

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

73. Jahrgang · Nr. 15 · Seite 513–552 · 7. August 1961

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT „DIE CHEMIE“

Die biochemischen Grundlagen der „Polyacetat-Regel“

Von Prof. Dr. F. LYNEN und MARIKO TADA

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

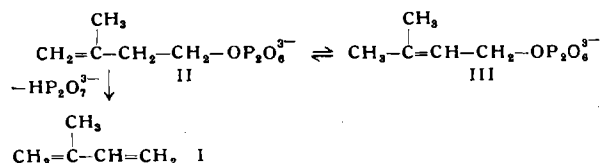
Nach einem Plenarvortrag auf der GDCh-Festsitzung am 14. Juni 1961 in Frankfurt/M.

Natürlich vorkommende organische Substanzen sind vielfach nach gewissen Regeln, Gesetzmäßigkeiten, gebaut. Solche Bauregeln sind nicht nur zur Konstitutionsaufklärung neuer Naturstoffe nützlich, sondern können, wie hier gezeigt wird, auch bei der Erforschung biochemischer Umsetzungen als Leitfaden dienen. Ausgehend von der „Polyacetat-Regel“ wird die Bildung von Fettsäuren und aromatischen Ringen unter Beteiligung von Malonyl-CoA und spezifischen, näher charakterisierten Enzym-Komplexen diskutiert.

Einleitung

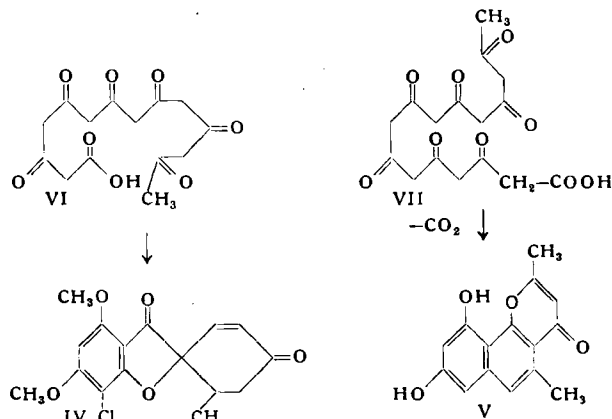
Der Vergleich natürlich vorkommender Kohlenstoff-Verbindungen ergab gemeinsame strukturelle Züge in verschiedenen Molekeln derselben Naturstoffgruppe und führte zu allgemeinen Schlüssen über den Aufbau organischer Verbindungen in der Natur. Solche Erkenntnisse, in gewissen „Regeln“ gefaßt, haben sich bei der Konstitutionsermittlung neuer Naturstoffe vielfach als sehr hilfreich erwiesen. Auch der Biochemiker, dem die Aufklärung der Vorgänge im lebenden Organismus obliegt, kann aus solchen Regeln großen Nutzen ziehen. Zwar können sie ihm die Erforschung der enzymatischen Grundlagen biologischer Prozesse, die zur Einsicht in ihre chemischen Details unumgänglich sind, nicht abnehmen. Aber sie decken nahe Beziehungen zwischen den Naturstoffen auf, und weisen die Richtung, in die das biochemische Experiment vorteilhaft einzusetzen ist.

Eine solche Regel ist die „Isopren-Regel“, die zuerst beim Studium der chemischen Struktur der ätherischen Öle beobachtet wurde¹⁾, deren allgemeine Bedeutung aber erst Ruzicka²⁾ bei seinen Arbeiten über Sesqui- und Polyterpene klar erkannte. Der strukturelle Grundplan dieser sehr umfangreichen Naturstoffklasse, der sich auf Kohlenstoffskelette aus mehreren miteinander verknüpften Isopren-Resten (I) zurückführen läßt, ist durch die biochemische Forschung der letzten Zeit verständlich geworden. Es hat sich herausgestellt, daß beim Aufbau der Verbindungen, die unter die Isopren-Regel fallen, das verkappte Isopren Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphorsäure (II) oder ihr Isomerisierungsprodukt Dimethylallyl-pyrophosphorsäure (III) als Bausteine dienen^{3–6)}.



Aromatische Strukturen

Ein anderes, nicht minder verbreitetes Bauelement unter den Naturstoffen ließen Untersuchungen an natürlich vorkommenden Fettsäuren und Phenolen erkennen. Die Hypothese, daß in der Natur gewisse, durch Kondensation mehrerer Essigsäuremolekeln „Kopf an Schwanz“ gebildete Polyketomethylen-Verbindungen bzw. Polyessigsäuren unter Wasserabspaltung in aromatische Phenole übergehen, ist bereits 1907 von Collie⁷⁾ vorgeschlagen worden. Der Hypothese wurde aber keine Bedeutung beigemessen bis Robinson⁸⁾ sie in neuerer Zeit wieder aufgriff und insbesondere Birch^{9, 10)} ihr durch die Betrachtung der Strukturen vieler natürlich vorkommender Phenole,



Pyrone, Chinone, Flavone und anderer aromatischer Substanzen neuen Inhalt gab. Die Formeln von Griseofulvin (IV) und Eleutherinol (V) seien als Beispiele angeführt. Ihre Bildung ist durch interne Kondensation der entsprechenden Polyketosäuren (VI) und (VII) besonders klar ersichtlich. Der Gültigkeitsbereich der „Polyacetat-Regel“ wurde dann von Woodward¹¹⁾ auch auf die Struktur der Tetracycline und Makrolide ausgedehnt, sowie von

¹⁾ Z. B. O. Wallach, Liebigs Ann. Chem. 227, 277 [1885].

²⁾ L. Ruzicka, Angew. Chem. 51, 5 [1938]; Experientia 9, 357 [1953].

³⁾ S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen u. K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 998 [1958].

⁴⁾ F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 [1958].

⁵⁾ F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning u. E. M. Mödslein, Angew. Chem. 71, 657 [1959].

⁶⁾ F. Lynen u. U. Henning, Angew. Chem. 72, 820 [1960].

⁷⁾ J. N. Collie, Proc. chem. Soc. [London] 23, 230 [1907]; J. chem. Soc. [London] 91, 1806 [1907].

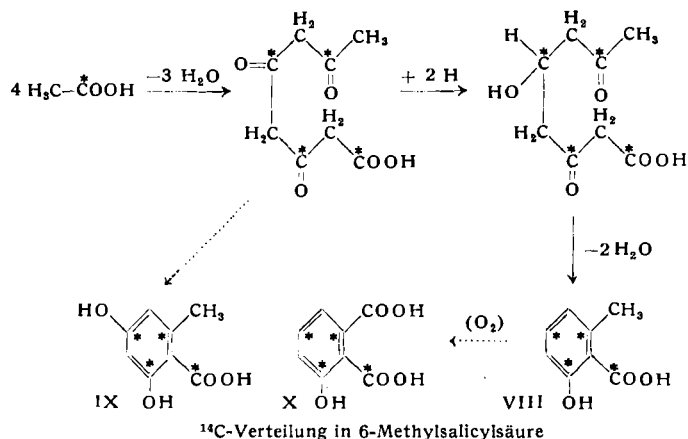
⁸⁾ R. Robinson: The structural relations of natural products; The Clarendon Press, Oxford 1955.

⁹⁾ A. J. Birch u. F. W. Donovan, Austral. J. Chem. 6, 360 [1953].

¹⁰⁾ A. J. Birch, in L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Springer Verlag Wien 1957, Bd. 14, S. 186.

¹¹⁾ R. B. Woodward, Angew. Chem. 68, 13 [1956]; 69, 50 [1957].

Bohlmann und Mannhardt¹²⁾ auf die natürlich vorkommenden Acetylen-Verbindungen. Dabei ließ die erfolgreiche Anwendung der Polyessigsäure-Theorie auf strukturelle Probleme^{10,11)} wenig Zweifel übrig, daß hier wiederum ein allgemeingültiges biogenetisches Prinzip von großer Nützlichkeit vorliegt. Den ersten Experimentalmittelbeweis für die Bildungsweise aromatischer Ringstrukturen durch direkte Kondensation mehrerer Acetat-Reste konnten Birch et al.¹³⁾ beim Studium der Biosynthese von 6-Methylsalicylsäure (VIII) durch *Penicillium Griseofulvum* erbringen. Nach Züchtung des Schimmelpilzes in einer Nährlösung, die 1-¹⁴C-Essigsäure enthielt, befand sich radioaktiver Kohlenstoff in der 6-Methylsalicylsäure, und zwar so auf die Molekel verteilt, wie dies beim Aufbau der Phenolcarbonsäure durch Verknüpfung von vier Essigsäure-Resten zu erwarten war.



In der Folgezeit konnte auch die Verwertung von radioaktivem Acetat für die Biosynthese der mit 6-Methylsalicylsäure verwandten Verbindungen Orsellinsäure (IX)¹⁴⁾ und 3-Hydroxyphthalsäure (X)¹⁵⁾, bei identischer Isotopenverteilung, nachgewiesen werden, sowie für die Biosynthese des Griseofulvins¹⁶⁾, des Cyanidins¹⁷⁾, Rutins¹⁸⁾ und Quercetins¹⁹⁻²¹⁾, des Oxytetracyclins^{21a)}, des Alternariols²²⁾ und der von *Penicillium islandicum* gebildeten Anthrachinone²³⁾.

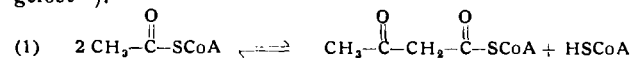
Zur Fettsäure-Synthese

Die Vermutung Robinsons⁸⁾, bei der Bildung gewisser aromatischer Strukturen handele es sich um eine Variante der Fettsäuresynthese, fand mit diesen Markierungsversuchen eine sichere Stütze. Denn es war seit den klassischen Versuchen Schoenheimers²⁴⁾, Sonderhoffs²⁵⁾ sowie Ritten-

bergs und Blochs²⁶⁾ erwiesen, daß die Fettsäuren im Organismus durch wiederholte Verknüpfungen von Acetat-Resten synthetisiert werden. Beim Aufbau einer langkettigen Fettsäure, wie Palmitin- oder Stearinsäure bleibt die Carboxyl-Gruppe des endständigen Essigsäure-Rests erhalten, während die bei der Verknüpfung der übrigen Essigsäure-Reste gebildeten Keto-Gruppen vollständiger Reduktion anheimfallen. Man konnte daher vermuten, daß bei der Fettsäure-Synthese die reduktiven Prozesse, welche zur Bildung der gesättigten geradkettigen Säuren erforderlich sind, vor Addition jeder nachfolgenden C₂-Einheit ablaufen, während beim Aufbau z. B. der aromatischen Systeme oder der Makrolide die Kettenverlängerung durch die nächste C₂-Einheit eintreten kann bevor die reduktiven Prozesse vollendet sind. Auf diese Weise käme es zur Bildung von langkettigen Polyketo- oder Polyhydroxysäuren, die dann eventuell intramolekulare Kondensationen eingehen können. Bevor diese Annahme als gesichert gelten konnte, war noch die andere Möglichkeit auszuschließen, daß die β-Polyketo-Strukturen über die gesättigten Fettsäuren durch nachfolgende mehrfache Oxydation jeweils in β-Positionen entstehen. Dies gelang in den wichtigen Untersuchungen des Arbeitskreises um Ehrens-värd²³⁾.

Gatenbeck und Mosbach²⁷⁾ kultivierten *Chaetomium cochliodes* auf einem Nährboden, der durch ¹⁴C und ¹⁸O doppelt markierte Essigsäure CH₃-¹⁴C¹⁸OOH enthielt, und analysierten die Verteilung der beiden Isotopen in der vom Pilz produzierten Orsellinsäure (IX). Wie sich ergab, stammten die O-Atome der Carboxyl-Gruppe und der phenolischen Hydroxyl-Gruppen der Orsellinsäure aus der Carboxyl-Gruppe des dargereichten Acetats, was mit der Anschauung der successiven β-Oxydation einer C₈-Fettsäure unvereinbar war, aber für die direkte Kondensation von vier Acetat-Resten zum C₈-Gerüst der Orsellinsäure eine sichere Stütze abgab. Da sich gleichartige Befunde auch beim Studium der Synthese des Anthrachinons Islandicin aus ¹⁸O-Acetat ergaben²⁸⁾, dürfte man wohl verallgemeinernd annehmen, daß die β-Polyketo-Strukturen auch in den übrigen Fällen durch Kondensation gebildet werden.

Mit der Entdeckung der Thioester-Bindung in der metabolisch aktiven Form der Essigsäure, dem Acetyl-CoA²⁹⁾ und dem Nachweis des Enzyms Thiolase^{30,30)}, das die Kondensation von zwei Molekeln Acetyl-CoA zu Acetylacetyl-CoA katalysiert (Gleichung 1), hielt man das enzymatische Problem der Polyacetat-Synthese für prinzipiell gelöst³¹⁾.



Es schien, daß durch mehrfache Wiederholung der Kondensation mit Acetyl-CoA β-Polyketo-Strukturen aufgebaut werden könnten. Ein schwerwiegender Einwand gegen diese Vorstellung ergab sich jedoch aus der Tatsache, daß das Gleichgewicht der reversiblen Thiolase-Reaktion ganz auf der Seite des Acetyl-CoA, d. h. in Richtung der thiolischen Spaltung der β-Ketosäure liegt.

Aus der gemessenen Gleichgewichtskonstanten³¹⁾

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{Acetylacetyl-CoA}] \times [\text{CoA}]}{[\text{Acetyl-CoA}]^2} = 1,6 \cdot 10^{-5}$$

und unter der absichtlich günstig gewählten Annahme, daß die physiologische Konzentration des Acetyl-CoA und des freien Coenzym A M/100 betrüge, berechnet sich, daß im Gleichgewicht nur 1,6 · 10⁻⁷ Mole Acetylacetyl-CoA/l vorhanden sein können. Die

²⁸⁾ D. Rittenberg u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 160, 417 [1945].

²⁷⁾ S. Gatenbeck u. K. Mosbach, Acta chem. scand. 13, 1561 [1959].

²⁶⁾ F. Lynen, E. Reichert u. L. Rueff, Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].

²⁵⁾ F. Lynen u. S. Ochoa, Biochim. Biophys. Acta 12, 299 [1953].

²⁴⁾ D. S. Goldman, J. biol. Chemistry 208, 345 [1954].

²³⁾ Vgl. F. Lynen u. K. Decker, Erg. Physiologie 49, 327 [1957].

¹²⁾ F. Bohlmann u. H. J. Mannhardt, in L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Springer Verlag Wien 1957, Bd. 14, S. 1.

¹³⁾ A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp u. C. J. Moye, Austral. J. Chem. 8, 539 [1955].

¹⁴⁾ K. Mosbach, Acta chem. scand. 14, 457 [1960].

¹⁵⁾ S. Gatenbeck, Acta chem. scand. 12, 1985 [1958].

¹⁶⁾ A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp, R. W. Rickards u. H. Smith, J. chem. Soc. [London] 1958, 360.

¹⁷⁾ H. Grisebach, Z. Naturforsch. 12b, 227, 597 [1957].

¹⁸⁾ S. Shibata u. M. Yamazaki, Chem. Pharm. Bull. Japan 6, 42 [1958].

¹⁹⁾ J. E. Watkin, E. W. Underhill u. A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 218 [1957].

²⁰⁾ T. A. Geissman u. T. Swain, Chem. and Ind. 1957, 984.

²¹⁾ A. J. Birch, in Hauptvorträge des XVII. Internationalen Kongreß für Reine und Angewandte Chemie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1960, Bd. 2, S. 73.

^{21a)} J. F. Snell, A. J. Birch u. P. L. Thomson, J. Amer. chem. Soc. 82, 2402 [1960].

²²⁾ R. Thomas, Proc. chem. Soc. [London] 1959, 88; Biochem. J. 78, 748 [1961].

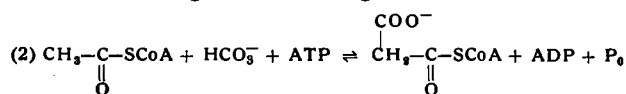
²³⁾ G. Ehrens-värd u. S. Gatenbeck in Hauptvorträge des XVII. Internationalen Kongreß für Reine und Angewandte Chemie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1960, Bd. 2, S. 99.

²⁴⁾ R. Schoenheimer: The dynamic state of body constituents; Harvard University Press, Cambridge 1942.

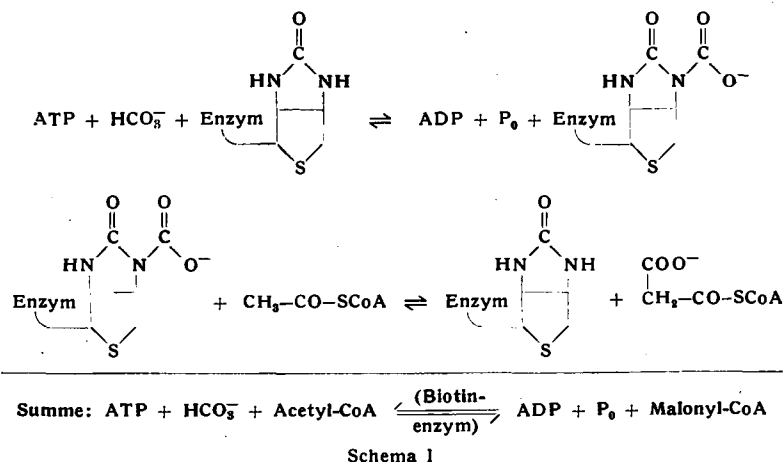
²⁵⁾ R. Sonderhoff u. H. Thomas, Liebigs Ann. Chem. 530, 195 [1937].

Konzentration an 3,5-Diketo-capronyl-CoA, der aus Acetyl-CoA und Acetyl-CoA eventuell durch nochmalige Kondensation gebildeten Verbindung würde dann bei $2,6 \cdot 10^{-12}$ Mole/l liegen, woraus klar ersichtlich ist, daß im biologischen Milieu schon die Synthese einer β -Diketosaure aus Acetyl-CoA aus thermodynamischen Gründen praktisch unmöglich ist. Tatsächlich wissen wir heute auch, daß der Aufbau von Kohlenstoffketten in der Zelle unter Vermittlung von Thiolase nur dann zustande kommt, wenn enzymatische Folgereaktionen das gebildete Acetyl-CoA abfangen. Dies geschieht beispielsweise auf dem Weg der Terpen-Synthese durch die praktisch irreversible Kondensation mit Acetyl-CoA zu β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA^{32,33}) oder in dem von *Seubert, Greull und Lynen*³⁴) beschriebenen System der Fettsäure-Synthese durch die beiden Reduktionsschritte, mit denen die β -Ketosaure in die gesättigte Säure umgewandelt wird. Eine solche „Abfangreaktion“ bietet sich aber bei der Bildung der Polyessigsäuren nicht an.

Der richtige Weg für die Bildung der Polyketo-Strukturen konnte erst gesehen werden, als beim Studium der Fettsäuresynthese aus Acetyl-CoA in Extrakten aus Taubenleber oder Hefezellen Malonyl-CoA als Zwischenprodukt gefunden worden war³⁵⁻³⁷), das aus Acetyl-CoA, Bicarbonat und ATP gemäß Gleichung 2 entstehen kann.

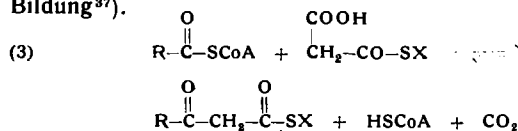


Die Bildung des Malonyl-CoA durch Carboxylierung von Acetyl-CoA ist unter die Carboxylierungsvorgänge einzureihen, bei denen Biotin als Enzymwirkungsgruppe beteiligt ist. *Wakil et al.*³⁸) wiesen in gereinigten Präparaten der Acetyl-Carboxylase beträchtliche Mengen Biotin nach und stellten die Beteiligung des Vitamins am katalytischen Prozeß durch die spezifische Enzymhemmung mit Avidin sicher. Es ist daher anzunehmen, daß die Carboxylierung von Acetyl-CoA grundsätzlich in gleicher Weise zustandekommt wie die in unserem Laboratorium³⁹) aufgeklärte Carboxylierung von β -Methyl-crotonyl-CoA und über eine „aktivierte Kohlensäure“ in Form des in der Reaktionsfolge symbolisch wiedergegebenen N-Carboxybiotinenzyms verläuft (Schema 1).

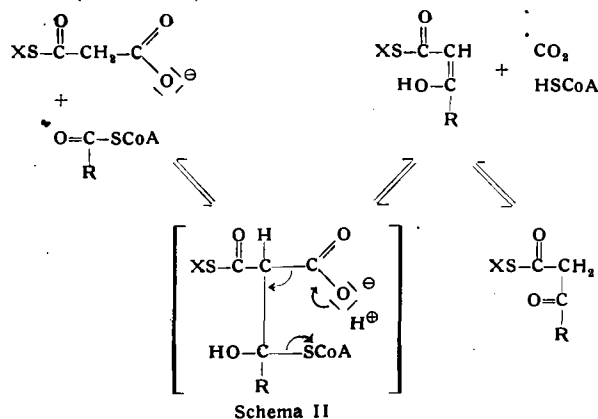


Durch die Einbeziehung von Malonyl-CoA an Stelle von Acetyl-CoA in die Kondensation, die zum Aufbau der Kohlenstoff-Kette führt, werden die Gleichgewichtsverhältnisse grundlegend verändert. Denn nun treibt die mit dem

Kondensationsschritt verknüpfte Decarboxylierung (Gleichung 3) die Reaktion nach der Seite der β -Ketosaure-Bildung³⁷).



Es handelt sich dabei um die Acylierung eines Malonesters (vgl. Reaktionsschema). Die nucleophile Methylene-Gruppe des Malonsäure-Derivats addiert sich an das elektrophile Carbonyl-C-Atom⁴⁰) des Thioesters unter Bildung eines Zwischenprodukts, das unter Abspaltung des Mercaptans und Decarboxylierung in den β -Ketosaure-thioester übergeht. Dabei muß primär ein Enol entstehen, das dann zur tautomeren Keto-Verbindung umgelagert werden kann (Schema II).



Der Multienzym-Komplex

Aus solchen Erwägungen hatte der eine von uns die intermediäre Bildung von Malonyl-CoA postuliert³⁷), als die Unentbehrlichkeit der Kohlensäure für die Umwandlung des Acetyl-CoA in Fettsäuren bei Untersuchungen an rohen Hefe⁴¹) und an gereinigten Taubenleberextrakten⁴²) sowie die Mitwirkung des Biotins³⁸) entdeckt worden waren. Daß bei der Fettsäure-Synthese aus Malonyl-CoA die Decarboxylierung den Kondensationsprozeß tatsächlich begleitet (vgl. dagegen⁴³)), konnten *Lynen, Kessel und Eggerer*⁴⁴) durch Versuche am gereinigten Enzymsystem der Hefe nachweisen: Die inzwischen noch weitergetriebene Reinigung des Enzyms führte zu Präparaten, die etwa 200-fach aktiver waren als rohe Extrakte, die beim Zertrümmern von Hefezellen im mechanischen Zellhomogenisator⁴⁵) erhalten wurden. Es stellte sich heraus, daß in diesen hochgereinigten Präparaten ein Enzymkomplex vorlag, der zwar sechs verschiedene Enzymwirkungen besaß, der sich aber in der analytischen Ultrazentrifuge und

³²) H. Rudney u. J. J. Ferguson Jr., J. biol. Chemistry 234, 1076 [1959].

³³) F. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 [1958].

³⁴) W. Seubert, G. Greull u. F. Lynen, Angew. Chem. 69, 359 [1957].

³⁵) R. O. Brady, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44, 993 [1958].

³⁶) S. J. Wakil, J. Amer. chem. Soc. 80, 6465 [1958].

³⁷) F. Lynen, J. Cell. Comp. Physiol. 54, Sup. 1, 33 [1959].

³⁸) S. J. Wakil, E. B. Titchener u. D. M. Gibson, Biochim. Biophys. Acta 29, 225 [1958].

³⁹) F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting u. E. Ringelmann, Angew. Chem. 71, 481 [1959].

⁴⁰) L. Jaenicke u. F. Lynen in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrback: The Enzymes, Academic Press, New York and London, 1960. Bd. 3, S. 3.

⁴¹) H. P. Klein, J. Bacteriol. 73, 530 [1957].

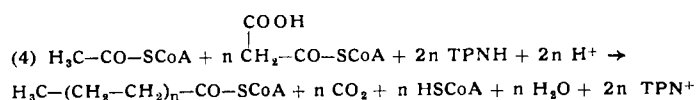
⁴²) D. M. Gibson, E. B. Titchener u. S. J. Wakil, J. Amer. chem. Soc. 80, 2908 [1958].

⁴³) S. J. Wakil u. J. Ganguly, J. Amer. chem. Soc. 81, 2597 [1959].

⁴⁴) F. Lynen, I. Kessel u. H. Eggerer, Sitzungsberichte der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, Sitzung vom 4. März 1960; Biochem. Z., in Vorbereitung; F. Lynen, in: Digestion, Absorption intestinale et Transport des Glycérides chez les Animaux supérieurs, Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1961, Bd. 99, S. 71.

⁴⁵) M. Merckenschlager, K. Schlossmann u. W. Kurz, Biochem. Z. 329, 332 [1957].

in der *Tiselius*-Apparatur als einheitliche Molekel mit einem Molekulargewicht von etwa 2000000 verhielt^{46,47}. Das gereinigte Enzymsystem katalysierte den Aufbau der höheren Fettsäuren gemäß Gleichung (4)⁴⁸.



Als Syntheseprodukte traten Palmityl-CoA ($n = 7$) und Stearyl-CoA ($n = 8$) auf. Wie aus Gleichung (4) zu ersehen, waren für den Ablauf der Reaktion außer Malonyl-CoA und dem Reduktionsmittel TPNH, auch noch der Zusatz von Acetyl-CoA erforderlich, was sich mit den Beobachtungen an gereinigten Präparaten aus tierischen Geweben^{43,48,49} deckt. Acetyl-CoA dient als „Starter“ des Syntheseprozesses. Seine beiden C-Atome finden sich am Methyl-Ende der gebildeten Fettsäuren wieder, die somit durch successiven Anbau von C_2 -Einheiten aus Malonyl-CoA an dieses Acetyl-CoA synthetisiert werden (Abb. 1).

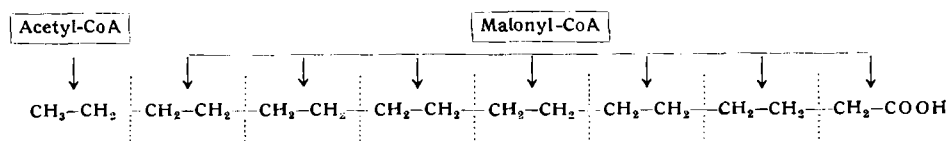
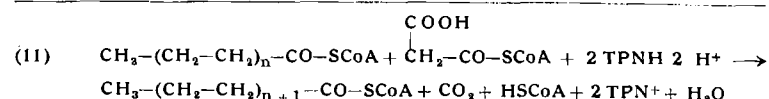
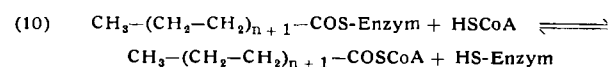
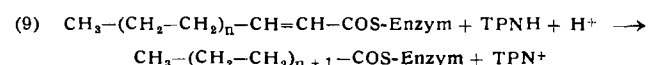
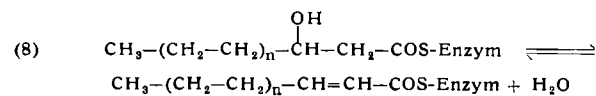
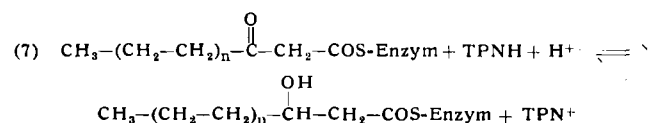
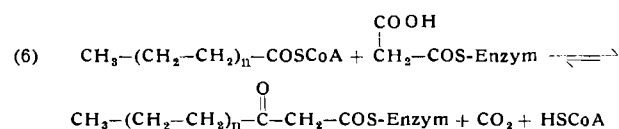
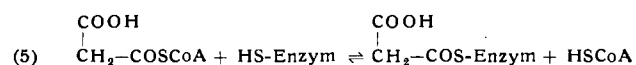


Abb. 1. Herkunft der C-Atome der Palmitinsäure

Des weiteren stellte sich heraus, daß nicht Malonyl-CoA selbst ankondensiert wird, sondern Malonyl-S-Enzym, das durch enzymatische Übertragung des Malonyl-Restes von Coenzym A auf eine prosthetische Sulfhydryl-Gruppe des Enzymkomplexes (HS-Enzym) übertragen wird (Gleichung 5). Bei der Kondensation mit Acetyl-CoA entsteht deshalb nicht Acetacetyl-CoA, sondern Acetacetyl-S-Enzym (Gleichung 6), dessen Bildung sich unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate einwandfrei nachweisen ließ⁴⁴.



⁴⁶) F. Lynen, I. Kessel, E. Lorch, A. Hagen, E. Schweizer u. C. Daba, unveröffentl.

⁴⁷) F. Lynen, Federation Proc., im Druck.

⁴⁸) R. O. Brady, R. M. Bradley u. E. G. Trams, J. biol. Chemistry 235, 3093 [1960].

⁴⁹) D. B. Martin, M. G. Horning u. P. R. Vagelos, ebenda 236, 663 [1961].

An die Bildung der Ketosäure schließt sich beim Aufbau der Fettsäuren die schrittweise Umwandlung in die gesättigten Säuren an, wobei zunächst die Reduktion zum β -Hydroxyacyl-S-Enzym (Gleichung 7), dann die Dehydratisierung zum α,β -Dehydroacyl-S-Enzym (Gleichung 8) und schließlich unter abermaliger Reduktion die Bildung des gesättigten Acyl-S-Enzyms (Gleichung 9) folgt. Der Säurerest kann auf der Stufe der gesättigten Verbindung dann wieder zurück auf das Coenzym A übertragen werden (Gleichung 10).

Als Ergebnis dieser sechsstufigen Reaktionsfolge ist die Kohlenstoff-Kette des Acyl-CoA — in unserem Beispiel Acetyl-CoA ($n = 0$) —, das in die Kondensation mit Malonyl-S-Enzym eintrat, um zwei Kohlenstoff-Atome verlängert worden, wobei eine Molekel Malonyl-CoA und zwei Molekeln TPNH verbraucht wurden (Gleichung 11). Dieses verlängerte Acyl-CoA kann sich dann erneut mit Malonyl-S-Enzym kondensieren usw., bis die C_{16} - bzw. C_{18} -Säuren successive aufgebaut sind. Auf Grund der bisherigen Ver-

suche hat es sogar den Anschein, als würde bei der Verlängerung der Kohlenstoff-Kette das nach Abschluß der Reduktionsvorgänge gebildete gesättigte Acyl-S-Enzym direkt, ohne Zwischenschaltung des Acyl-CoA, mit

dem nächsten Malonyl-S-Enzym kondensiert werden, was durch die Gegenwart von mehr als einer prosthetischen Sulfhydryl-Gruppe im Enzymkomplex erleichtert sein könnte. Die Übertragung der gesättigten Säure zurück auf das Coenzym A folgte dann erst auf der Stufe der Endprodukte Palmitin- und Stearinsäure.

Es war Lynen et al.^{46,47} in Experimenten am gereinigten Enzym der Hefe möglich, jeden der sechs Reaktionsschritte (Gleichungen 5–10) für sich, unabhängig von den vorhergehenden oder nachfolgenden Reaktionen nachzuweisen und quantitativ zu messen. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß die irreversible Reduktion der ungesättigten Säure mit TPNH durch ein gelbes Ferment vermittelt wird, das Flavin-mononukleotid (FMN = Riboflavin-5'-phosphat) als Wirkungsgruppe enthält. Die Kondensationsreaktion selbst, die zur Verlängerung der Kohlenstoffkette führt, erwies sich als reversible. Das Gleichgewicht liegt aber, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der thermodynamischen Betrachtungsweise³⁷) auf der Seite der β -Ketosäure, wie aus dem Geschwindigkeitsunterschied zwischen Hin- und Rückreaktion hervorging. Die Rückreaktion kann durch den Austausch zwischen radioaktivem CO_2 und der freien Carboxyl-Gruppe von Malonyl-CoA gemessen werden, den Vagelos⁵⁰) bei Versuchen an *Clostridium kluyveri*-Extrakten entdeckt und eingehend studiert hat.

Alle Befunde über die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser „Fettsäuresynthetase“ sind mit dem in Abb. 2 entworfenen Bild einer strukturellen Einheit vereinbar, in welcher sechs verschiedene Enzyme um die prosthetische Sulfhydryl-Gruppe gruppiert sind, und zwar so, daß die an dieser SH-Gruppe als Thiolester gebundenen Zwischenstufen der Fettsäuresynthese mit den aktiven Bereichen der verschiedenen Enzyme in Kontakt kommen und in die spezifischen Enzymkatalysen einbezogen werden können. In dem hier entworfenen Bild ist die prosthetische Sulfhydryl-Gruppe an ein Strukturelement des Komplexes gebunden, das selbst keine kata-

⁵⁰) P. R. Vagelos u. A. W. Alberts, J. biol. Chemistry 235, 2786 [1960].

lytischen Eigenschaften besitzt. Es könnte aber auch sein, daß die SH-Gruppe an einer der aktiven Enzymkomponenten selbst, etwa an der für die Kondensation, haftet. Zwischen den beiden Möglichkeiten läßt sich vorerst noch nicht entscheiden.

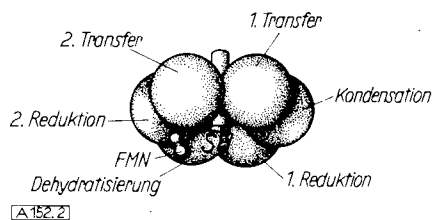


Abb. 2. Hypothetische Struktur des Multienzymkomplexes der Fettsäuresynthese. Die sechs Kugeln symbolisieren die verschiedenen Enzymindividen, welche die sechs Reaktionschritte der Fettsäuresynthese katalysieren.

- | | |
|------------------|----------------|
| 1. Transfer | — Gleichung 5 |
| Kondensation | — Gleichung 6 |
| 1. Reduktion | — Gleichung 7 |
| Dehydratisierung | — Gleichung 8 |
| 2. Reduktion | — Gleichung 9 |
| 2. Transfer | — Gleichung 10 |

Der sich an diesem Enzymkomplex vollziehende Aufbau der Kohlenstoffketten (Gleichungen 5–10) ist in Abb. 3 noch einmal zusammenfassend dargestellt worden, wobei

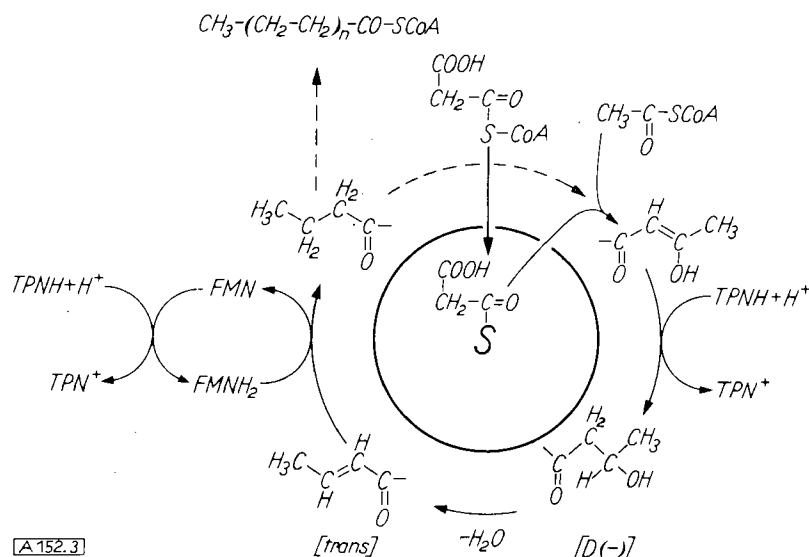


Abb. 3. Schema der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex

auch die Stereochemie der als Zwischenprodukt auftretenden Säuren berücksichtigt wurde. Es ist charakteristisch für diesen Prozeß der Fettsäuresynthese, daß an die Bildung der β -Ketonsäure Hydrierung und Dehydratisierung obligatorisch angeschlossen sind, und die nächste Kondensation mit Malonyl-SCoA bzw. Malonyl-S-Enzym erst auf der Stufe der gesättigten Säure folgt (Abb. 3). Der Grund dafür dürfte im Spezifitätsbereich der beteiligten Enzyme und möglicherweise noch zusätzlich in ihrer spezifischen Anordnung im Enzymkomplex zu suchen sein. Vom thermodynamischen Standpunkt aus wäre bei der Verwertung des Malonsäure-thioesters die Synthese der langen Kohlenstoffketten im Milieu der Zelle auch über eine β -Polyketomethylen-Verbindung möglich.

Bau aromatischer Ringe über Malonyl-CoA

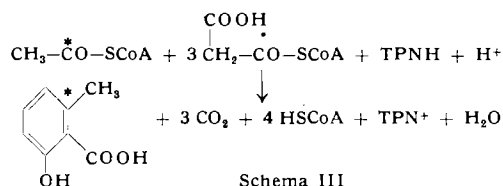
Diese neue wichtige Erkenntnis veranlaßte uns, vor zwei Jahren die Hypothese aufzustellen, daß auch bei der Synthese aromatischer Ringstrukturen und anderer unter die „Polyacetat-Regel“ fallender Naturstoffe nicht Acetyl-CoA, sondern Malonyl-CoA der eigentliche Ket-

tenbaustein sei³⁷⁾. Wir konnten nun den experimentellen Beweis dafür erbringen:

Unser Studienobjekt war die Biosynthese der 6-Methylsalicylsäure (VIII), an welcher Birch et al.¹³⁾ erstmalig die Gültigkeit der „Polyacetat-Regel“ durch den Isotopenmarkierungsversuch beweisen konnten. Ihre Befunde wurden von Tanenbaum und Bassett⁵¹⁾ unter Verwendung von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat in Experimenten an *Penicillium patulum* bestätigt. Von diesem Pilz wird ein Teil der gebildeten 6-Methylsalicylsäure in Patulin umgewandelt. Bassett und Tanenbaum⁵²⁾ gelang es auch schon, durch Extraktion des ausgewachsenen Mycels Enzymlösungen zu gewinnen, denen zwar die Fähigkeit zur Inkorporation freier Essigsäure in Patulin fehlte, die aber Acetyl-CoA noch verwerten konnten.

Wir verwendeten in unseren Versuchen ebenfalls Oberflächenmycel von *Penicillium patulum* (= *Penicillium urticae* Bainier), das nach vier- bis fünftägigem Wachstum auf glucose-haltigen Nährlösungen geerntet wurde. Zur Bereitung eines wirksamen Enzympräparates wurde das gewaschene Mycel in flüssiger Luft eingefroren, im gefrorenen Zustand zerkleinert und im Eisbad mit $0,01\text{N}$ NH_4OH -Lösung extrahiert. Nach Abpressen der groben Zelltrümmer und Zentrifugieren bei 100000g erhielten wir eine klare gelbliche Lösung, aus welcher die Enzymaktivität mit festem Ammonsulfat zwischen 45 und 80% Sättigung ausgefällt werden konnte. Der in $m/10$ Phosphatpuffer von pH 6,9 gelöste und 3 h gegen $m/100$ Phosphatpuffer vom gleichen pH dialysierte Niederschlag, der 6–7mal aktiver war als der rohe Myceleextrakt, wurde bei den Versuchen verwendet.

Analog zur Biosynthese der Fettsäuren war zu erwarten, daß für die Bildung der 6-Methylsalicylsäure 3 Molekeln Malonyl-CoA und zusätzlich 1 Molekel Acetyl-CoA als „Starter“ erforderlich sind. Die Synthese sollte sich somit durch den Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA in Methylsalicylsäure nachweisen lassen. Da die Bildung der Methylsalicylsäure aus Acetyl- und Malonyl-CoA noch eine Hydrierung einschließt (Schema III), sollte die Synthese außerdem an die Gegenwart eines Wasserstoff-Donators gebunden sein.



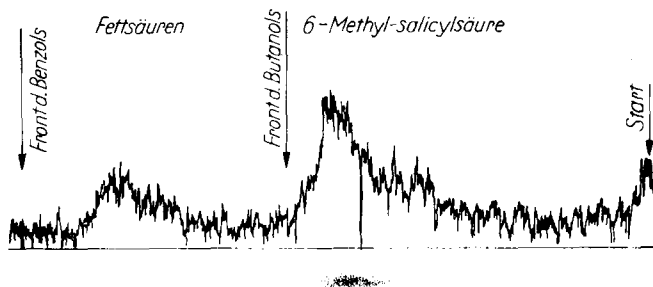
Schema III

In Abb. 4 ist ein Experiment wiedergegeben, das die Bildung von radioaktiver Methylsalicylsäure beim Inkubieren von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA und TPNH in Gegenwart des gereinigten Enzyms belegt. In diesen Versuchen nützten wir zur schnellen Isolierung der aromatischen Carbonsäure und ihrer Trennung von den Fettsäuren den Eisen(III)-Komplex der 6-Methylsalicylsäure aus. Der saure Äther-Extrakt des Reaktionsgemisches wurde auf mit FeCl_3 imprägniertes Papier aufgetragen und

⁵¹⁾ S. W. Tanenbaum u. E. W. Bassett, ebenda 234, 1861 [1959].

⁵²⁾ E. W. Bassett u. S. W. Tanenbaum, Biochim. Biophys. Acta 40, 535 [1960].

zunächst mit Benzol als Fließmittel chromatographiert. Dabei wanderten die gesättigten Fettsäuren C_8 – C_{16} mit $R_f > 0,8$ in der Nähe der Lösungsmittelfront, während der violette Eisen-Methylsalicylsäure-Komplex an der Auftragsstelle blieb. Er wurde erst anschließend mit wasser-gesättigtem Butanol zur Wanderung gebracht ($R_f = 0,87$) und kam, da wir das zweite Fließmittel nur etwa $\frac{2}{3}$ der Wegstrecke des ersten zurücklegen ließen, weit entfernt von den Fettsäuren zu liegen. Im unteren Teil der Abb. 4



A 152.4

Abb. 4. Nachweis der 6-Methyl-salicylsäure-Synthese. Die Reaktionsmischung, bestehend aus 40 μ M K-phosphat-Puffer, p_H 6,85, 7 μ M K_2 -Äthylendiamin-tetraacetat, 0,1 μ M TPN, 0,25 μ M Glucose-6-phosphat, 0,3 Einh. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 0,04 μ M 1 - ^{14}C -Acetyl-CoA (150000 Imp./min), 0,12 μ M Malonyl-CoA, 0,76 mg gereinigtes Enzym und 0,06 μ M 6-Methyl-salicylsäure (als Träger), wurde 120 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Enzymreaktion mit 0,08 ml 2 N KOH, 30 min Versäuerung der Thiolester bei 37°C und Ansäuern, wurden abermals 0,3 μ M 6-Methyl-salicylsäure als Träger zugesetzt und die Lösung dreimal mit je 3 ml Äther extrahiert. Die mit H_2O gewaschene Ätherphase wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels in 0,1 ml 2-proz. $FeCl_3$ in H_2O aufgenommen und auf Whatman 1 Papier, das vorher mit der 2-proz. $FeCl_3$ -Lösung getränkt und getrocknet worden war, chromatographiert (vgl. Text). Auswertung im Radiopapierchromatograph von Frieske und Hoepfner, Erlangen-Bruck

ist die Photographie des Papierstreifens wiedergegeben, darüber befindet sich die Auswertung im Radiopapierchromatographen. Wie man erkennt, ist durch das gereinigte Enzympräparat hauptsächlich 6-Methylsalicylsäure gebildet worden. Daneben waren aber auch noch gesättigte Fettsäuren entstanden, weil bei der Fraktionierung des Mycelextrakts der Enzymkomplex für die Fettsäuresynthese noch nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Um die Identität des Syntheseprodukts mit 6-Methylsalicylsäure weiter zu sichern, wurde die radioaktive Zone eines solchen Chromatogramms mit Äthanol eluiert, der Eisenkomplex mit verdünnter Salzsäure zersetzt und die organische Säure nach Zusatz eines großen Überschusses authentischer 6-Methylsalicylsäure aus wässriger Lösung zur Kristallisation gebracht. Die kristallisierte Säure erwies sich als radioaktiv und behielt ihre spezifische Radioaktivität bei wiederholtem Umkristallisieren unverändert bei (Tabelle 1).

	Spezif. Radioaktivität d. krist. Methyl-salicylsäure (Imp/min/mg)*)
1. Kristallisation	819
2. Kristallisation	(1020)
3. Kristallisation	826
4. Kristallisation	845
5. Kristallisation	890
6. Kristallisation	848

*) Radioaktivitätsmessung vgl. Tabelle 2; Ermittlung der Methylsalicylsäure-Konzentration durch UV-Absorptionsmessung bei 307 m μ ($\epsilon_{307} = 3,6 \cdot 10^4$ cm 2 /Mol).

Tabelle 1. Identifizierung der 6-Methylsalicylsäure. Der aus mehreren Versuchen (vgl. Abb. 4) papierchromatographisch isolierte und mit Äthanol eluierte Methylsalicylsäure-Eisen-Komplex wurde mit verd. HCl zerlegt und die radioaktive Methylsalicylsäure mit Äther extrahiert. Sie wurde durch Chromatographie auf Schleicher und Schüll-Papier 2043b mg/l mit 96% Äthanol-konz. Ammoniak- H_2O (80:4:16) als Lösungsmittel weiter gereinigt und nach Elution mit Äthanol sowie Zugabe von 23 mg authentischer 6-Methylsalicylsäure mit dieser kristallisiert. Die kristallisierte Säure wurde aus heißem Wasser wiederholt umkristallisiert. Von 23 mg 6-Methylsalicylsäure mit 13000 Imp/min waren nach der 5. Kristallisation noch 14 mg (61%) mit 7800 Imp/min (60%) vorhanden

Nachdem so die Bildung von 6-Methylsalicylsäure im Enzymversuch sichergestellt war, führten wir mehrere Versuchsreihen zur Ermittlung des Komponentenbedarfs durch. Ein typisches Ergebnis dieser Experimente ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Erwartungsgemäß wurde ohne

Versuchsreihe		Radioaktivität der 6-Methylsalicylsäure (Imp/min)
I	Kompletter Ansatz	3050
	ohne Malonyl-CoA	420
	ohne Glucose-6-phosphat und TPN	155
II	kompletter Ansatz	2550
	+ 0,01 M Cystein	2293
	+ 0,01 M Glutathion	275
	+ 0,01 M Jodacetamid	

Tabelle 2. Komponentenbedarf der Synthese von 6-Methylsalicylsäure. Zusammensetzung und Aufarbeitung der Ansätze vgl. Abb. 4. Der papierchromatographisch abgetrennte violette Eisen-Methylsalicylsäure-Komplex wurde mit Alkohol aus dem Papier eluiert, in Aluminium-Schälchen überführt und die Radioaktivität nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Methan-Durchflußzähler (Frieske und Hoepfner, Erlangen-Bruck) bestimmt

Malonyl-CoA praktisch kein 1 - ^{14}C -Acetyl-CoA mehr in 6-Methylsalicylsäure inkorporiert, womit Malonyl-CoA als unentbehrlicher Baustein für die Bildung dieses aromatischen Ringsystems endgültig bewiesen war. Außerdem war die Bildung von 6-Methylsalicylsäure an die Gegenwart von TPNH gebunden, das in unseren Versuchen durch das System Glucose-6-phosphat, TPN und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase fortlaufend erzeugt wurde. Ohne Glucose-6-phosphat und TPN $^+$ blieb die Synthese aus. Für sehr aufschlußreich erachten wir den weiteren Befund, daß die Bildung der 6-Methylsalicylsäure durch m/100-Jodacetamid unterbunden wird, weil damit die Annahme naheliegt, daß auch bei dieser Biosynthese Sulfhydryl-Gruppen des beteiligten Enzymsystems unentbehrlich sind. Unter Berücksichtigung der Vorgänge bei der Fettsäure-Synthese aus Malonyl-CoA ist deshalb die Annahme nahelegend, daß sich auch der Aufbau der 6-Methylsalicylsäure an einem Enzymkomplex vollzieht und die als Intermediärprodukte anzunehmenden Polyketosäuren an Sulfhydryl-Gruppen dieses Komplexes thiolester-artig gebunden sind. In diesem Bild ließen sich auch Vorstellungen unterbringen, die Ehrens-värd²³) und Woodward¹¹) für die Biosynthese der polycyclischen Chinone und der Makrolide entwickelt haben. Solche Enzymkomplexe würden gewissermaßen Matrizen darstellen, auf welchen das Rohmaterial Stück für Stück zusammengefügt wird. Das Produkt wird nicht eher freigegeben, bis es mehr oder weniger fertig ist.

Wir kommen damit zu der in Abb. 5 wiedergegebenen Vorstellung vom stufenweisen Verlauf der 6-Methylsalicylsäure-Synthese. Wenn in diesem hypothetischen Schema Reduktion und Dehydratisierung auf die Stufe der C_6 -Säuren verlegt wurden, und nicht erst auf die der fertigen C_9 -Kette, so war die Beobachtung maßgebend, daß in den Reaktionsansätzen ohne TPNH keine Anzeichen für die Bildung von Orsellinsäure (4-Hydroxy-6-methylsalicylsäure, IX) gefunden wurden. Außerdem würde es sich bei der Reduktion thiolester-artig gebundener β -Ketosäuren zu den entsprechenden β -Hydroxysäuren und bei deren Dehydratisierung zu α,β -ungesättigten Säuren um Reaktionen handeln, die vom Studium des biologischen Ab- und Aufbaus der Fettsäuren bekannt sind. Man könnte evtl. sogar gerade das sterische Auswahlvermögen des dehydratisierenden Enzyms im Enzymkomplex als einen der dirigierenden Faktoren für den Ablauf der Synthese an-

und Leucin entstammten⁵³⁾. Analog könnte die Verwertung von Cinnamoyl-CoA für die „Startreaktion“ der Triketosäure-Struktur in die Reihe der Flavonole, Anthocyane und verwandter Naturstoffe führen^{10, 17, 21)}.

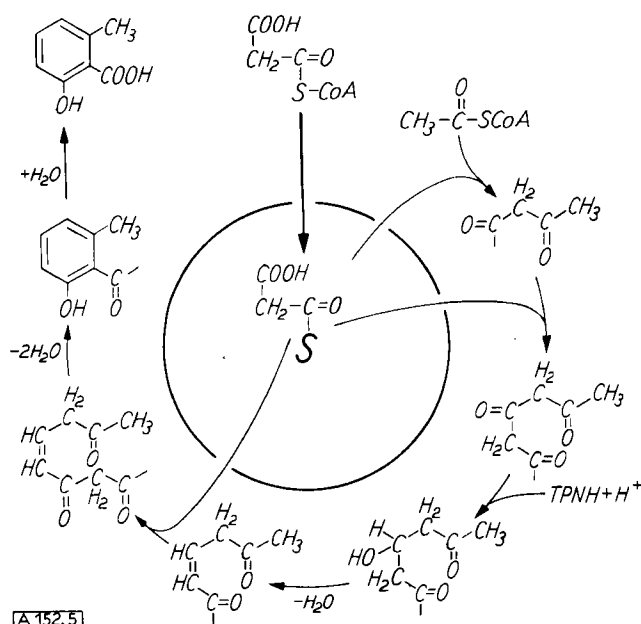


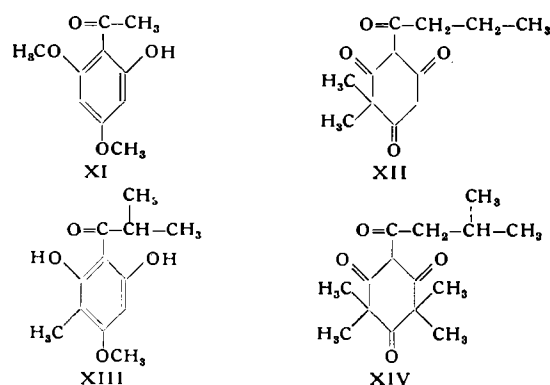
Abb. 5. Hypothetisches Schema der 6-Methyl-salicylsäure-Synthese an einem Multienzymkomplex

zum Benzol-Derivat vorbereiten. Das alles sind jedoch Fragen, die nur durch das eingehendere Studium der beteiligten Enzyme ihre Beantwortung finden werden. Dieses Ziel ist aber nun, da die Synthese der Methyl-salicylsäure mittels löslicher Enzyme gelungen ist, in erreichbare Nähe gerückt.

Eine weitere wichtige Frage ist, ob die Richtung der Synthese außer durch die Spezifität der einzelnen Enzym-Individuen im Multienzymkomplex auch noch durch ihre spezifische räumliche Anordnung innerhalb des Komplexes determiniert ist, d. h. inwieweit topographische Faktoren darüber entscheiden, ob bei der Umformung von Malonyl-CoA, TPNH und dem als „Starter“ dienenden Acetyl-CoA Fettsäuren, aromatische Ringsysteme wie 6-Methyl-salicylsäure oder Makrolid-Strukturen entstehen. Hier würden sich so zahlreiche Variationsmöglichkeiten für die Zelle eröffnen, daß die große Mannigfaltigkeit der in der belebten Natur aufgefundenen „Polyacetat“-Strukturen nicht weiter verwunderlich ist.

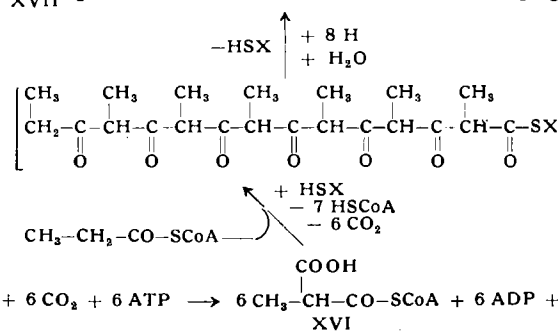
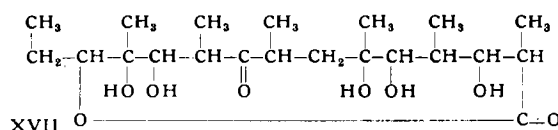
$$6 \text{ CH}_3\text{--CH}_2\text{--CO--S} \\ \text{XV}$$

Eine dritte Variationsmöglichkeit ergibt sich auch aus der Beteiligung von Acetyl-CoA als „Starter“ der Fettsäure- und 6-Methyl-salicylsäure-Synthese. Die vergleichende Betrachtung verschiedener Naturstoffe lehrt, daß das Essigsäure-Derivat in dieser Funktion durch die Coenzym-A-Derivate anderer Säuren vertreten werden kann. So ist in der Serie Xanthoxilin (XI), Butanofilicin-Säure (XII), Baeckeol (XIII) und Leptospermon (XIV), abgesehen von den im Phloroglucin-Ring eventuell zusätzlich vorhandenen Methyl-Gruppen, der wesentliche Unterschied durch die Natur der Acyl-Seitenketten gegeben. Hier ist die Annahme sehr verlockend, daß Acetyl-CoA, n-Butyryl-CoA, Isobutyryl-CoA bzw. Isovaleryl-CoA den Aufbau der diesen Verbindungen gemeinsamen β -Triketosäure-Struktur „gestartet“ haben, wobei die CoA-Derivate der verzweigten Säuren wohl dem biologischen Abbau von Valin



Dafür spricht, daß *Horning* et al.⁵⁴⁾ beim Studium der Fettsäure-Synthese mit gereinigten Enzymen bereits nachweisen konnten, daß Acetyl-CoA als „Starter“ durch die CoA-Derivate niederer verzweigter Carbonsäuren ersetzt werden kann unter Bildung der entsprechenden methyl-substituierten langkettigen Fettsäuren.

Eine letzte Variante ist in der Natur anscheinend noch dadurch gegeben, daß der Baustein Malonyl-CoA gelegentlich durch Methyl-malonyl-CoA (XVI), das Carboxylierungsprodukt von Propionyl-CoA (XV) (Schema IV), ersetzt werden kann. Daß im Falle des Antibiotikums Erythromycin die C-Atome des makrocyclischen Lacton-Rings tatsächlich aus Propionsäure stammen, wie dies *Gerson et al.*⁵⁵⁾ sowie *Woodward*¹¹⁾ aus der chemischen Struktur



Schema IV

abgeleitet haben, konnten Grisebach⁵⁶⁾ sowie Corcoran⁵⁷⁾ kürzlich mit Hilfe der Isotopenmarkierungstechnik beweisen. Dieser Naturstoff dürfte somit das geeignete Objekt sein, um die in Analogie zur biochemischen Bildungsweise der Polyacetate vorgebrachte Hypothese³⁷⁾, der Aufbau des „Polypropionat“-Lactonrings Erythronolid (XVII) vollziehe sich von Methylmalonyl-CoA aus unter Beteiligung von Propionyl-CoA als „Starter“, durch Versuche auf dem Enzymniveau experimentell zu prüfen.

Eingegangen am 25. Mai 1961

[A 152]

- ⁵³⁾ M. J. Coon, W. G. Robinson u. B. K. Bachhawat in W. D. McElroy u. H. B. Glass: Amino Acid Metabolism; The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 431.
- ⁵⁴⁾ M. G. Horning, D. B. Martin, A. Karmen u. P. R. Vagelos, J. biol. Chemistry 236, 669 [1961].
- ⁵⁵⁾ K. Gerzon, E. H. Flynn, M. V. Sigal Jr., P. F. Wiley, R. Monahan u. U. C. Quarck, J. Amer. chem. Soc. 78, 6396 [1956].
- ⁵⁶⁾ H. Grisebach, H. Achenbach u. W. Hofheinz, Z. Naturforsch. 15b, 560 [1960].
- ⁵⁷⁾ J. W. Corcoran, T. Kaneda u. J. C. Butte, J. biol. Chemistry 235, PC 29 [1960].