltung von Pyrophosphorsäure in Isopren (II) übergehen.



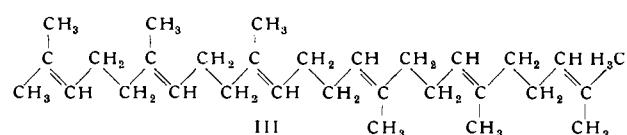
Allerdings ist dieser Vorgang bei der biologischen Terpensynthese nicht beteiligt, wie wir später noch sehen werden.

¹⁰⁾ S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Chen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 998 [1958].

¹¹⁾ F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 [1958].

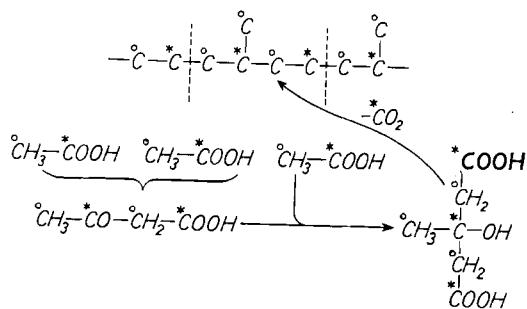
Baustein Essigsäure

Zunächst soll jedoch darüber berichtet werden, wie diese Isopentenyl-pyrophosphorsäure entdeckt wurde. Es war ein langer Weg, an dessen Anfang die wichtige Beobachtung lag, daß bei der Biosynthese der Sterine Essigsäure als Baustein benutzt wird. Ein Schüler Wielands, Robert Sonderhoff, der als einer der ersten die Methode der „Markierung durch Isotope“ auf Stoffwechselprobleme anwandte, fütterte Hefezellen mit Trideutero-essigsäure und fand bei der Verarbeitung der Zellen überraschenderweise, daß große Mengen Deuterium in den Sterinen der Hefe enthalten waren¹²⁾. Durch den frühen Tod Sonderhoffs kamen diese Untersuchungen im Münchener Laboratorium zum Stehen, so daß erst Bloch die Beziehungen zwischen Essigsäure und den Sterinen klarstellen sollte. Bloch¹³⁾ konnte in einer Reihe glänzender Untersuchungen nachweisen, daß alle 27 Kohlenstoffatome des Cholesterins aus Essigsäure stammen und daß die Biosynthese über den aliphatischen Terpenkohlenwasserstoff Squalen (III) führt^{14, 15)}, wie dies Channon¹⁶⁾ aus Fütterungsversuchen an Ratten bereits 1926 erschlossen hatte.



Mit diesen wichtigen Beobachtungen wurde das Problem der Cholesterin-Synthese auf das der Terpen-Synthese zurückgeführt, was bedeutet, daß die Cholesterin-Bildung im Tierkörper und die Synthese der ätherischen Öle oder des Kautschuks in der Pflanze streckenweise gleichlaufend sind. Das Studium der Squalen- und Cholesterin-Synthese konnte somit wesentliche Erkenntnisse auch für die Kautschuksynthese vermitteln. Tatsächlich konnten Arreguin, Bonner und Wood¹⁷⁾ 1951 mit Hilfe der Isotopenmethode nachweisen, daß auch das Kohlenstoffgerüst des Kautschuks aus Essigsäure aufgebaut wird. Diese Säure erwies sich dann in der Folgezeit als der gemeinsame einfachste Baustein für alle unter die Isopren-Regel fallenden Naturstoffe.

Für die Frage, auf welchem Weg Essigsäure in die Terpene umgewandelt wird, waren Experimente von Bloch¹³⁾ und von Cornforth und Popják¹⁸⁾ aufschlußreich, in denen die Verwertung von Methyl- und Carboxyl-markierter Essigsäure studiert wurde. Wie sich dabei ergab, wechseln im Kohlenstoff-Skelett des Cholesterins oder Squalens Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoff ab, während die seitenständigen C-Atome ausschließlich aus der Methylgruppe der Essigsäure stammen (Schema 2). Eine solche Verteilung



Schema 2. Die Verteilung der C-Atome des Acetats in den Terpenen

¹²⁾ R. Sonderhoff u. H. Thomas, Liebigs Ann. Chem. 530, 195 [1937].

¹³⁾ K. Bloch, Harvey Lectures 48, 68 [1954].

¹⁴⁾ R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 129, 135 [1953].

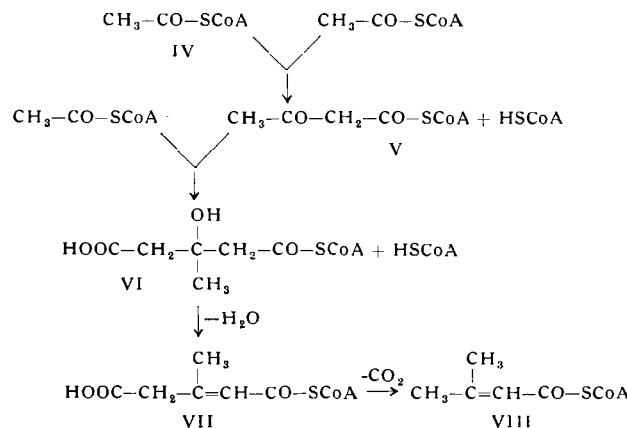
¹⁵⁾ R. B. Woodward u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 75, 2023 [1953].

¹⁶⁾ H. J. Channon, Biochem. J. 20, 400 [1926].

¹⁷⁾ B. Arreguin, J. Bonner u. B. J. Wood, Arch. Biochem. Biophys. 31, 234 [1951].

¹⁸⁾ Übersicht vgl. G. Popják, Ann. Rev. Biochem. 27, 533 [1958].

der C-Atome ist aber zu erwarten, wenn die C₅-Einheit der Terpene aus drei Essigsäuremolekülen über Acetessigsäure und β-Hydroxy-β-methyl-glutarsäure unter Decarboxylierung gebildet wird¹⁹⁾. Als dann 1950 die sogenannte „aktivierte Essigsäure“ gefunden und als der Essigsäure-thioester des Coenzym A (= Acetyl-CoA, IV) identifiziert war²⁰⁾, stellte Lynen²¹⁾ den in Schema 3 wiedergegebenen hypothetischen Reaktionsverlauf auf. Die in diesem Schema postulierte Folge von Kondensationsreaktionen, die über Acetacetyl-CoA (V) zu β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl-CoA (VI) führt, konnte später durch Untersuchungen, an denen verschiedene Laboratorien beteiligt waren, unter Verwendung gereinigter Enzyme aus Säugetierleber und aus Hefe experimentell bewiesen werden²¹⁻²⁴⁾. Da die Isotopenversuche von Bloch bzw. von Cornforth und Popják außerdem ergeben hatten, daß bei der Umwandlung der β-Hydroxy-β-methyl-glutarsäure in die Polyterpene eine Carboxylgruppe als CO₂ eliminiert wird, war die Annahme naheliegend, daß der gesuchte C₅-Baustein β-Methyl-crotonyl-CoA (VII) sei. Diese Verbindung könnte aus β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl-CoA durch Wasserabspaltung zu β-Methyl-glutaconyl-CoA (VII) und anschließende Decarboxylierung gebildet werden (Schema 3). Außerdem ließ sich mit dieser Annahme auch die Beobachtung von Arreguin und Bonner²⁵⁾ erklären, daß die Kautschukbildung in der Pflanze durch Zufuhr von β-Methyl-crotonsäure gefördert wird. Rückblickend läßt sich heute feststellen, daß die in Schema 3 formulierte Umwandlung von β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl-CoA in



Schema 3. Bildungsweise von β-Hydroxy-β-methylglutaryl-CoA aus Acetyl-CoA

β-Methyl-crotonyl-CoA zwar in vielen Organismen angetroffen wird, sie ist jedoch bei der Umwandlung von β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl-CoA in die Terpene oder in Kautschuk nicht beteiligt.

Mevalonsäure, das Bindeglied

Der richtige Weg wurde in Experimenten gefunden, die mit dem Problem der Terpensynthese zunächst nichts zu tun hatten. Seit der Entdeckung der Vitamine um die Jahrhundertwende gehört die Suche nach neuen unbekannten Nahrungsfaktoren zu den reizvollsten Problemen der Biochemie. Im Jahre 1956 kam man bei solchen Untersuchun-

¹⁹⁾ F. Lynen, E. Reichert u. L. Rueff, Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].

²⁰⁾ Vgl. F. Lynen, Vortr. vor der Chemischen Gesellschaft, Freiburg i. Br., 16. Nov. 1951; s. a. Nature [London] 174, 962 [1954].

²¹⁾ F. Lynen u. S. Ochoa, Biochim. Biophys. Acta 12, 299 [1953].

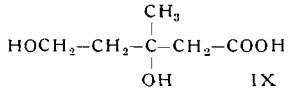
²²⁾ D. S. Goldman, J. biol. Chemistry 208, 345 [1954].

²³⁾ H. Rudney u. J. J. Ferguson jr., J. biol. Chemistry 234, 1076 [1959].

²⁴⁾ F. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 [1958].

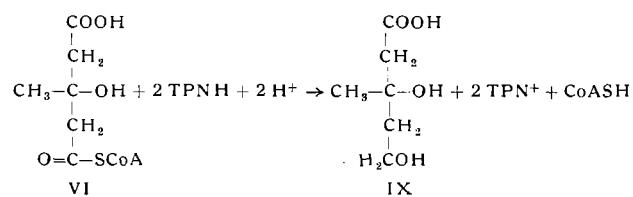
²⁵⁾ B. Arreguin u. J. Bonner, Arch. Biochem. 26, 178 [1950].

gen im wissenschaftlichen Laboratorium der Merck, Sharp und Dohme Company, Rahway, USA, einem neuen Wuchsstoff für den Milchsäurebildner *Lactobacillus acidophilus* auf die Spur, der, dem Kulturmedium in ganz kleiner Menge zugesetzt, die sonst zum Wachstum erforderliche Essigsäure ersetzen kann. Nach mühevoller Arbeit gelang es im Arbeitskreis um *Folkers*²⁶⁾, den reinen Wirkstoff aus hefehaltigen Rückständen der Branntweinfabrikation zu isolieren und durch Abbau und Synthese mit 3,5-Dihydroxy-3-methyl-valeriansäure oder Mevalonsäure (IX) zu identifizieren.



Wirtschaftlich gesehen war der mit diesen Untersuchungen verbundene Arbeitsaufwand unrentabel, denn es stellte sich rasch heraus, daß die Verfütterung von Mevalonsäure bei Mensch und Tier keine Wirkung hat. Umso höher war aber der wissenschaftliche Ertrag, da in der Mevalonsäure ein wichtiges Glied in der chemischen Reaktionskette vom β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA zu den Terpenen entdeckt worden war. Jetzt trat das Studium der biologischen Terpen-Synthese in eine neue Phase ein. Nachdem *Tavormina*, *Gibbs* und *Huff*²⁷⁾ gezeigt hatten, daß zellfreie Leberextrakte radioaktiv markierte Mevalonsäure in Cholesterin einzubauen vermögen, erschienen in rascher Folge Veröffentlichungen aus verschiedenen Laboratorien, in denen die Umwandlung der Mevalonsäure in den aliphatischen Kohlenwasserstoff Squalen²⁸⁻³¹⁾, in cyclische Mono- und Triterpene^{32,33)}, in Kautschuk³⁴⁾, in die Carotinoide^{35,36)}, in Vitamin K₂³⁷⁾ oder in Ubichinon³⁸⁾ beschrieben wurde. Es stand damit außer Zweifel, daß Mevalonsäure das Bindeglied zwischen Essigsäure und dem „aktiven Isopren“ ist.

Die Aufklärung der Mevalonsäure-Bildung aus Acetyl-CoA war durch die Untersuchungen zur β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA-Synthese vorbereitet. Wie ein Vergleich der Strukturformeln von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (VI) und Mevalonsäure (IX) offenbart, besitzen beide Verbindungen das gleiche Kohlenstoffgerüst und weichen nur im Oxydationszustand voneinander ab. Es gelang dann auch *Rudney*³⁹⁾ in Cleveland sowie *Knappe*⁴⁰⁾ und *Bucher*⁴¹⁾



²⁶⁾ Vgl. *K. Folkers* in *G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, J. and A. Churchill Ltd., London 1959, S. 20.

²⁷⁾ *P. A. Tavormina, M. H. Gibbs u. J. W. Huff*, J. Amer. chem. Soc. 78, 4498 [1956].

²⁸⁾ *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popják u. I. Y. Gore*, Biochem. J. 69, 146 [1958].

²⁹⁾ *B. H. Amdur, H. Rilling u. K. Bloch*, J. Amer. chem. Soc. 79, 2646 [1957].

³⁰⁾ *F. Dituri, J. L. Rabinowitz, R. P. Hullin u. S. Gurin*, J. biol. Chemistry 229, 825 [1957].

³¹⁾ *F. Lynen*, Proc. International Symposium on Enzyme Chemistry Tokyo and Kyoto 1957, Maruzen Tokyo 1958, S. 57.

³²⁾ *R. G. Stanley*, Nature [London] 182, 738 [1958].

³³⁾ *D. Aragoni*, Experientia 14, 153 [1958].

³⁴⁾ *R. B. Park u. J. Bonner*, J. biol. Chemistry 233, 340 [1958].

³⁵⁾ *E. C. Grob*, Chimia [Zürich] 11, 338 [1957].

³⁶⁾ *G. D. Braithwaite u. T. W. Goodwin*, Biochem. J. 67, 13 p [1957].

³⁷⁾ *C. Martius u. H. O. Esser*, Biochem. Z. 337, 1 [1959].

³⁸⁾ *U. Gloor u. O. Wiss*, Experientia 14, 410 [1958].

³⁹⁾ *J. J. Ferguson jr., I. F. Durr u. H. Rudney*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 499 [1959].

⁴⁰⁾ *J. Knappe, E. Ringelmann u. F. Lynen*, Biochem. Z. 332, 195 [1959].

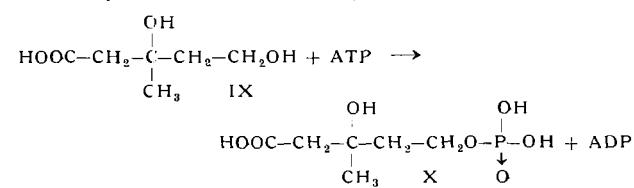
⁴¹⁾ *N. L. R. Bucher, P. Overath u. F. Lynen*, Fed. Proc. 18, 20 [1959]; Biochim. Biophys. Acta 40, 491 [1960].

im Münchener Laboratorium, die enzymatische Reduktion von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA zu Mevalonsäure in Hefe- und Leberextrakten nachzuweisen. Als Reduktionsmittel wirkte dabei TPNH.

Parallel zu diesen Untersuchungen, mit denen die Bildung der Mevalonsäure aus Acetyl-CoA klargestellt wurde, beschäftigten sich auch mehrere Arbeitskreise mit der weiteren Umwandlung der Mevalonsäure in Cholesterin bzw. Squalen. Eine erste wichtige Information vermittelten die Untersuchungen von *Tavormina* und *Gibbs*⁴²⁾. Durch Experimente mit 1^{14}C -Mevalonsäure konnte nachgewiesen werden, daß die Carboxylgruppe bei der Terpensynthese als CO_2 abgespalten wird und die restlichen fünf Kohlenstoffatome eingebaut werden. Die damit angezeigte Verknüpfung zwischen C-2 eines Mevalonsäure-Restes mit C-5 des folgenden könnte durch Untersuchungen von *Cornforth* und Mitarbeitern²⁸⁾ und von *Gurin* und Mitarbeitern³⁰⁾ experimentell bewiesen werden. Außerdem fand man sowohl bei *Bloch*²⁹⁾ als auch im Münchener Laboratorium³¹⁾, daß der Aufbau der Kohlenstoffketten aus Mevalonsäure nicht über die intermediäre Oxydation der primären Alkoholgruppe zum entsprechenden Aldehyd verläuft.

Genaueren Einblick in den Verlauf der Terpensynthese vermittelten schließlich Experimente mit zellfreien Hefe- und Leberextrakten. Beim Experimentieren mit lebenden Zellen ist es im allgemeinen nicht möglich, die Zwischenstufen biosynthetischer Reaktionsketten aufzuspüren, da sie nur in sehr kleiner Konzentration vorliegen. Die Biochemiker trachten daher, diese Schwierigkeit zu umgehen, indem sie mit Zellextrakten arbeiten, die noch möglichst viele der synthetischen Fähigkeiten des intakten Organismus besitzen. So läßt sich aus Hefezellen, die mit Hilfe von Glasperlen in einer hochtourigen Schüttelmaschine zerkleinert wurden, ein eiweißhaltiger Extrakt gewinnen, der mit bestimmten Zusätzen Mevalonsäure in Squalen umwandelt. Der Stoffumsatz ist zwar nicht groß und liegt im Bereich weniger μg . Er läßt sich aber mit Hilfe der empfindlichen radioaktiven Markierungsmethode, bei der man die Inkorporation radioaktiver Atome des Ausgangsstoffs in das Reaktionsprodukt mißt, einwandfrei verfolgen.

Wie in verschiedenen Arbeitskreisen mit dieser Methode gefunden wurde, können zellfreie Hefe- und Leberextrakte Squalen aus Mevalonsäure synthetisieren, wenn man dem System ATP als Energiequelle, zweiwertige Mg oder Mn^{2+} -Ionen und TPNH oder DPNH als Reduktionsmittel zusetzt^{28-31, 43)}. Der erste Schritt dieser Biosynthese ist die Phosphorylierung der Mevalonsäure durch ATP, wobei 5-Phospho-mevalonsäure (X) entsteht⁴⁴⁻⁴⁸⁾.



Kleine Mengen des Phosphatesters konnten aus Enzyversuchen isoliert und durch Vergleich mit synthetischer 5-Phospho-mevalonsäure einwandfrei identifiziert werden⁴⁵⁾. Bei der chemischen Synthese, die *Kirschner*⁴⁷⁾ im

⁴²⁾ *P. A. Tavormina u. M. H. Gibbs*, J. Amer. chem. Soc. 78, 6210 [1956].

⁴³⁾ *G. Popják, L. Gosselin, I. Y. Gore u. R. G. Gould*, Biochem. J. 69, 238 [1958].

⁴⁴⁾ *T. T. Tchen*, J. Amer. chem. Soc. 79, 6344 [1957]; J. biol. Chemistry 233, 1100 [1958].

⁴⁵⁾ *F. Lynen*, in *G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, J. and A. Churchill Ltd., London 1959, S. 95.

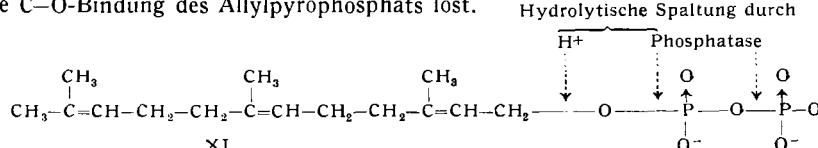
⁴⁶⁾ *G. Popják*, ebenda, S. 148.

⁴⁷⁾ *K. Kirschner*, Diplomarbeit, Univers. München 1958.

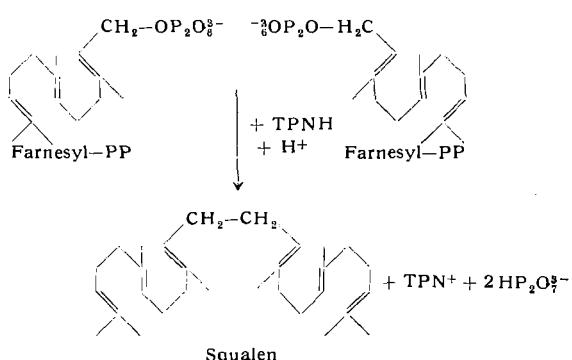
Münchener Laboratorium ausführte, wurde Mevalonsäure mit POCl_3 in Pyridin phosphoryliert, das komplizierte Reaktionsgemisch chromatographisch an Dowex 2 in die Komponenten zerlegt und die 5-Phospho-mevalonsäure schließlich als neutrales Cyclohexylammoniumsalz kristallisiert.

Für die weitere Umwandlung der phosphorylierten Mevalonsäure in Squalen erwiesen sich aber noch die gleichen Zusätze – ATP, TPNH, Mg^{2+} und Hefeextrakt – als nötig wie für die Synthese aus freier Mevalonsäure^{48, 49}). Die Synthese läuft somit immer noch über mehrere Zwischenprodukte und schließt sowohl ATP-verbrauchende als auch TPNH-verbrauchende Reaktionen ein. Wir konnten diese voneinander trennen, indem wir bei den Versuchen mit Hefeextrakten kein Reduktionsmittel in Form von TPNH oder DPNH zusetzen, oder als Enzymquelle Extrakte einsetzen, die durch Autolyse der Hefezellen mit Toluol erhalten wurden. Unter diesen Bedingungen verschwindet Phospho-mevalonsäure so wie im kompletten Ansatz, es entsteht aber kein Squalen, sondern ein phosphat-haltiges Zwischenprodukt, das sich mit Collidin aus dem Reaktionsgemisch extrahieren und durch Verteilungschromatographie reinigen lässt. Wird die gereinigte radioaktive Verbindung zusammen mit TPNH oder DPNH, aber nun ohne ATP, mit Hefeenzymen inkubiert, dann entsteht radioaktives Squalen⁴⁹.

Dieses neue Zwischenprodukt identifizierten wir als Farnesyl-pyrophosphat (XI)⁴⁹. Seine hervorstechendste Eigenschaft ist die große Säureempfindlichkeit, bedingt durch die Allylpyrophosphat-Gruppierung. Wird seine wässrige Lösung in der Kälte auf pH 1 gebracht, so spaltet sich anorganische Pyrophosphorsäure ab. Der organische Teil der Molekel liefert dabei unter teilweiser Allylumlagerung eine Mischung aus Farnesol und Nerolidol. Bei der enzymatischen Hydrolyse mittels Phosphatase entsteht jedoch ausschließlich Farnesol, was sich dadurch erklärt, daß das Enzym die O-P-Bindung, Säure dagegen die C-O-Bindung des Allylpyrophosphats löst.



Wir hatten mit diesen Versuchen die Bildung eines Sesquiterpen-Derivats aus Mevalonsäure nachgewiesen, das im Hefeextrakt unter Reduktion durch TPNH oder DPNH in den Triterpenkohlenwasserstoff Squalen übergeführt wird (Schema 4). Das gesuchte „aktive Isopren“ mußte somit eine Vorstufe des Farnesyl-pyro-



Schema 4. Reduktive Dimerisierung von Farnesylpyrophosphat zum Squalen

⁴⁸⁾ S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 998 [1958].

⁴⁹⁾ F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 [1958].

phosphats sein. Wir fanden es schließlich bei Hemmungsversuchen mit Jodacetamid⁴⁹). Wird nämlich dem Reaktionsgemisch, in dem wir die Umwandlung der radioaktiven 5-Phospho-mevalonsäure in Farnesyl-pyrophosphat studierten, M/200-Jodacetamid zugesetzt, dann bleibt die Bildung von Farnesyl-pyrophosphat aus und an seine Stelle tritt ein anderes Zwischenprodukt, das sich mittels Hochspannungs-Ionophorese abtrennen lässt. In Abb. 1 ist die Auswertung eines ionophoretisch aufgetrennten Reaktionsansatzes im Radiopapierchromatographen gezeigt. Die obere

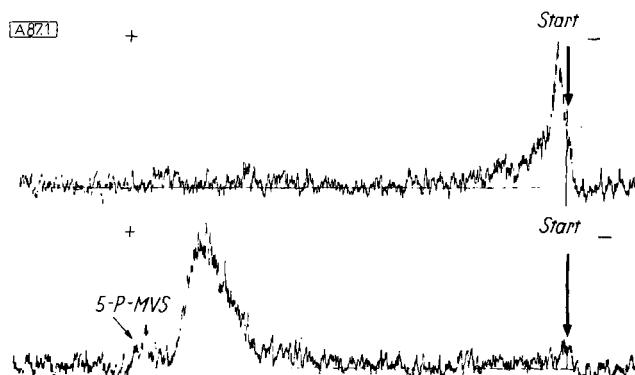
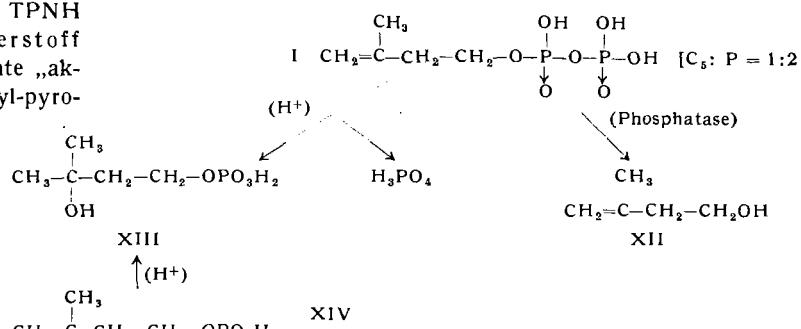


Abb. 1. Papierionophoretischer Nachweis von Isopentenylpyrophosphat⁴⁹). $10 \mu\text{M}$ Trispuffer, pH 8; $10 \mu\text{M}$ KF; $2 \mu\text{M}$ Mg_2 -äthylen-diamin-tetraacetat; $2 \mu\text{M}$ ATP; $0,078 \mu\text{M}$ $2-\text{C}^{14}\text{-Mevalonsäure-5-phosphat}$ (3300 Imp/min), 300γ Enzymfraktion I und 140γ Enzymfraktion II⁴⁹). Im Versuch zur unteren Kurve außerdem $1 \mu\text{M}$ Jodacetamid. Vol. 0,2 ml; 60 min. Papier-Ionophorese: Pyridin-Acetat-Puffer, pH 6,2; 43 Volt/cm; 70 mA; 90 min

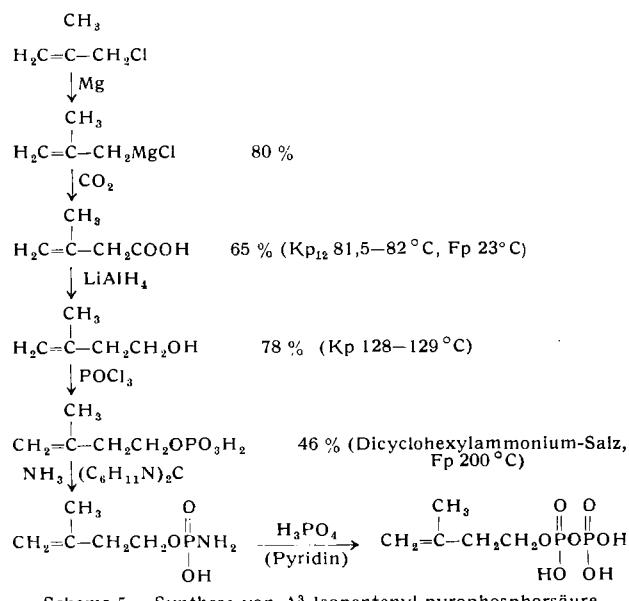
Kurve gehört zum Versuch ohne Jodacetamid; man erkennt nur die Bande des sich kaum vom Startpunkt entfernen Farnesyl-pyrophosphats. Im Versuch mit Jodacetamid – der unteren Kurve – fehlt diese Verbindung. An ihrer Stelle sind neben einem Rest des weit anodisch gewanderten Ausgangsmaterials Phospho-mevalonsäure (5-P-MVS) große Mengen des etwas langsamer gewanderten Umwandlungsprodukts zu erkennen. Wie die chemische Untersuchung der eluierten und durch präparative Papierchromatographie weiter gereinigten Substanz ergab, lag hier die schon erwähnte

Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure (I) vor.



Ihre chemische Struktur leitete sich aus dem Auftreten von Δ^3 -Isopentenol (XII) als Produkt der phosphatatischen Hydrolyse und der Anwesenheit von zwei gebundenen Phosphorsäure-Resten je Isopentenol ab, wovon einer bei kurzer Hydrolyse in kochender n-Salzsäure als Orthophosphorsäure abgespalten wurde. Das andere Spaltstück konnte mit 3-Methyl-1,3-butandiol-1-phosphorsäure (XIII) identifiziert werden, die unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse aus synthetischer Δ^3 -Isopentenyl-phosphorsäure (XIV) entstand⁴⁹.

Der endgültige Beweis für die Struktur des „aktiven Isoprens“ konnte durch die chemische Synthese des Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphats erbracht werden, die Eggerer^{49, 50)} im Münchener Laboratorium auf dem in Schema 5 skizzierten Wege gelang. Die Grignard-Verbindung des Methallylchlorids lieferte bei der Umsetzung mit CO_2 Δ^3 -Isopentensäure, die mit LiAlH_4 zum Δ^3 -Isopentenol reduziert und



Schema 5. Synthese von Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure

anschließend durch Behandlung mit POCl_3 in Pyridin in Δ^3 -Isopentenyl-phosphorsäure umgewandelt wurde. Der Phosphorsäureester wurde nach der Methode Khoranas über das Amid in Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure übergeführt, die als neutrales Silbersalz⁵²⁾ kristallisiert und sich in allen Eigenschaften als identisch mit dem aus den Enzymversuchen isolierten Zwischenprodukt erwies. Eine Synthese der Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure wurde auch von Yuan und Bloch⁵¹⁾ ausgearbeitet.

Eggerer verwendete dann bei der Synthese der Δ^3 -Isopentensäure radioaktives CO_2 und erhielt so radioaktive 1^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphorsäure. Beim Bebrüten der synthetischen radioaktiven Verbindung mit TPNH und Hefeextrakt in Gegenwart von Mg^{2+} wurde radioaktives Squalen gebildet (Tabelle 1); im sonst gleichen Ansatz, aber ohne TPNH entstand radioaktives Farnesyl-pyrophosphat⁴⁹⁾.

40 μM TRIS-Puffer p_{H} 8,0; 30 μM KF; 1 μM Glucose-6-phosphat; 0,2 μM TPN; 3,5 bzw. 2,5 mg Protein (Hefeextrakt); Völ. 0,6 ml; 60 min bei 37 °C inkubiert

	0,023 μM natürliche Isopentenyl-PP (980 Imp./min)	0,20 μM synthetisches 1^{14}C -Isopentenyl-PP (570 Imp./min)
μM MgCl_2	—	12
μM K ₄ -äthylen-diamintetraacetat	6	6
Imp./min im Squalen	34	550
	3	250

Tabelle 1. Einbau von Isopentenyl-pyrophosphat in Squalen

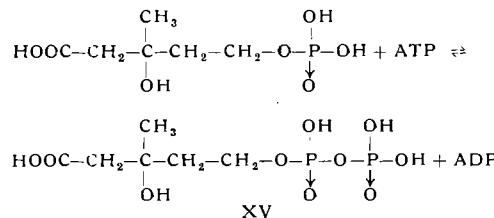
⁵⁰⁾ H. Eggerer u. F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 630, 58 [1960].

⁵¹⁾ C. Yuan u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 234, 2605 [1959].

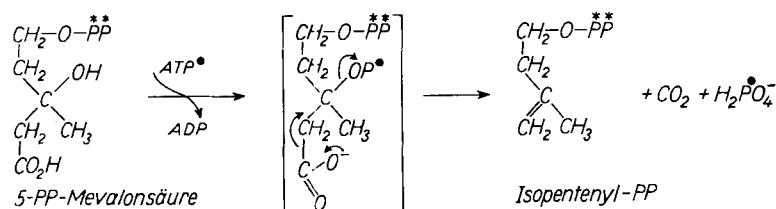
⁵²⁾ F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning u. E. M. Mösslein, Angew. Chem. 71, 657 [1959].

Zu den Polyterpenen

Nach der Identifizierung des „aktiven Isoprens“ mit Isopentenyl-pyrophosphat galt es noch, seine Bildung aus Phospho-mevalonsäure sowie seine Umwandlung in die Polyterpene aufzuklären. Mit dem ersten Vorgang beschäftigten sich die Arbeitskreise in Boston^{48, 53, 54)} und in München^{55, 56)}. Zuerst wird die 5-Phospho-mevalonsäure ebenfalls durch ATP phosphoryliert; es resultiert die 5-Pyrophospho-mevalonsäure (XV).



Das nächste faßbare Zwischenprodukt in der Synthesekette ist bereits Isopentenyl-pyrophosphat. Seine Bildung aus 5-Pyrophospho-mevalonsäure ist wiederum an die Gegenwart von Mg^{2+} und ATP gebunden^{53, 55)}, das im Reaktionsgeschehen zu ADP und Orthophosphat gespalten wird. Da beim Studium der Reaktion in tritium-haltigem Wasser keine Spur Tritium in das gebildete Isopentenyl-pyrophosphat übergeht^{53, 56)}, gewinnt der von Bloch⁵³⁾ vorgeschlagene Mehrzentrenprozeß an Wahrscheinlichkeit (Schema 6). Demnach wird die Pyrophospho-mevalonsäure durch ATP an der tertiären Hydroxylgruppe phosphoryliert und das Produkt stabilisiert sich sofort unter gleichzeitiger Eliminierung von Phosphorsäure und CO_2 zu Isopentenyl-pyrophosphat. Für diesen Mechanismus spricht auch, daß weder



Schema 6. Mechanismus der Umwandlung von 5-Pyrophospho-mevalonsäure in Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure

Bloch⁵⁴⁾ noch Henning⁵⁶⁾ ein Zwischenprodukt der Umsetzung nachweisen konnten.

Den Einblick in die Verknüpfung mehrerer C_5 -Einheiten von „aktiven Isoprenen“ zu den Polyterpenen vermittelten Versuche mit radioaktivem Isopentenyl-pyrophosphat, das nach dem vorhin beschriebenen Verfahren synthetisiert wurde. Wird diese Verbindung mit rohem Hefeextrakt und Mg^{2+} -Ionen inkubiert, so entsteht durch Verschiebung der Doppelbindung γ, γ -Dimethylallyl-pyrophosphat (XVI). Da in diesem niederen Homologen des Farnesyl-pyrophosphats ebenfalls die Allyl-pyrophosphat-Gruppierung vorkommt, ist Dimethyl-allyl-pyrophosphat ebenfalls äußerst empfindlich gegen Säure und liefert beim Versetzen mit starken Säuren außer anorganischer Pyrophosphorsäure ein Gemisch von Dimethylallyl-alkohol und Dimethyl-vinyl-carbinol⁵⁷⁾. Letzteres ist durch Allyl-Umlagerung entstanden. Hydrolysiert man dagegen die Ver-

⁵³⁾ K. Bloch, S. Chaykin, A. H. Phillips u. A. de Waard, J. biol. Chemistry 234, 2595 [1959].

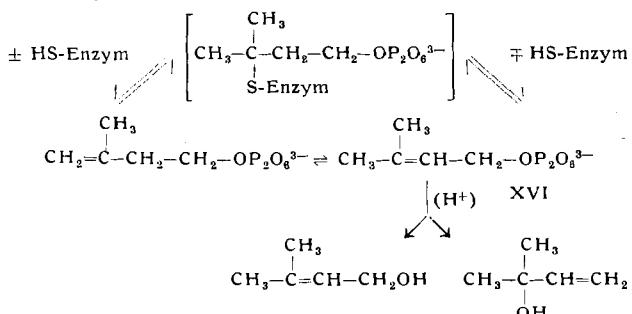
⁵⁴⁾ A. de Waard, A. H. Phillips u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 81, 2913 [1959].

⁵⁵⁾ U. Henning, E. M. Mösslein u. F. Lynen, Arch. Biochem. Biophys. 83, 259 [1959].

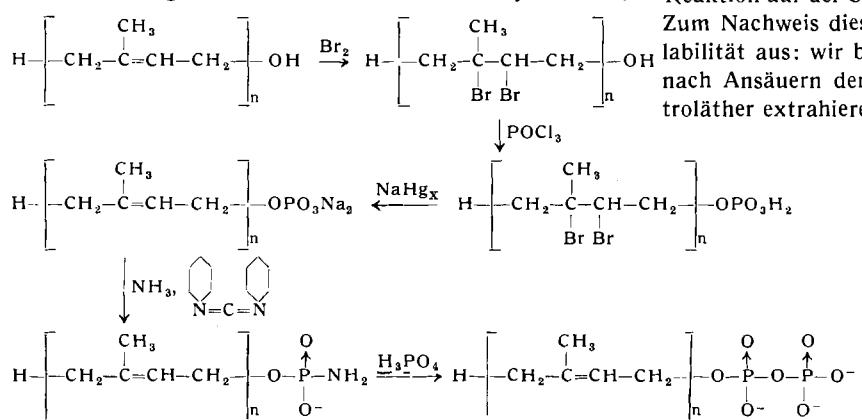
⁵⁶⁾ U. Henning, unveröffentl. Versuche.

⁵⁷⁾ B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning u. F. Lynen, J. Amer. chem. Soc. 81, 1254 [1959].

bindung mit Phosphatase, so tritt wie im Falle des Farnesyl-pyrophosphats nur der primäre Alkohol auf. Da die Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase durch SH-Gifte, wie Jodacetamid oder p-Chlormercuribenzoat, vollständig gehemmt wird⁵⁸⁾, vermuten wir, daß die Wirkungsgruppe des Enzyms eine Sulphydryl-Gruppe – möglicherweise in Form eines peptidartig gebundenen Cystein-Restes – enthält und die Isomerisierung über die Anlagerung des SH-Enzyms an die Doppelbindung zustandekommt⁵⁷⁾.



Daß diese Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase beim biologischen Aufbau der Polyterpene maßgeblich beteiligt ist, war naheliegend, weil – wie schon oben besprochen – die Squalen-Synthese aus 5-Phospho-mevalonsäure im Hefeextrakt auf der Stufe des Isopentenyl-pyrophosphats stecken bleibt, wenn man den Ansatz mit Jodacetamid vergiftet (vgl. Abb. 1). Um nun zu beweisen, daß die Unterbindung der Terpen-Synthese in diesem Versuch nur auf die Hemmung der Isomerase zurückzuführen ist, nahmen wir Experimente mit synthetischem Dimethylallyl-pyrophosphat in Angriff, das Eggerer^{52, 59)} nach Schema 7 dargestellt hat: 2,3-Dibrom-3-methyl-butanol,



Schema 7. Synthese von Dimethylallyl-, Geranyl- und Farnesylpyrophosphat
Für Dimethylallyl: n = 1, für Geranyl: n = 2, für Farnesyl: n = 3

gewonnen durch Addition von Brom an Dimethyl-allylalkohol, wurde mit POCl_3 in Triäthylamin zum entsprechenden Phosphorsäureester umgesetzt, der als Cyclohexyl-ammoniumsalz kristallisiert und durch Behandlung mit Natriumamalgam in wässriger Lösung in γ, γ -Dimethylallyl-phosphat übergeführt werden konnte. Umsetzung des Ammoniumsalzes mit Dicyclohexyl-carbodiimid und Ammoniak nach der Methode Khoranas lieferte Dimethylallyl-phosphorsäureamid, das bei der Behandlung mit Phosphorsäure in Pyridin in Dimethyl-allyl-pyrophosphat überging. Erwähnt sei, daß dieses Verfahren allgemein zur Darstellung der Allyl-pyrophosphate anwendbar ist. Mit derselben Methode konnte Eggerer^{52, 59)} auch Geranyl-pyrophosphat (n=2), Kirschner⁶⁰⁾ Farnesyl-pyrophosphat (n=3) synthetisieren.

⁵⁸⁾ B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning u. F. Lynen, J. biol. Chemistry 235, 326 [1960].

⁵⁹⁾ H. Eggerer, Chem. Ber., im Druck.

⁶⁰⁾ K. Kirschner, unveröffentl. Versuche.

Die Schwierigkeit bei der chemischen Synthese der Allyl-pyrophosphate beruht auf ihrer großen Empfindlichkeit gegen Säure, die sich darin äußert, daß z. B. Geranyl-pyrophosphat in n/10-HCl bei 25 °C bereits innerhalb 100 Sekunden zur Hälfte gespalten wird. Diese Schwierigkeit wird im Verfahren von Eggerer durch vorübergehende Absättigung der Doppelbindungen mit Brom überwunden. Bei der eleganten Synthese des Geranyl- oder Farnesyl-pyrophosphats, über die Cramer und Böhm⁶¹⁾ kürzlich berichteten, dient ein Imidophosphat, das aus Phosphorsäure und Trichlor-acetonitril entsteht, als Phosphorylierungsmittel für die Allylalkohole.

In Tabelle 2 bringen wir einen Beleg, daß der mit Jodacetamid vergiftete Hefeextrakt die Fähigkeit zur Squalen-Bildung aus 1^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat zurückgewinnt, wenn man dem üblichen Ansatz mit Mg^{2+} und

Hefeextrakt (0,3 mg Protein); Glucose-6-phosphat; TPN; m/200 Jodacetamid; 15 min bei 37 °C inkubiert

0,061 μM K_3^{14}C -Isopentenyl-pyrophosphat (2200 Imp/min) wurden inkubiert mit	Imp/min im Squalen
—	21
0,1 μM Dimethylallyl-PP	1100

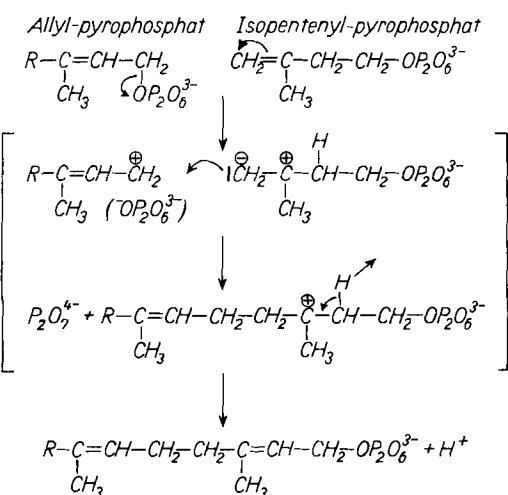
Tabelle 2. Einfluß von Dimethyl-allyl-pyrophosphat auf die Squalen-Synthese

TPNH synthetisches Dimethyl-allyl-pyrophosphat, d. h. das Produkt der durch Jodacetamid gehemmten Isomerasereaktion zusetzt. In Abwesenheit von TPNH und der Partikeln des Hefeextrakts, die nur für die reduktive Dimerisierung der Sesquiterpen-Einheit nötig sind, bleibt die Reaktion auf der Stufe von Farnesyl-pyrophosphat stehen. Zum Nachweis dieser Verbindung nützten wir ihre Säurelabilität aus: wir bestimmten die Radioaktivität, die sich nach Ansäuern der bebrütenen Reaktionsansätze mit Petroläther extrahieren ließ⁵²⁾. Bei Untersuchungen mit dem gereinigten Enzym ließ sich nachweisen, daß beim Aufbau von Farnesyl-pyrophosphat aus einer Molekel Dimethylallyl-pyrophosphat und zwei Molekülen Isopentenyl-pyrophosphat anorganische Pyrophosphorsäure freigesetzt wird und der Aufbau der Kohlenstoffkette stufenweise, über Geranyl-pyrophosphat als Zwischenglied erfolgt⁵²⁾.

Die dem Aufbau der Kohlenstoffkette der Terpene zugrundeliegende C–C-Verknüpfung ist somit eine C-Alkylierung, wobei das aus dem Allyl-Derivat gebildete Carbonium-Ion mit der reaktionsfähigen Doppelbindung des Isopentenyl-pyrophosphats reagiert und unter Abgabe eines Protons das homologe, um eine C_5 -Einheit verlängerte Allyl-pyrophosphat liefert. Dieses kann nun von neuem mit Isopentenyl-pyrophosphat umgesetzt werden usw., wie es das Schema 8 (s. S. 826) beschreibt.

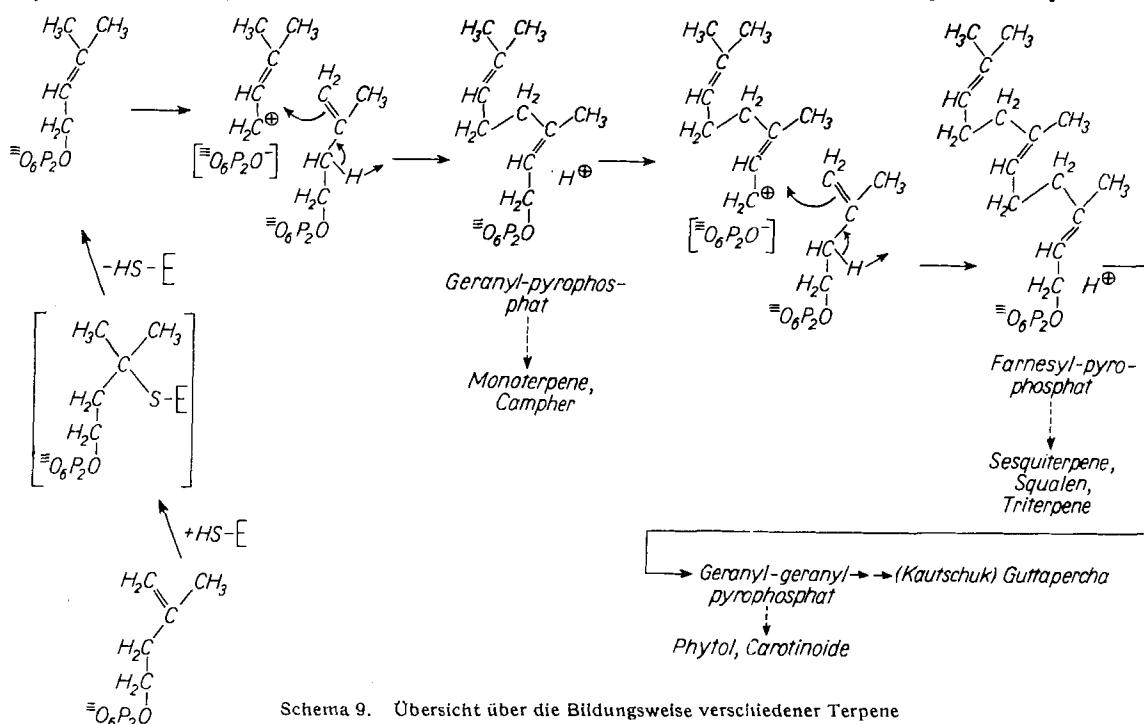
Die wichtige Rolle der Isomerase für die Terpen-Synthese wird damit klar ersichtlich. Sie stellt durch Isomerisierung des Isopentenyl-pyrophosphats das Allyl-Derivat zur Verfügung, mit dem der Aufbau der Terpen-Kohlenstoffketten aus den C_5 -Einheiten erst ausgelöst werden kann. Ist aber dieser Prozeß einmal in Gang gekommen, so läuft er ohne neuerliche Isomerisierung weiter. Durch sekundäre Umwandlungen, die bekannte Cyclisierungs-, Umlagerungs- und Oxydationsreaktionen umfassen, können auf der Stufe des Geranyl-pyrophosphats die verschiede-

⁶¹⁾ F. Cramer u. W. Böhm, Angew. Chem. 71, 775 [1959].



Schema 8. Reaktionsmechanismus des Kettenaufbaus

nen Monoterpene und der Campher entstehen, auf der Stufe des Farnesyl-pyrophosphats die natürlich vorkommenden Sesquiterpene, das Squalen und die cyclischen Triterpene sowie die Sterine, auf der Stufe des Geranylgeranyl-pyrophosphats schließlich die Diterpene, das Phytol und die Carotinoide. Im Falle der Kautschuksynthese läuft aber der Alkylierungsprozeß weiter bis zur Bildung hochpolymerer Produkte (Schema 9).



Schema 9. Übersicht über die Bildungsweise verschiedener Terpene

Versuche mit Hevea brasiliensis

Durch die großzügige Hilfe von Prof. Wurster und Dr. M. Fischer der Badischen Anilin- und Soda-fabrik, Ludwigshafen, kamen wir in den Besitz mehrerer Exemplare von *Hevea brasiliensis* und konnten damit die Kautschukbildung aus Isopentenyl-pyrophosphat sicherstellen. Dazu wurden Proben frisch gezapften Latex mit radioaktiv markierter Mevalonsäure oder mit radioaktiv markiertem Isopentenyl-pyrophosphat versetzt und 4 Stunden bei 26 °C inkubiert. Dann wurde der Kautschuk isoliert, mit Ozon zu Lävulinsäure (vgl. auch Schema 10 s. S. 827) oxydiert und nach Zusatz von authentischer Lävulinsäure als Träger und Überführung in das kristallisierte 2,4-Dinitrophenylhydrazon die Radioaktivität gemessen. Wie die Daten in

der Tabelle 3 zeigen, werden im Latex sowohl Mevalonsäure – was bekannt war³⁴⁾ – als auch Isopentenyl-pyrophosphat in Kautschuk umgewandelt, das „aktive Isopren“

	1	2
K-2- ¹⁴ C-Mevalonat	0,33 μM (2,5·10 ⁵ Imp/min)	–
K ₃ -1- ¹⁴ C-Isopentenyl-pyrophosphat	–	0,9 μM (1,6·10 ⁵ Imp/min)
Radioaktivität im Lävulinsäure-2,4-dinitrophenylhydrazon	1,525·10 ⁴ Imp/min	4,61·10 ⁴ Imp/min
Einbau	0,0206 μM = 6,15 %	0,234 μM = 26 %

Tabelle 3. Einbau von 2-¹⁴C-Mevalonsäure und 1-¹⁴C-Isopentenyl-PP in Kautschuk

Je 130 mg Latex wurden mit den Substraten (bei 1 dazu 2 μM ATP) und M/50 MgCl₂ 4 h bei 26 °C inkubiert.

jedoch nahezu 10-mal schneller. Dies beweist, daß die Geschwindigkeit des Einbaus von Mevalonsäure in Kautschuk durch ihre langsame Umwandlung in Isopentenyl-pyrophosphat begrenzt ist.

Im nächsten Versuch prüften wir die Frage, ob bei der Kautschuksynthese der Orthophosphorsäureester des Isopentenols an die Stelle des Pyrophosphorsäureesters treten kann. Wie Tabelle 4 darlegt, ist das jedoch nicht der

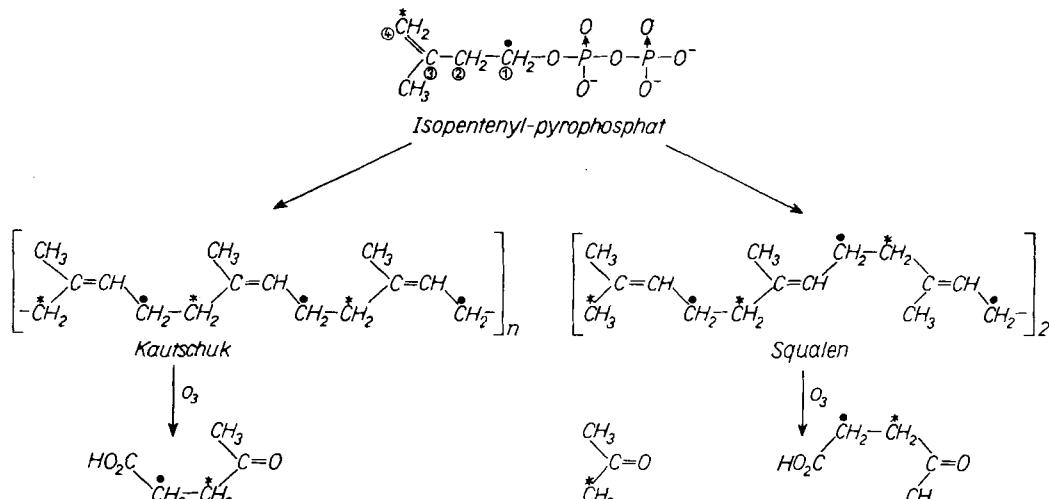
K ₂ -1- ¹⁴ C-Isopentenyl-phosphat	0,433 μM (1,6·10 ⁵ Imp/min)	0,433 μM (1,6·10 ⁵ Imp/min)
K ₃ -1- ¹⁴ C-Isopentenyl-pyrophosphat	–	0,9 μM (1,6·10 ⁵ Imp/min)
Radioaktivität im Lävulinsäure-2,4-dinitro-phenylhydrazon	0	2,96·10 ⁴ Imp/min
Einbau	0	0,166 μM = 18,5 %

Tabelle 4. 1-¹⁴C-Isopentenyl-phosphat und 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat als Substrate

Je 150 mg Latex wurden mit den Substraten und M/50 MgCl₂ 4 h bei 26 °C inkubiert.

Fall. Radioaktives Isopentenyl-phosphat wurde nicht inkorporiert. Sein Zusatz zum Versuch mit Isopentenyl-pyrophosphat hatte außerdem keinerlei Einfluß auf dessen Einbau.

Um etwas über das Molekulargewicht des synthetisierten Kautschuks zu erfahren, vor allem aber auch, um auszuschließen, daß die Radioaktivität der bei der Ozonisation erhaltenen Lävulinsäure auf Verunreinigung des isolierten Kautschuks durch niedermolekulare Terpene wie

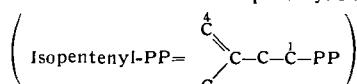


Schema 10. ^{14}C -Verteilung in den Ozonisationsprodukten des Kautschuks und Squalens

Squalen (C_{30}), Lycopersen (C_{40}) oder das erst vor kurzem aufgefundene Solanesol (C_{45}) zurückzuführen ist, haben wir das folgende Experiment ausgeführt. Wir benutzten als Substrat das in der Methylengruppe markierte $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat und isolierten nach der Ozonisation des Kautschuks neben Lävulinsäure auch das aus dem Isopropyliden-Ende der Terpenkohlenstoffkette stammende Aceton (Schema 10). Um hinreichende Mengen Aceton für die Radioaktivitätsmessung zu erhalten, setzten wir dem Kautschuk vor der Ozonbehandlung gewöhnliches Squalen als Träger zu. Es ergab sich (Tabelle 5), daß

$\text{K}_3\text{-1-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat	—	$0,9 \mu\text{M}$ ($1,6 \cdot 10^6 \text{ Imp/min}$)
$\text{K}_3\text{-4-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat	$0,227 \mu\text{M}$ ($1,7 \cdot 10^6 \text{ Imp/min}$)	—
Radioaktivität im Lävulinsäure-2,4-dinitro-phenylhydrazen	$1,36 \cdot 10^4 \text{ Imp/min}$	$1,3 \cdot 10^4 \text{ Imp/min}$
Radioaktivität im Aceton-2,4-dinitro-phenylhydrazen	0	0
Einbau	$0,018 \mu\text{M} = 8\%$	$0,073 \mu\text{M} = 8,15\%$

Tabelle 5. Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ - und $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-PP in Kautschuk



Je 180 mg Latex wurden mit den Substraten und $M/50 \text{ MgCl}_2$ 4 h bei 26°C inkubiert

die Lävulinsäure, wie in den vorhergehenden Versuchen, radioaktiven Kohlenstoff enthielt, während die Aceton-Fraktion frei von Radioaktivität war. Mit diesem Resultat stand es außer Zweifel, daß das Syntheseprodukt zwar zahlreiche, aus dem radioaktiven Isopentenyl-pyrophosphat stammende C_5 -Einheiten in der Kette, aber praktisch

nichts davon in der Endgruppe enthielt. Das Verhältnis von Endglied zu Kettenende war somit verschwindend klein, wie es für unverzweigte Makromoleküle charakteristisch ist.

Die Identität des enzymatisch gebildeten Produkts mit hochmolekularem Kautschuk konnte schließlich durch Messungen in der Ultrazentrifuge, die wir in Zusammenarbeit mit Dr. Elgert und Dr. Kuhschmierz im Laboratorium von Prof. Patat an der Technischen Hochschule, Mün-

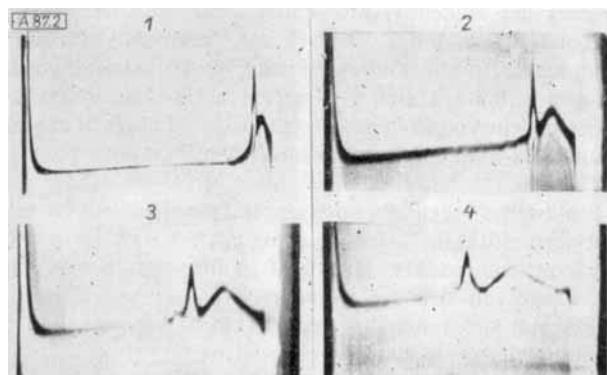


Abb. 2. Schnierendiagramme des in Cyclohexan löslichen Rohkautschuks in der Ultrazentrifuge
0,25 % Kautschuk in Cyclohexan, 187000 xg bei 25°C ; 1) 19 min;
2) 1 h 15 min; 3) 2 h 19 min; 4) 3 h 23 min
 $S_1 = 2,325 \pm 0,051$; $S_2 = 1,281 \pm 0,024$

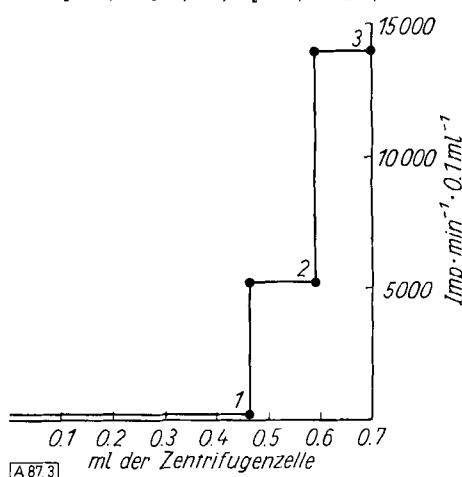


Abb. 3. Radioaktivitätsverteilung in der Sedimentationszelle
In der Zelle: 0,7 ml 0,25 % Kautschuk in Cyclohexan (Σ Radioaktivität = $2,4 \cdot 10^4 \text{ Imp/min}$)
Nach 8 h bei 187100 xg Entnahmen von 0,461 ml (1), 0,122 ml (2),
dann Spülung mit Cyclohexan (3)

chen, durchführten, endgültig bewiesen werden. Es stellte sich dabei heraus, daß das radioaktive, mit Cyclohexan extrahierbare Material der Enzymversuche bei 187000 g sedimentiert. Wie optisch zu sehen war, trennte sich das organische Material in zwei Hauptkomponenten auf (Abb. 2), von denen die schneller wandernde ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 1 Million besitzt. Nach etwa 8-stündigem Zentrifugieren waren beide Komponenten sedimentiert. Die zu diesem Zeitpunkt gefundene Radioaktivitätsverteilung in der Zentrifugenzelle ist in Abb. 3 wiedergegeben. Man erkennt, daß fast die gesamte Radioaktivität im Bodensatz enthalten war. Niedrigmolekulare radioaktive Verbindungen, die beim Ultrazentrifugieren im Lösungsmittel verteilt geblieben wären, waren praktisch nicht nachweisbar.

Ausblicke

Mit diesen Versuchen war die Verwertung von Isopentenyl-pyrophosphat zur Kautschuksynthese einwandfrei nachgewiesen, ein Vorgang, der sich durch die schon früher gezeigte Reaktionsfolge: Die wiederholte enzymatische Alkylierung von Isopentenyl-pyrophosphat durch ein Allyl-pyrophosphat unter Abspaltung von Pyrophosphorsäure und Bildung des homologen, um eine C₅-Einheit verlängerten Allyl-pyrophosphats beschreiben läßt (vgl. Schema 8). Der sterische Ablauf des Kettenaufbaus, d. h. ob die Verknüpfung der C₅-Einheiten in cis- oder trans-Stellung eintritt und Kautschuk oder Guttapercha entstehen, dürfte vom Auswahlvermögen der dabei beteiligten Enzymkatalysatoren festgelegt werden. Es hängt ja nur davon ab, welches der beiden H-Atome bei der Stabilisierung des Carbonium-Ions unter Bildung der neuen Allyl-Doppelbindung als Proton eliminiert wird. Um genauere Aussagen machen zu können, sind größere Versuchsreihen, insbesondere auch ein Vergleich der enzymatischen Fähigkeiten von Kautschuk- und Guttapercha-bildenden Pflanzen erforderlich.

Ein zweites, ebenfalls noch ungeklärtes Problem ist die Enzymspezifität im Zusammenhang mit der Kettenlänge des Syntheseprodukts. Hier geht es im wesentlichen um die Frage, ob bei der Synthese der Kautschuk-Makromolekel aus einem Dimethylallyl-pyrophosphat und vielen Isopentenyl-pyrophosphaten nur ein ganz unspezifisches Enzym oder aber nacheinander mehrere relativ spezifische Enzyme in Aktion treten. In einigen orientierenden Versuchen haben wir den Eindruck gewonnen, daß letzteres zutrifft und der von uns gefundene Einbau der Isopentenyl-Reste hauptsächlich auf die Verlängerung von im Latex vorgebildeten, quasi als „Polymerisationskeime“ dienenden Zwischenstufen der Kautschuksynthese, zurückzuführen ist. Diese „Keime“, die noch die reaktive Allyl-pyrophosphat-Struktur besitzen, könnten wiederholt mit dem radioaktiven Isopentenyl-pyrophosphat reagieren.

Abb. 4 gibt z. B. den zeitlichen Verlauf des Einbaus von radioaktivem Isopentenyl-pyrophosphat in die mit Cyclohexan extrahierbare Kohlenwasserstoff-Fraktion wieder. Die Kinetik des Einbaus läßt zwei Phasen erkennen, die sich sehr deutlich voneinander unterscheiden. Wie wir fanden, läßt sich

die erste rasche Reaktion zwar durch Jodacetamid unterbinden, durch Zusatz von Dimethylallyl-pyrophosphat aber nicht wieder restituieren, wie es der Fall sein müßte, wenn es sich bei diesen schnellen Reaktionen um die Anfangsstufen der Kautschuksynthese: die Bildung von C₁₀, C₁₅, C₂₀ usw. handeln würde. Vorerhand läßt sich über

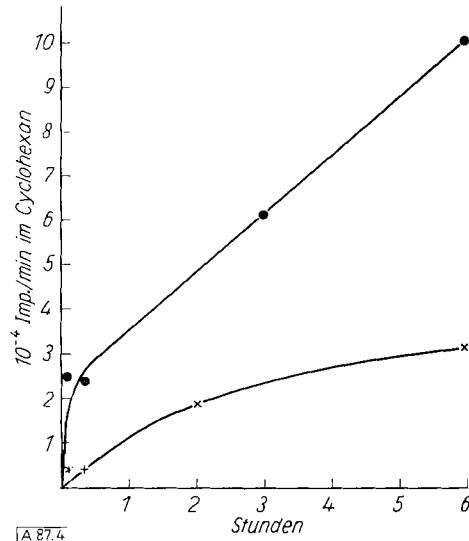
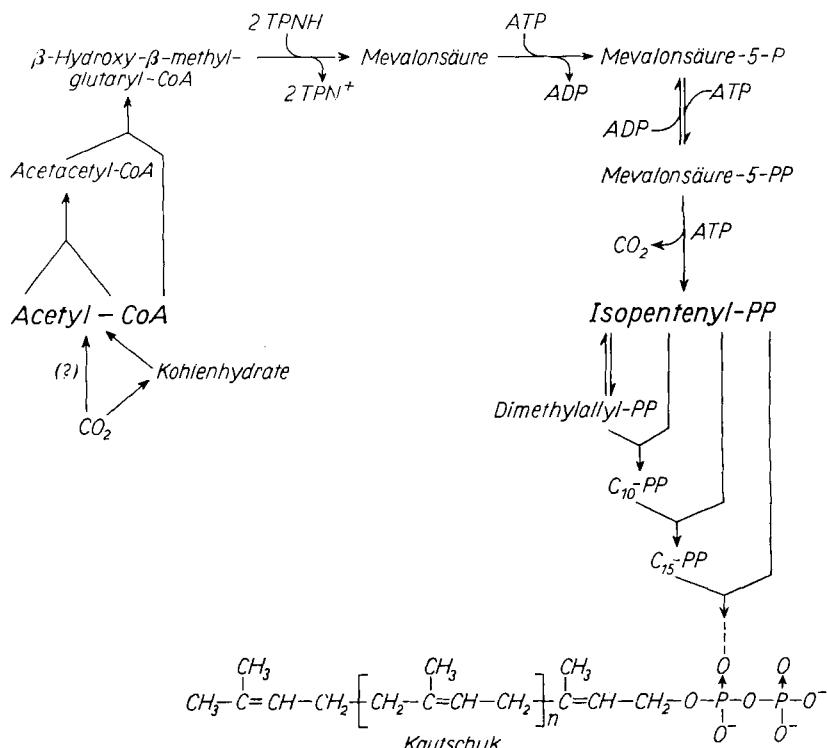


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf des Einbaus von 1-¹⁴C-Isopentenyl-pyrophosphat in Kautschuk
Je Ansatz: 0,9 μM 1-¹⁴C-Isopentenyl-PP (1,6·10⁶ Imp/min); 6 μM K₂-Mg-Trilonat, 1 μM MgCl₂, 180 mg Latex; bei x dazu je 2 μM Jodacetamid. Temp. = 26°C

die chemischen Vorgänge, die dem Einbau der Radioaktivität in beiden Phasen zugrundeliegen, noch nichts sagen. Hier können nur Versuche auf sehr breiter Basis weiterführen, auf die wir aus Mangel an den dazu notwendigen größeren Mengen von frischem Latex leider verzichten mußten. Es ist jedoch zu erwarten, daß die Fortsetzung dieser Versuche zu Resultaten führt, die möglicherweise auch industriell bedeutsam sind, ganz abgesehen von dem Erkenntnisgewinn hinsichtlich des biologischen Vorgangs.



Schema 11. Der Weg der biologischen Kautschuksynthese

Aber auch wenn wir über die biologische Kautschuksynthese bis in die letzten Einzelheiten heute noch nicht unterrichtet sind, so können wir doch dieses Problem prinzipiell als gelöst betrachten. Die Reaktionsfolge dieser Synthese, wie wir sie kennen gelernt haben und wie sie im Schema 11 noch einmal zu sehen ist, läßt uns verstehen, warum der natürliche Kautschuk nur aus unverzweigten Polyisoprenketten besteht. Der biologische Alkylierungsmechanismus des Isopentenyl-pyrophosphats läßt im Ge-

gensatz zur technisch verwerteten Polymerisation des Isoprens nur die C-1/C-4-Verknüpfung der Isopren-Einheiten zu. Außerdem dürfen wir nach diesem Schema erwarten, daß sich in den Molekülen des nativen Kautschuks als Endgruppe ein Pyrophosphat-Rest befindet. Wenn man vorsichtig arbeitet und ein saures Medium bei der Aufarbeitung vermeidet, sollte er sich unseres Erachtens nachweisen lassen.

Eingegangen am 5. September 1960 [A 87]

Metallorganische Synthese höherer aliphatischer Verbindungen aus niedrigen Olefinen in Praxis und Theorie

Von Prof. Dr. KARL ZIEGLER

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim-Ruhr

Die einstufige katalytische Polymerisation von Äthylen durch kleine Mengen von Aluminiumalkylen und die zweistufige Form, bei der der sogen. „Aufbau“ und die sogen. „Verdrängung“ sich getrennt abspielen, führen zu Produkten mit ganz unterschiedlichen Verteilungsfunktionen der verschiedenen Molekulargrößen. Das einstufige Verfahren ist nur beschränkt brauchbar. Die sogen. Aufbaureaktion läßt sich durch eine geeignete Versuchsausführung etwa um den Faktor 10 beschleunigen. Es werden verschiedene Varianten der Aufarbeitung der Reaktionsprodukte beschrieben. Die Verdrängung ist jetzt ohne zusätzlichen Nickel-Katalysator bei Verweilzeiten von 0,5 bis 2 sec bei etwa 300 °C optimal möglich. Alle durch den Nickel-Gehalt der Reaktionsprodukte verursachten Schwierigkeiten sind damit behoben. Kombinationen der neuen Formen von Aufbau und Verdrängung lassen eine statistische Reaktionsführung möglich erscheinen, die bis zu über 90% der Olefine $C_{12}-C_{18}$ liefern muß. Auch das Problem der glatten Synthese von 2-Methylbuten aus Äthylen und Propylen ist jetzt gelöst. Boralkyle in Kombination mit neuen Verdrängungsverfahren gestatten die Herstellung von Olefinen mit thermodynamisch wenig begünstigter Stellung der Doppelbindung. Über Austauschreaktionen mit Magnesiumalkylen sind auch Carbonsäuren aus Boralkylen glatt zugänglich.

Der Verfasser hat es in der jüngsten Vergangenheit wiederholt erlebt, daß Arbeiten seines Instituts, obwohl unter rein wissenschaftlicher Zielsetzung begonnen, sich rasch industriell ausgewirkt haben. Ein Bericht über diese Zusammenhänge wäre ein reizvolles Thema für ein Präsent zu einem runden Geburtstag einer Persönlichkeit, die als ebenso aufgeschlossen und interessiert für die Wissenschaft wie als erfolgreich in der Leitung eines großen chemischen Werkes bekannt ist. Leider kann der Verfasser dieses Thema in der breitest möglichen Form diesem Aufsatz nicht zu grundelegen, weil er es vor nicht langer Zeit schon abgehendelt hat¹⁻³). Er hat aber noch eine Art Nachlese frei auf dem Teilgebiet der metallorganischen Synthese höherer aliphatischer Verbindungen aus niedrigen Olefinen. Auch dieses Thema ist nicht neu⁴⁻⁶), doch ist die Entwicklung rasch über schon Bekanntes hinweggegangen.

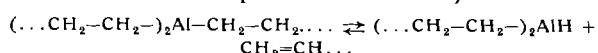
Geradkettige α -Olefine aus Äthylen, Einstufenverfahren

Ein leicht zu überschauender Vorgang der angedeuteten Art ist bekanntlich die Bildung höherer geradkettiger (α)-Olefine aus Äthylen⁶). Sie hat eine einstufige rein katalytische und eine zweistufige — im Endresultat gleichfalls katalytische — Variante. Beide gehen auf die folgenden, für Aluminiumtrialkyle charakteristischen Reaktionen zurück:

- ¹⁾ K. Ziegler, Compte rendu du XXXIe Congrès International de Chimie Industrielle, Liège 1958.
- ²⁾ K. Ziegler, Erdöl u. Kohle 11, 766 [1958].
- ³⁾ K. Ziegler, Brennstoff-Chem. 40, 209 [1959].
- ⁴⁾ K. Ziegler, H.-G. Gellert, K. Zosel, E. Holzkamp, J. Schneider, M. Söll u. W.-R. Kroll, Liebigs Ann. Chem. 629, 121 [1960].
- ⁵⁾ K. Ziegler u. W.-R. Kroll, ebenda 629, 167 [1960].
- ⁶⁾ K. Ziegler, H.-G. Gellert, E. Holzkamp, G. Wilke, E. Duck u. W.-R. Kroll, ebenda 629, 172 [1960].

1. Aluminiumtrialkyle addieren sich an Äthylen (und andere geeignete Olefine)^{7-9,4}). Tun sie es wiederholt, so führt dies zu einer Kettenverlängerung, für die die Bezeichnungen Aufbau- oder Wachstumsreaktion gebräuchlich geworden sind.

2. Aluminiumtrialkyle können sich in Olefine und Di-alkylaluminiumhydride spalten und umgekehrt auch wieder aus diesen beiden Komponenten bilden^{10,11}:



Bei der schon 1952^{7,8}) im Prinzip beschriebenen einstufigen, rein katalytischen Polymerisation wird Äthylen mit wenig Aluminiumtriäthyl erhitzt. Dabei spielen sich rasch nacheinander die folgenden Vorgänge ab:

- (a) $C_2H_5-al + (n-1) C_2H_4 \rightarrow C_2H_5-(C_2H_4)_{n-1}al$
 - (b) $C_2H_5-(C_2H_4)_{n-1}al \rightarrow alH + C_2H_5-(C_2H_4)_{n-2}CH:CH_2$
 - (c) $alH + C_2H_4 \rightarrow C_2H_5-al$
 - (d) $n C_2H_4 \rightarrow (C_2H_4)_n$
- („alH“ = $\nearrow AlH$ in R_2AlH)

Die einzelnen Schritte des Aufbaus (a) verlaufen gleich schnell. Die Bruttoreaktion von (b) + (c), allgemein formuliert

$Aluminumalkyl^I + Olefin^{II} \rightleftharpoons Aluminumalkyl^{III} + Olefin^I$, heißt „Verdrängung“. (c) ist stets viel schneller als (b), dieses also geschwindigkeitsbestimmend¹²). Bei Gegenwart

- ⁷⁾ K. Ziegler, Angew. Chem. 64, 323 [1952].
- ⁸⁾ K. Ziegler, Brennstoff-Chem. 33, 193 [1952] (Chem. Zbl. 1953, 1745).
- ⁹⁾ K. Ziegler, Angew. Chem. 68, 721 [1956].
- ¹⁰⁾ K. Ziegler, H.-G. Gellert, H. Martin, K. Nagel u. J. Schneider, Liebigs Ann. Chem. 589, 91 [1954].
- ¹¹⁾ K. Ziegler, W.-R. Kroll, W. Larbig u. O. W. Steudel, ebenda 629, 53 [1960].
- ¹²⁾ Vgl.¹¹⁾, S. 67 ff.