

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEgeben von der GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

77. JAHRGANG

NR. 21 · SEITE 929–980

7. NOVEMBER 1965

Der Weg von der „aktivierten Essigsäure“ zu den Terpenen und Fettsäuren

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1964 [*]

VON PROF. DR. F. LYNEN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR ZELLCHEMIE, MÜNCHEN, UND CHEMISCHES LABORATORIUM
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Die außerordentliche Auszeichnung, die das Königliche Karolinische Institut den Arbeiten von *Konrad Bloch* und mir „Über Mechanismus und Regulation des Cholesterin- und Fettsäureumsatzes“ zuerkannt hat, legt mir die ehrenvolle Verpflichtung auf, über meine Untersuchungen einen Bericht zu erstatten.

Meine erste Berührung mit der dynamischen Biochemie im Jahre 1937 erfolgte in einem überaus günstigen Moment. In das von *Jöns Jakob Berzelius* erkannte Geheimnis der biologischen Katalyse hatten soeben die wunderbaren Untersuchungen über die Enzymkette der Atmung, über das sauerstoffübertragende Häminferment der Atmung, über die Cytochrome, die gelben Fermente und die Pyridinproteide die ersten Lichtstrahlen auf die zugrundeliegenden chemischen Prozesse geworfen. Das für die Ernährung von Mensch und Tier unentbehrliche Vitamin B_2 war in Form des Phosphatesters von *Hugo Theorell* als die Wirkungsgruppe einer wichtigen Enzymklasse erkannt worden, und die für „das Leben ohne Sauerstoff“ im Sinne *Pasteurs* maßgeblichen Gärungsprozesse waren als das Ergebnis einer Folge von Reaktionen aufgeklärt worden, in deren Zentrum „Wasserstoffverschiebung“ und „Phosphatverschiebung“ mit Adenosintriphosphat als phosphatübertragendem Coferment standen. Aber die für das Verständnis des chemischen Zusammenhangs zwischen Oxydation und Phosphorylierung maßgebliche Schlüsselsubstanz, 1,3-Diphosphoglycerinsäure, lag noch im tiefen Meer des Unbekannten. *Otto Warburg* war ihr im Rahmen seiner Untersuchungen über die Gärungsfermente jedoch bereits auf der Spur und konnte sie 1939 der Fachwelt präsentieren. Für einen jungen Biochemiker waren es ungeheuer aufregende Jahre.

[*] © 1965 The Nobel Foundation. — Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Nachdruck dieses Vortrages.

In diesen Zeitabschnitt fiel meine erste selbständige Untersuchung [1], die dem Stoffwechsel von Hefezellen nach dem Einfrieren in flüssiger Luft galt und die mich gleich mit dem Mechanismus der alkoholischen Gärung in Berührung brachte. Diese Arbeit war für mich sehr lehrreich und vermittelte zwei wichtige Erfahrungen: Einmal, daß beim Experimentieren mit lebenden Zellen den Permeabilitätseigenschaften der Zellmembranen besondere Beachtung zu schenken ist, und zum anderen, daß das Adenosinpolyphosphat-System in der Zelle außer bei der Energieübertragung auch bei der Steuerung der Stoffwechselvorgänge maßgeblich beteiligt ist [2]. Mit dieser Untersuchung wurde mein Interesse für die Fragen der Stoffwechselregulation geweckt, das mich gleich zur Untersuchung des Pasteur-Effekts führte [3] und mir bis heute erhalten geblieben ist.

Die „aktivierte Essigsäure“

Daß ich dann zur Beschäftigung mit dem Problem des Essigsäurestoffwechsels kam, entsprang meinem Aufenthalt im Laboratorium *Heinrich Wielands*. Dort hatte man die Oxydation der Essigsäure durch Hefezellen studiert und gefunden, daß zwar die Hauptmenge der Essigsäure vollständiger Oxydation anheimfällt, aber ein Teil in Form von Bernstein- und Citronensäure liegen bleibt [4]. Der Thunberg-Wieland-Prozeß, wonach zwei Moleküle Essigsäure unter Dehydrierung Bernsteinsäure liefern und diese über Oxalessigsäure, Brenz-

[1] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 539, 1 (1939).

[2] F. Lynen, Naturwissenschaften 30, 398 (1942).

[3] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 546, 120 (1941).

[4] H. Wieland u. R. Sonderhoff, Liebigs Ann. Chem. 499, 213 (1932).

traubensäure und Acetaldehyd Essigsäure zurückbildet oder auf der Stufe der Oxalessigsäure mit einem weiteren Molekül Essigsäure zu Citronensäure zusammentreitt (Abb. 1), konnte diese Befunde erklären. Die experimentelle Prüfung dieser Vorstellung durch *Wielands* Schüler *Robert Sonderhoff* [5] brachte jedoch eine Überraschung. Die nach Darreichung von Trideuterioessigsäure an Hefezellen gebildete Citronensäure enthielt zwar die erwartete Menge Deuterium, aber die Bernsteinsäure nur die Hälfte der nach *Wielands* Schema zu fordernden vier Deuteriumatome.

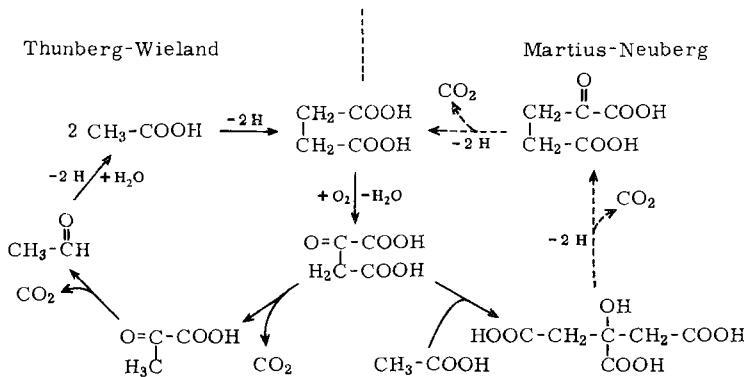


Abb. 1. Vorstellungen vom Essigsäure-Abbau in Hefe.

Die Lösung der hiermit aufgeworfenen Probleme lieferte *Carl Martius* [6]. Er erkannte, daß sich die Citronensäure im tierischen Stoffwechsel mit Isocitronensäure ins Gleichgewicht setzt und unter Oxydation α -Ketoglutaräure liefert, deren Übergang in Bernsteinsäure schon *Carl Neuberg* gefunden hatte (Abb. 1). Nach diesen Ergebnissen konnte man mit ziemlicher Sicherheit annehmen, daß die Bernsteinsäure, die von der Hefe aus Acetat gebildet wird, auf dem Weg über die Citronensäure entstanden sei [7]. Die Versuche *Sonderhoffs* mit deuterierter Essigsäure brachten noch eine weitere wichtige Entdeckung. Bei der Analyse der Hefezellen selbst stellte sich nämlich heraus, daß zwar die Fraktion der Kohlenhydrate nur unbedeutende Mengen Deuterium enthielt, in den gebildeten Fettsäuren und der Sterinfaktion dagegen viel schwerer Wasserstoff vorhanden war. Dies bewies, daß Fettsäuren und Sterine auf direktem Wege aus Essigsäure entstanden waren und nicht auf dem Umweg über die Kohlenhydrate. Durch den frühen Tod *Sonderhoffs* wurden diese wichtigen Befunde im Münchener Laboratorium nicht mehr weiter verfolgt. Auf diesem Gebiet haben erst die Isotopenversuche *Konrad Blochs*, worüber er selbst berichtet, die Aufklärung gebracht.

Mein Interesse wandte sich zunächst ganz der Umwandlung der Essigsäure in Citronensäure zu, die mit der Formulierung des Citronensäure-Cyclus durch *Hans Adolf Krebs* [8] in den Mittelpunkt des aeroben Kohlenhydratabbaus gerückt war. Im Gegensatz zu *Krebs*, der in Brenztraubensäure den Kondensationspartner der Oxal-

essigsäure sah, waren wir auf Grund der besprochenen Versuche an Hefe fest davon überzeugt, daß Brenztraubensäure zunächst zur Stufe der Essigsäure oxydiert wird und dann erst die Kondensation zustandekommt. Allein, unsere Versuche, die Synthese der Citronensäure aus Oxalessigsäure und Essigsäure mit Hefezellen zu erreichen, deren Membranen durch Einfrieren in flüssiger Luft auch für mehrbasige Säuren durchlässig gemacht worden waren blieben erfolglos [7].

Hier führte die Beobachtung von *Wieland* [9] weiter, daß Hefezellen, die durch Schütteln unter Sauerstoff an endogenen Brennstoffen „verarmt“ worden waren, zugesetzte Essigsäure erst nach einer gewissen „Induktionszeit“ oxydieren konnten (Abb. 2). Diese „Induktionszeit“ ließ sich durch Zugabe geringer Mengen eines leicht oxydierbaren Substrats, wie Äthylalkohol, abkürzen, was ich damit erklärte, daß Essigsäure auf Kosten der Oxydation des Alkohols oder der Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus in eine „aktiviertes Essigsäure“ übergeht, und sich erst diese mit Oxalessigsäure kondensieren kann [10].

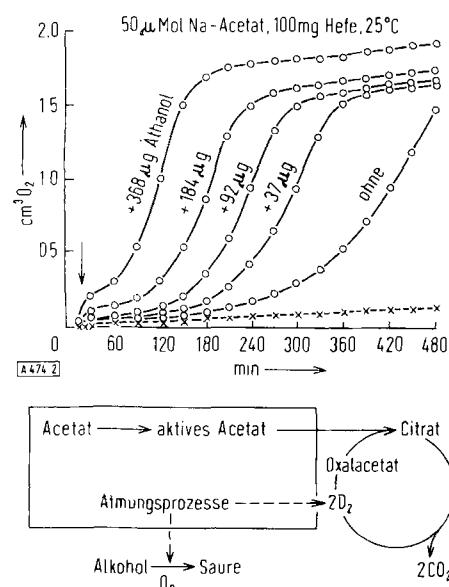


Abb. 2. Wirkung von Alkohol auf die „Induktionszeit“ beim Essigsäure-Abbau.

Rückblickend läßt sich feststellen, daß ich unabhängig in den gleichen Problemkreis geraten war wie *Fritz Lipmann* [11], der die Unentbehrlichkeit anorganischen Phosphats für die Brenztraubensäureoxydation durch Milchsäurebakterien gefunden hatte und als Oxydationsprodukt Acetylphosphat nachweisen konnte. Da man in diesem Anhydrid aus Essigsäure und Phosphorsäure die „aktiviertes Essigsäure“ vermuten konnte, synthetisierte ich das kristallisierte Silbersalz der Acetylphosphorsäure [12]. Aber wieder versagte das Experiment; bei der Inkubation des Acetylphosphats mit Oxalessigsäure und Hefepräparaten war keine Citronen-

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

[6] C. Martius, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 247, 104 (1937).

[7] F. Lynen u. N. Neciullah, Liebigs Ann. Chem. 541, 203 (1939).

[8] H. A. Krebs u. W. A. Johnson, Enzymologia 4, 148 (1937).

[9] H. Wieland, O. Probst u. M. Crawford, Liebigs Ann. Chem. 536, 51 (1938).

[10] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 552, 270 (1942).

[11] F. Lipmann, J. biol. Chemistry 134, 463 (1940).

[12] F. Lynen, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 367 (1940).

säure zu erhalten. Auf dieser Stufe blieb dann meine Arbeit an diesem Problem für einige Jahre stehen, wo- für nicht zuletzt die der freien Forschung abträglichen Zeitläufe verantwortlich waren.

Als sich dann nach mehrjähriger Unterbrechung der wissenschaftliche Kontakt mit der Umwelt wieder einstellte, erfuhr ich von den Fortschritten, die bei der Bearbeitung des Problems der „aktivierten Essigsäure“ inzwischen erzielt worden waren. *Fritz Lipmann* hat die Entwicklung in seinem Nobelvortrag ausführlich geschildert [13], und ich brauche sie nicht zu wiederholen. Der wesentliche Fortschritt bestand in der Erkenntnis, daß an der Bildung der „aktivierten Essigsäure“ aus Acetat außer ATP als Energiequelle noch das neu entdeckte, das Vitamin Pantothenäsäure enthaltende Coenzym A beteiligt ist und die „aktivierte Essigsäure“ wahrscheinlich ein acetyliertes Coenzym A sei.

Versuche an Hefezellen, die ich zusammen mit *Reichert* und *Rueff* [14, 15] vornahm, waren mit einer solchen Vorstellung gut vereinbar. Wir fanden, daß während der „Induktionszeit“, welche die Oxydation der Essigsäure durch „verarmte“ Hefe einleitet (Abb. 2), Atmungintensität und Coenzym-A-Gehalt einander proportional sind. Sobald die Oxydation der Essigsäure in vollem Gange war, hatte der Coenzym-A-Gehalt der Hefe ein hohes Plateau erreicht. Wir nahmen deshalb an, daß Hefezellen in dieser Phase auch reich an acetyliertem Coenzym A und das geeignete Ausgangsmaterial zu seiner Isolierung sein mußten. Wir hätten die Versuche zur Isolierung des Acetyl-CoA möglicherweise nicht in Angriff genommen, wäre ich nicht schon von der Idee besessen gewesen, daß sich ein Thioester dahinter verbirgt. Ich erinnere mich noch ganz genau, wie mir dieser Einfall kam. Es war auf dem kurzen abendlichen Heimweg von einem Gespräch mit meinem Schwager, *Theodor Wieland*, in dem wir stundenlang ohne Ergebnis darüber diskutiert hatten, an welcher Gruppe des Pantothenäurebausteins im Coenzym A der Essigsäurerest wohl gebunden sein könnte. Auf dem kurzen Weg fiel mir plötzlich ein, daß *Lipmann* [16] in der Publikation über das Coenzym A den Gehalt an Disulfiden erwähnt hatte, allerdings ohne ihm weitere Beachtung zu schenken. Das war nicht verwunderlich, denn das untersuchte Coenzym-A-Präparat war noch keineswegs rein. Für mich gewann diese Anmerkung aber Bedeutung, weil mir aufgefallen war, daß die damals schon bekannten coenzym-A-abhängigen Enzymreaktionen samt und sonders des Zusatzes von Cystein oder Glutathion bedurften. Ich faßte beide Befunde in der Annahme zusammen, daß der Schwefel ein wesentlicher Bestandteil des Coenzym A sei und nur als Sulfhydrylgruppe die Funktionen des Coenzymes ausüben könne.

Es hat uns deshalb nicht sonderlich überrascht, als sich die „aktivierte Essigsäure“ im Verlauf der Reinigung aus Hefekochsaft als Thioester oder, was damit gleich-

bedeutend ist, als Acylmercaptan aus Essigsäure und Coenzym A herausstellte [14,15]. Seine Identifizierung gelang auf verschiedenen Wegen und ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben [15,17]. Ich möchte mich hier auf die Erwähnung eines einzigen Beweisstücks beschränken, weil dabei eine neue kolorimetrische Methode in Anwendung kam. Thioester geben mit Nitroprussidnatrium und Alkali eine verzögerte Farbreaktion, die sich quantitativ auswerten lässt [18]. Als wir im Verlauf der Reinigung bei verschiedenen Präparaten den Gehalt an „aktivierter Essigsäure“, durch die enzymatische Acetylierung von Sulfanilamid gemessen, und den Gehalt an Thioester verglichen, ergab sich vollkommene Übereinstimmung zwischen beiden Werten (Abb. 3).

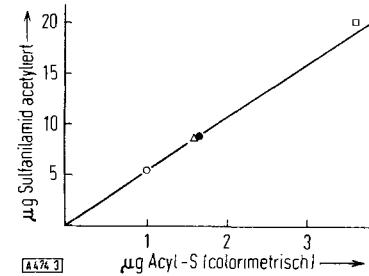


Abb. 3. Identität von Acetyl-Donator und Thioester

- Zerlegtes Bariumsalz
- Elution von Aktivkohle
- Trockenpräparate (nach Acetonfällung)

Inzwischen war auch durch die Untersuchungen von *Snell* und Mitarbeitern [19] der Schwefelgehalt des Coenzym A gesichert und nachgewiesen worden, daß die Sulfhydrylgruppe im Coenzym A als Pantethein, dem Peptid aus Pantothenäsäure und Cysteamin, vorliegt. Die Formel der „aktivierten Essigsäure“, wie sie sich nach Aufklärung der Konstitution des Coenzym A ergab, die *Lipmann* [13] in seinem Nobelvortrag geschildert hat, ist in Abb. 4 wiedergegeben.

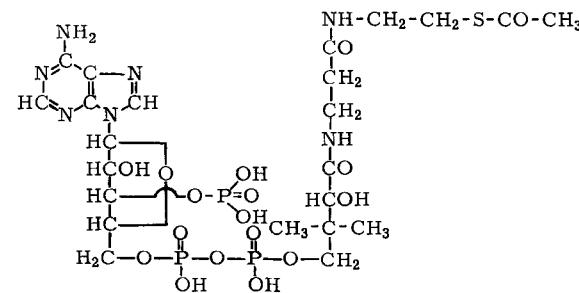


Abb. 4. Formel der „aktivierten Essigsäure“ = Acetyl-CoA.

Nach der gelungenen Isolierung der „aktivierten Essigsäure“ und ihrer Identifizierung mit Acetyl-CoA führten wir als nächstes den Nachweis, daß wir den lange gesuchten Acetyldonator in Händen hatten, der, außer für die Acetylierung des Sulfanilamids, auch für die Bildung von Acetylcholin, von Citronensäure und von Acetessigsäure den Essigsäurerest liefert (vgl. [17]). Mit die-

[13] *F. Lipmann*: Les Prix Nobel en 1953. Stockholm 1954, S.151.
 [14] *F. Lynen u. E. Reichert*, Angew. Chem. 63, 47 (1951).

[15] F. Lynen, F. Reichert u. L. Rueff, Liebigs Ann. Chem.

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

[16] F. Lipmann, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle u. B. M. Guirard, J. biol. Chemistry 186, 235 (1950).

[17] F. Lynen, Harvey Lectures 48, 210 (1954).

[18] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 574, 33 (1951).

[18] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 574, 53 (1951).
 [19] E. E. Snell u. G. M. Brown, Advances in Enzymol. 14, 49 (1953).

sen Experimenten wurde die Funktion des Coenzym A als die eines Acetylüberträgers chemisch aufgeklärt (Abb. 5). Sie beruht auf der reversiblen Bindung des Acetylrestes an die Sulfhydrylgruppe des Coenzym A. Mit dieser Bindung gewinnt die Acetylgruppe die für ihre vielfältigen Umsetzungen im Stoffwechsel erforderliche doppelte chemische Reaktivität: mit nucleophilen Substituenten an der Carbonylgruppe und mit elektrophilen Substituenten an der benachbarten Methylgruppe [21–23].

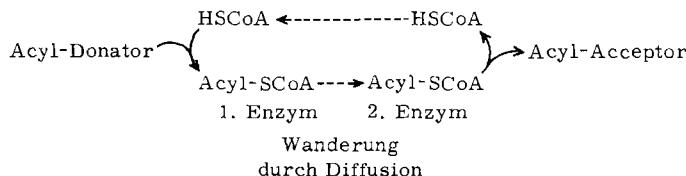


Abb. 5. Schema der enzymatischen Acetylübertragung.

Die Übertragung der Acetylgruppe vom Donator zum Acceptor unter Vermittlung spezifischer Enzyme unterliegt den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie der zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen bereits wohlbekannte Wasserstoff- oder Phosphattransport [24]. Auch bei der Acetylübertragung ist es wesentlich, daß die Bindungsenergie, im Sinne von Lipmann [20], beim Übergang vom Donator auf das Coenzym A erhalten bleibt. Es ließ sich auch aussagen, daß die „Bindungsenergie“ des Thioesters Acetyl-CoA von gleicher Größenordnung

erwarten war, daß außer den „energiereichen“ Phosphaten und Thioestern noch weitere „energiereiche“ Verbindungen im Intermediärstoffwechsel auftreten. Diese Vermutung ist inzwischen mehrfach bestätigt worden.

Der Fettsäure-Cyclus

Die Erkenntnis, daß im Acetyl-CoA ein Thioester vorliegt, war auch in einer anderen Hinsicht von größter Bedeutung. Es war aus Untersuchungen zum Fettsäureabbau durch Mitochondrien aus Leber oder Bakterienextrakten bereits bekannt, daß die Säuren erst „aktiviert“ werden müssen, bevor die β -Oxydation einsetzen kann (vgl. [25]). Außerdem hatte das Studium des Abbaus von Acetessigsäure und höheren β -Ketosäuren ergeben, daß Citronensäure gebildet wird und der Weg somit über „aktivierte Essigsäure“ führt (vgl. [26]). Die Entdeckung der Thioesterbindung im Acetyl-CoA ermöglichte es mir, ein chemisches Reaktionsschema für die Fettsäure-Oxydation zu formulieren, das allen bisherigen Befunden gerecht wurde [14, 15, 27]. Es zeigte sich, daß im Prinzip die Knoop-Dakinsche Formulierung der β -Oxydation [28, 29] beibehalten werden konnte, wenn man die freien Säuren durch ihre Coenzym-A-Derivate ersetzt (Abb. 6). Die Schlüsselreaktion der ganzen Abbaufolge („Fettsäure-Cyclus“), die mit Dehydrierungen und einer Hydratisierung vorbereitet wird,

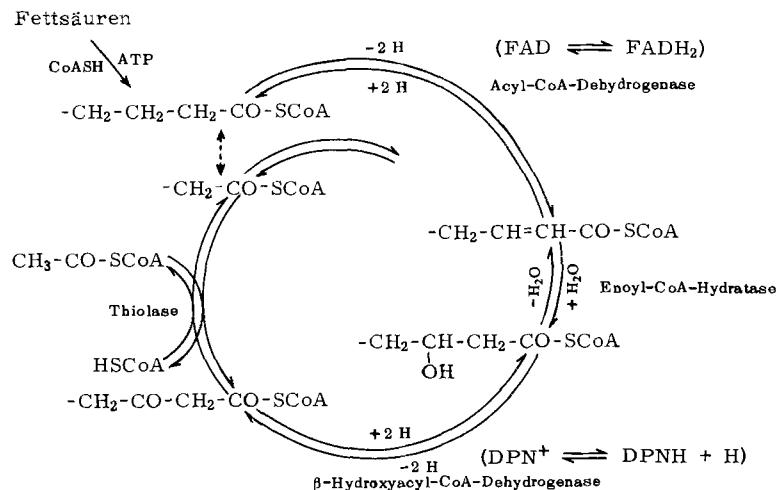


Abb. 6. Der „Fettsäure-Cyclus“.

sein mußte wie diejenige des Acetylphosphats oder des ATP [15], was später durch exakte Messungen in vollem Umfang bestätigt wurde (vgl. [23]). Dies war eine Erkenntnis von weittragender Bedeutung, weil damit die sogenannte „energiereiche Phosphatbindung“ ihre Sonderrolle im Energiehaushalt der Zelle einbüßte und zu

besteht in der thiolytischen Spaltung der β -Ketosäure durch Coenzym A. Dabei entsteht Acetyl-CoA und das Coenzym-A-Derivat einer Fettsäure, die zwei Kohlenstoffatome weniger enthält als die Ausgangssäure, und die nun sofort im nächsten Umlauf in gleicher Weise

- [20] F. Lipmann, Advances in Enzymol. 1, 99 (1941).
 [21] F. Lynen, Federation Proc. 12, 683 (1953).
 [22] F. Lynen, J. cellular comparat. Physiol. 54, Suppl. 1, 53 (1959).
 [23] L. Jaenicke u. F. Lynen, in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York und London 1960, Bd. 3, S. 3.
 [24] O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente. Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948.

[25] E. P. Kennedy and A. L. Lehninger, in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism. The Johns Hopkins Press, Baltimore 1952, Bd. 2, S. 253.

[26] C. Martius u. F. Lynen, Advances in Enzymol. 10, 167 (1950).

[27] F. Lynen, L. Wessely, O. Wieland u. L. Rueff, Angew. Chem. 64, 687 (1952).

[28] F. Knoop: Oxydationen im Tierkörper. Enke-Verlag, Stuttgart 1931.

[29] H. D. Dakin: Oxidations and Reductions in the Animal Body. Longmans, Green and Co., London 1912.

oxydativ umgewandelt wird. Diese Reaktionsfolge kann wiederholt werden, bis die Fettsäure vollständig in Acetyl-CoA umgewandelt ist.

Das Substrat wird in dieser wiederholten Reaktionsfolge regeneriert, die dadurch dem Citronensäure-Cyclus oder dem cyclischen Prozeß bei der Harnstoffsynthese ähnelt. Jedoch entstehen bei diesen cyclischen Prozessen nach jedem Umlauf identische Substrate, dagegen bildet der Fettsäure-Cyclus bei jedem Umlauf eine homologe kürzere Kette. Es wäre daher korrekter, die Fettsäureoxydation durch einen Spiral- als durch einen Kreisprozeß zu beschreiben.

Als ich zusammen mit *Wessely*, *Wieland*, *Seubert* und *Rueff* das Studium der vier Reaktionsschritte des Fettsäure-Cyclus in Angriff nahm, synthetisierten wir zunächst, um die Eigenschaften der vermuteten Zwischen-

res Verfahren zur präparativen Darstellung der CoA-Derivate bedient sich spezifischer Enzyme, wofür sich in erster Linie die Enzyme der „Fettsäure-Aktivierung“ als geeignet erwiesen (vgl. [36]).

Parallel zu unseren Untersuchungen am Fettsäure-Cyclus gingen Untersuchungen bei *Ochoa* und bei *Green* (vgl. [37]). Auch sie ergaben, daß in den beiden Oxydationsschritten Flavinadenindinucleotid bzw. Diphosphopyridinnucleotid den Wasserstoff übernehmen und daß im Hydratisierungsschritt L-(+)-Hydroxybutyryl-CoA und seine Homologen gebildet werden (Abb. 6). Beim Studium der Thiolase, die als Schlüsselenzym des Fettsäure-Cyclus die Abspaltung von Acetyl-CoA besorgt, hatten sich Hinweise dafür ergeben, daß im aktiven Zentrum des Enzyms eine Sulfhydrylgruppe steht. Meine Vermutung, daß diese am katalytischen Prozeß im

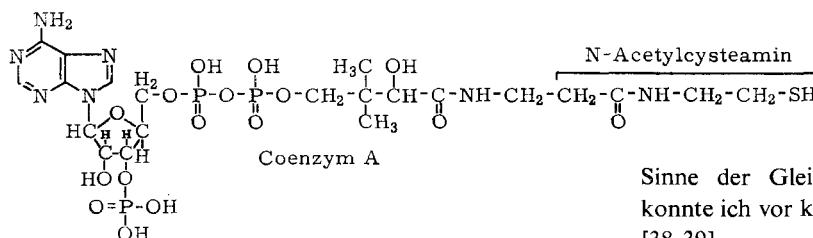


Abb. 7. N-Acetylcysteamin, ein Bauelement des Coenzym A.

produkte kennen zu lernen, Modellverbindungen, in denen das komplizierte Coenzym A durch das einfache Bauelement N-Acetylcysteamin ersetzt war (Abb. 7). Dabei entdeckten wir die spezifischen UV-Absorptionsbanden der Thioester der α, β -ungesättigten Säuren und der β -Ketosäuren, die für Enzymversuche zu einem unerlässlichen analytischen Hilfsmittel wurden [21, 30]. Die Modellsubstanzen wurden aber auch in anderer Hinsicht noch überaus wertvoll, als wir fanden, daß die meisten Enzyme des Fettsäure-Cyclus an Stelle der natürlichen CoA-haltigen Substrate auch die einfachen Modelle umzusetzen vermögen [21, 31]. Wir bauten darauf optische Enzymteste auf, und es bestätigte sich von neuem die Prognose *Otto Warburgs* [24], des Entdeckers dieser Methode, daß, „verfolgt mit einem optischen Test, kein Ferment seiner Isolierung entgehen kann“. Am Beginn unserer Untersuchungen an den Enzymen des Fettsäure-Cyclus war außer Acetyl-CoA, das wir aus Hefekochsaft isolierten, das nach *Stadtman* [32] aber auch auf enzymatischem Wege aus Acetylphosphat darstellbar war, noch kein anderes Coenzym-A-Derivat bekannt. Es fehlten noch die allgemein anwendbaren chemischen Darstellungsmethoden, die dann von *Simon* und *Shemin* [33], von *Wieland* und *Rueff* [34] und von mir und *Decker* [35, 36] geliefert wurden. Ein ande-

[30] F. Lynen, Angew. Chem. 67, 463 (1955).

[31] F. Lynen, K. Decker, O. Wieland u. D. Reinwein, in G. Popjak u. E. Le Breton: Biochemical Problems of Lipids. Butterworths, London 1956, S. 142.

[32] E. R. Stadtman, J. biol. Chemistry 203, 501 (1953).

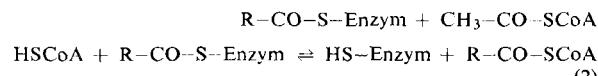
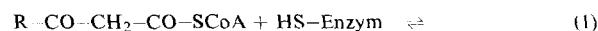
[33] E. J. Simon u. D. Shemin, J. Amer. chem. Soc. 75, 2520 (1953).

[34] Th. Wieland u. L. Rueff, Angew. Chem. 65, 186 (1953).

[35] K. Decker, Dissertation, Universität München, 1955.

[36] K. Decker: Die aktivierte Essigsäure. Das Coenzym A und seine Acyldeivate im Stoffwechsel der Zelle. Enke-Verlag, Stuttgart 1959.

Sinne der Gleichungen (1) und (2) teilnimmt [21], konnte ich vor kurzem zusammen mit *Gehring* beweisen [38, 39].



Es ließ sich auch zeigen, daß die aktive Sulfhydrylgruppe einem Cysteinrest in der Polypeptidkette des Enzyms angehört. Im reinen Zustand ist die Thiolase aus Schweineherz schließlich auch kristallisiert erhalten worden (Abb. 8). Noch nicht endgültig gelöst ist die Frage,

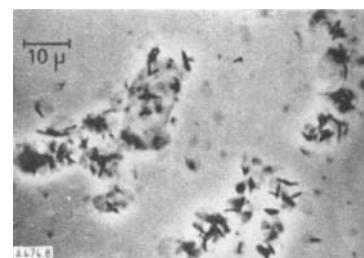


Abb. 8. Kristallisierte Thiolase aus Schweineherz.

ob bei der Thiolasereaktion so wie bei der Dehydrierung der gesättigten Fettsäure-CoA-Verbindungen die Substrate mit verschiedenen Kettenlängen von verschiedenen Enzymen umgesetzt werden, oder ob, wie im Falle der β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Enoyl-CoA-Hydratase, ein einziges Enzym ausreicht (vgl. [36]). Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen zum Fettsäureabbau haben wir auch den chemischen Me-

[37] F. Lynen u. K. Decker, Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 49, 327 (1957).

[38] F. Lynen u. U. Gehring: Abstracts of Communications presented at the First Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. London 1964, S. 3.

[39] U. Gehring, Dissertation, Universität München, 1964.

chanismus der Acetessigsäurebildung in der Leber bearbeitet, der für die Entstehung der Ketose bei der Zuckerkrankheit und beim Hunger verantwortlich ist. Wir trafen beim Studium dieses Prozesses auf einen neuen Stoffwechsel-Cyclus, den wir HMG-CoA-Cyclus nennen [40], und der immer dann in Funktion treten muß, wenn die beim Fettsäureabbau gebildeten Mengen Acetyl-CoA vom Citronensäure-Cyclus der Leber nicht mehr bewältigt werden können. Mit den Ursachen dieser Insuffizienz des Citronensäure-Cyclus hat sich vor allem *Otto Wieland* [41] erfolgreich beschäftigt.

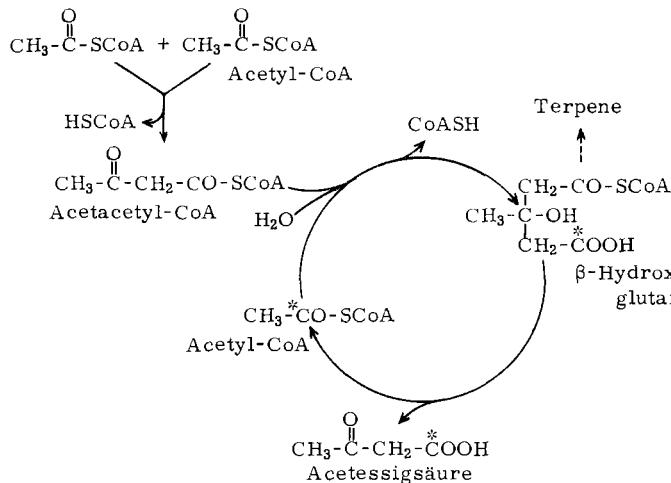


Abb. 9. Die Bildung von Acetessigsäure im „HMG-CoA-Cyclus“.

Die Umwandlung des Acetyl-CoA in Acetessigsäure wird eingeleitet mit der Kondensation von Acetyl-CoA mit sich selbst, die unter Abspaltung von Coenzym A zu Acetacetyl-CoA führt und die Umkehrung der zuvor besprochenen thiolytischen Spaltung der β -Ketosäuren ist (Abb. 9). Der kürzeste Weg vom Acetacetyl-CoA weiter zur freien Acetessigsäure wäre die Hydrolyse durch Wasser, die man auch anfänglich diskutierte [42, 43]. Zusammen mit *Henning*, *Bublitz* und *Sörbo* habe ich dann jedoch gefunden, daß der Vorgang komplizierter ist. Acetacetyl-CoA kondensiert sich zunächst mit Acetyl-CoA unter Bildung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA), das dann in der von *Coon* [44] entdeckten Spaltungsreaktion unter Rücklieferung von Acetyl-CoA freies Acetacetat ergibt (Abb. 9). Für das Funktionieren dieses Kreisprozesses ist es sehr wichtig, daß die Kondensation zwischen Acetyl-CoA und Acetacetyl-CoA, wie aus Experimenten von *Rudney* [45] und von uns [40] hervorgeht, praktisch irreversibel ist. Auf diese Weise können die äußerst geringen Mengen Acetacetyl-CoA, die im enzymatischen Gleichgewicht mit Acetyl-CoA stehen, durch Kondensation abgefangen

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

[41] O. Wieland, L. Weiss u. I. Eger-Neufeldt, in G. Weber: Advances in Enzyme Regulation. Pergamon Press, London 1964, Bd. 2, S. 25.

[42] *H. R. Mahler*, Federation Proc. 12, 694 (1953).

[43] *J. R. Stern, M. J. Coon u. A. Del Campillo, Nature (London) 171, 28 (1953).*

[44] B. K. Bachhawat, W. G. Robinson u. M. J. Coon, J. biol. Chemistry 216, 727 (1955).

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

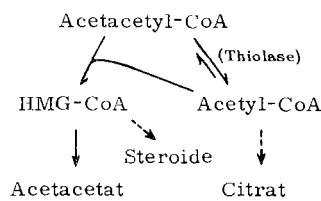


Abb. 10. Die Bedeutung der irreversiblen Kondensationsreaktion für den Aufbau von Kohlenstoffketten aus Acetyl-CoA mit Thiolase.

und die Gesamtreaktion in Richtung der β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Synthese gezogen werden (Abb. 10).

Als besonders bemerkenswert ist zu erwähnen, daß die Zelle die als Abbauvorgang zu wertende Freisetzung von Acetessigsäure aus Acetacetyl-CoA mit der Synthese von β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA einleitet und damit ein Zwischenprodukt gewinnt, das als Baumaterial für die große Naturstoffklasse der Terpene dient. In dieser Hinsicht läßt sich der „HMG-CoA-Cy-

clus“ mit dem Citronensäure-Cyclus vergleichen, wo ja auch die Verbrennung der Essigsäure über Verbindungen wie α -Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure oder Oxal-essigsäure führt, die Vorstufen zahlloser biosynthetischer Prozesse sind.

Der biochemische Wirkungsmechanismus des Biotins

Die Kondensationsreaktion zwischen Acetyl-CoA und Acetacetyl-CoA unter Bildung von β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, die im einwandfreien Enzymversuch erst später bestätigt wurde [40, 45], hatte ich schon 1951 im Rahmen eines Vortrags in Freiburg (vgl. [46]) nach der Isolierung des Acetyl-CoA postuliert, um die Verteilung der Methyl- und Carboxylkohlenstoffatome der Essigsäure im Cholesterin und den Terpenen zu erklären. Diese grundlegenden Isotopenversuche werden von *Konrad Bloch* in seinem Vortrag erläutert. Aus der gefundenen Isotopenverteilung war zu schließen, daß beim Übergang von β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA in die C₅-Einheit, die man nach *Leopold Ruzickas* [47] klassischen Untersuchungen an den Terpenen zu fordern hatte, die freie Carboxylgruppe abgespalten wird. Man hat deshalb und auch aus anderen Gründen lange Zeit geglaubt, daß β -Methylcrotonyl-CoA das gesuchte „aktivierte Isopren“ sei (vgl. [48]), und über β -Methylglutaconyl-CoA entstünde, wie es in Abb. 11 wiedergegeben ist.

Dies war der Anlaß, daß wir uns mit dem beteiligten Enzymsystem näher beschäftigten. Das führte uns zunächst zur Entdeckung der Methylglutaconase, die β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA unter Wasserabspal-

[46] F. Lynen, *Nature (London)* 174, 962 (1954).

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

[48] *H. Rudney*, in *G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor*: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols. Churchill, London 1959, S. 75.

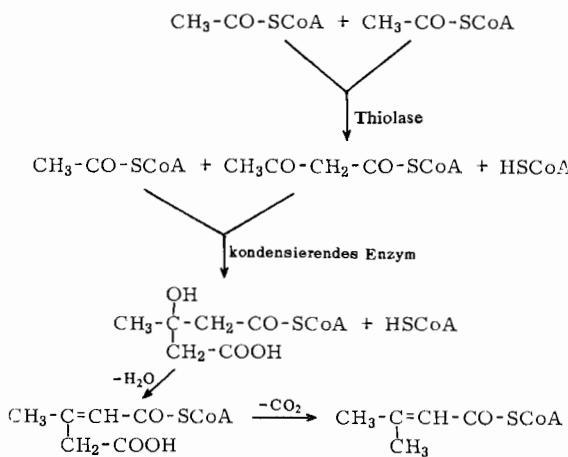
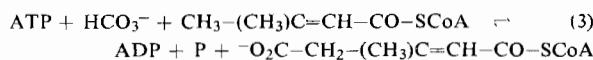


Abb. 11. Reaktionsschritte der Umwandlung von Acetyl-CoA in β -Methylcrotonyl-CoA.

tung in *trans*- β -Methylglutaconyl-CoA umwandelt [49, 50]. Die Dehydratisierung erwies sich als reversibel, ebenso wie die anschließende Decarboxylierung. Für deren Studium und das der umgekehrten Reaktion, der Carboxylierung von β -Methylcrotonyl-CoA, hatte Coon [51] Vorarbeit geleistet. Er hatte die Beteiligung von ATP nachgewiesen, sich aber hinsichtlich des CO_2 -Acceptors und der Spaltprodukte des ATP geirrt.

Unter Richtigstellung der Verhältnisse fanden wir, daß sich die Carboxylierungsreaktion durch Gleichung (3) beschreiben läßt.



Um die chemischen Umsetzungen aufzuklären, welche ATP-Spaltung und Carboxylierung miteinander verbinden, gingen wir von der naheliegenden Annahme einer „aktivierten Kohlensäure“ aus, einem Konzept, das auf die grundlegenden Entdeckungen Harland Woods [52] zurückgeht. Die Existenz der von anderer Seite vorgeschlagenen Verbindungen: Kohlensäure-adenylat [51] oder Kohlensäure-phosphat [53], erschien uns aus chemischen Gründen recht zweifelhaft. Für die Richtung, in welcher die Lösung des Problems der „aktivierten Kohlensäure“ schließlich zu suchen sei, lieferten ältere Untersuchungen Lardys [54] einen wichtigen Hinweis, in denen die Beeinträchtigung einiger CO_2 -Fixierungs-Reaktionen bei Biotinmangel nachgewiesen worden war. Allerdings waren alle Versuche, das Vitamin Biotin als Bestandteil von carboxylierenden Enzymen einwandfrei nachzuweisen, ergebnislos geblieben. Tietz und Ochoa [55] hatten sogar in einem hochgereinigten Präparat von

[49] H. Hilz, J. Knappe, E. Ringelmann u. F. Lynen, Biochem. Z. 329, 476 (1958).

[50] F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann u. J. P. Lachance, Biochem. Z. 335, 123 (1961).

[51] M. J. Coon, F. P. Kupiecki, E. E. Dekker, M. J. Schlesinger u. A. Del Campillo, in G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols. Churchill, London 1959, S. 62.

[52] M. F. Utter u. W. H. G. Wood, Advances in Enzymol. 12, 41 (1951).

[53] M. Flavin, H. Castro-Mendoza u. S. Ochoa, Biochim. biophysica Acta 20, 591 (1956).

[54] H. A. Lardy u. R. Peanasky, Physiol. Rev. 33, 560 (1953).

[55] A. Tietz u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 234, 1394 (1959).

Propionyl-CoA-Carboxylase, deren Wirkung analog unserer Carboxylase war, nach Biotin gesucht, aber nichts gefunden.

Trotzdem ließ ich mich nicht von der Vermutung abbringen, daß Biotin die Wirkungsgruppe unserer β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und die „aktivierte Kohlensäure“ ein carboxyliertes Biotin sei. In Zusammenarbeit mit Knappe, Lorch und Ringelmann [50, 56] ließ sich zunächst durch quantitative Biotinbestimmungen nachweisen, daß alle wirksamen Präparate unserer Carboxylase kovalent gebundenes Biotin enthielten. Außerdem nahmen im Verlauf der Enzymreinigung Fermentaktivität und Biotingehalt im gleichen Verhältnis zu (Abb. 12). Die Identität des Biotins mit der Wirkungsgruppe der Carboxylase gab sich in der spezifischen Enzymhemmung mit Avidin aus rohem Hühner-

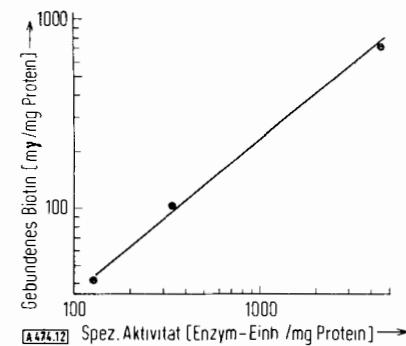
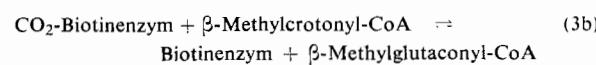
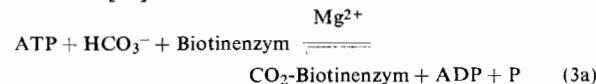


Abb. 12. Proportionalität zwischen Enzymaktivität und Biotingehalt.

eiweiß zu erkennen. Avidin verbindet sich mit Biotin zu einem überaus stabilen Komplex und blockiert damit die Katalyse. Diese einfache Methode, biotinhaltige Enzyme durch Hemmung mit Avidin zu kennzeichnen, geht auf Untersuchungen von Wessman und Werkman [57] zurück. In neuerer Zeit wurde davon beim Studium der Fettsäuresynthese durch Wakil wieder Gebrauch gemacht [58].

Durch Austauschversuche mit markierten Substraten konnten wir dann die Carboxylierung des β -Methylcrotonyl-CoA in die Reaktionsschritte (3a) und (3b) unterteilen [50].



Vor allem die Tatsache, daß der Isotopenaustausch zwischen β -Methylcrotonyl-CoA und $[1,3,5-^{14}\text{C}_3]\text{-Methylglutaconyl-CoA}$ durch Avidin gehemmt wird, war ein unmittelbarer Hinweis auf das CO_2 -Biotinenzym. Später ist dann die generelle Gültigkeit dieses Reaktionsverlaufs an Carboxylasen verschiedener Spezifität nachgewiesen worden, zunächst durch analoge Austausch-

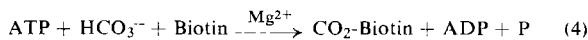
[56] F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting u. E. Ringelmann, Angew. Chem. 71, 481 (1959).

[57] G. E. Wessman u. C. H. Werkman, Arch. Biochem. Biophys. 26, 214 (1950).

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

versuche, wie wir sie beim Studium der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxyliase entwickelt hatten, dann aber auch durch die direkte Isolierung der CO_2 -Biotinenzyme (vgl. [59, 60]). Hierüber haben erstmals *Kaziro* und *Ochoa* [61] berichtet, die nach Bekanntgabe unserer Ergebnisse die Biotinbestimmung an der inzwischen kristallisierten Propionyl-CoA-Carboxylase wiederholten und nun Biotin ebenfalls als wesentlichen Bestandteil des Enzyms fanden.

Wir hatten uns nach Abschluß der Austauschversuche an der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, mit denen unser Konzept von der Existenz der „aktivierten Kohlensäure“ in Form des CO_2 -Biotinenzymes bestätigt wurde, gleich der Aufgabe zugewandt, die Art der Bindung zwischen Kohlensäure und Biotin zu ergründen. Hierbei erwies uns die Carboxylase einen außerordentlichen Gefallen. Nach meinen guten Erfahrungen mit Modellsubstraten beim Studium der Enzyme des Fettsäure-Cyclus setzten wir freies Biotin in die Carboxylase-Reaktion ein. Dabei stellte sich heraus, daß das Enzym an Stelle des spezifischen Substrats β -Methylcrotonyl-CoA auch freies Biotin in den Carboxylierungsprozeß einbezieht und gemäß Gleichung (4) ein carboxyliertes Biotin liefert [50, 56].



Diese Reaktion ist insofern ungewöhnlich, als sie noch bei keinem anderen Biotinenzym beobachtet wurde. Sie ist andererseits durch eine Spezifität ausgezeichnet – es reagiert nur das natürliche (+)-Biotin –, die es glaubhaft machte, daß es sich um ein Modell der Teilreaktion (3a) handelt, indem freies Biotin an die Stelle des enzymgebundenen Biotins tritt.

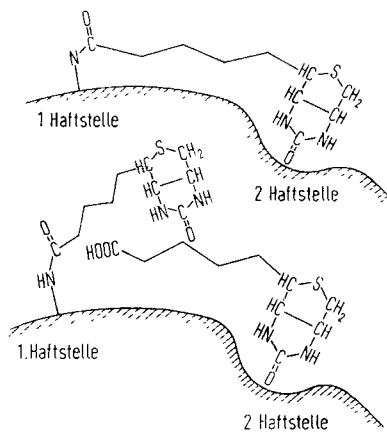


Abb. 13. Hypothese über die Bindung von Biotin an Carboxylase.

Zur Erklärung nehmen wir an, daß die enzymeigene Biotinwirkungsgruppe außer über die Carboxylgruppe noch über ein zweites Zentrum, möglicherweise das Ringsystem, am Protein gebunden ist (Abb. 13). Zu dieser zweiten Bindungsstelle hat auch das freie Biotin Affinität, so daß es, in höherer Konzentration eingesetzt, die enzymeigene Wirkungsgruppe verdrängt und

[59] F. Lynen, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 1775 (1964).

[60] Y. Kaziro u. S. Ochoa, Advances in Enzymol. 26, 283 (1964).

[61] Y. Kaziro u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 236, 3131 (1961).

an ihrer Stelle mit Kohlensäure beladen wird [50]. Im Versuch mit radioaktivem ^{14}C -Bicarbonat erhielten wir auf diese Weise ein radioaktives $^{14}\text{CO}_2$ -Biotin, das sich als überaus säurelabil erwies. Dies war keine Überraschung, weil ich aus chemischen Erwägungen von vornherein den Imidazolidon-Ring des Biotins als Wirkungszentrum vermutet hatte. Um in diesen Versuchen das im Reaktionsansatz noch vorhandene überschüssige ^{14}C -Bicarbonat zu entfernen, ohne das labile $^{14}\text{CO}_2$ -Biotin

Tabelle 1. Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ an (+)-Biotin.

Der komplette Reaktionsansatz bestand aus 20 μMol Trispuffer (pH = 8), 2 μMol MgSO_4 , 20 μMol (+)-Biotin, 0,5 μMol ATP, 3,3 μMol $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ (10 μC 1mp/min) und 50 μg Carboxylase (Mycobact., spez. Akt. 400). Gesamtvolumen 0,5 ml. Die Ansätze wurden 60 min bei 37 °C inkubiert, dann auf 0 °C abgekühlt und 20 min mit einem kräftigen CO_2 -Strom durchgast. Zur Radioaktivitätsmessung wurden aliquote Teile der Lösung eingetrocknet und ausgezählt.

	komplett	ohne ATP	ohne Biotin
Imp./min	130000	0	0
μMol $^{14}\text{CO}_2$ fixiert [a]	0,43	0	0

[a] Aus der fixierten Radioaktivität berechnet.

zu zerstören, benutzten wir einen einfachen experimentellen Kunstgriff. Wir leiteten normales $^{12}\text{CO}_2$ durch das Reaktionsgemisch und trennten damit das radioaktive $^{14}\text{CO}_2$ vollständig ab, während das radioaktive $^{14}\text{CO}_2$ -Biotin zurückblieb. Wie Tabelle 1 zeigt, wurde in den Kontrollversuchen ohne ATP oder ohne Biotin unter den gleichen Bedingungen keine Aktivität gefunden.

Es war dann ein rein chemisches Problem, das labile radioaktive Carboxybiotin durch Überführen in den Methylester (mit Diazomethan) zu stabilisieren und das stabile Produkt durch Vergleich mit synthetischen Verbindungen [62] und durch eine bei *Steinrauf* in Urbana durchgeführte Röntgenstrukturanalyse [63] als 1-Methoxycarbonylbiotin-methylester zu identifizieren. Bei der Lösung dieser Aufgabe hat mein Mitarbeiter *Knappe* sehr viel eigene Initiative entwickelt.

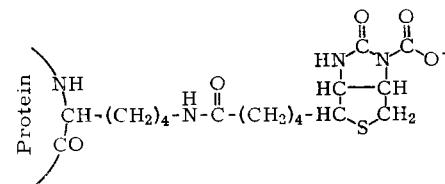


Abb. 14. Die Struktur der „aktivierten Kohlensäure“.

Der „aktivierten Kohlensäure“ konnten wir somit die in Abb. 14 wiedergegebene Partialformel zuteilen. Eine gewisse Unsicherheit bezüglich der Konstitution der CO_2 -Biotinenzyme, die nach diesen Versuchen noch verblieben war, ist inzwischen durch die Aufklärung der CO_2 -Bindungsstelle in vier carboxylierten Biotinenzymen beseitigt worden. An diesen Arbeiten waren *Knappe* [62a], der inzwischen an die Universität Heidelberg übergesiedelt war und dort die Methodik ausgearbeitet hat, so-

[62] J. Knappe, E. Ringelmann u. F. Lynen, Biochem. Z. 335, 168 (1961).

[62a] J. Knappe, B. Wenger u. U. Wiegand, Biochem. Z. 337, 232 (1963).

[63] C. Bonnemere, J. A. Hamilton, L. K. Steinrauf u. J. Knappe, Biochemistry 4, 240 (1965).

wie *Lane* [64], *Wood* [65] und *Numa* [66] in meinem Laboratorium beteiligt. Die Bindung zwischen Biotin und dem Eiweiß erfolgt in allen Fällen über die ϵ -Aminogruppe peptidgebundener Lysinreste, wie aus Abb. 14 zu entnehmen ist. Diese Bindungsstelle, die vom Biotin her seit langem bekannt war, wurde erstmals von *Kosow* und *Lane* [67] in der Propionyl-CoA-Carboxylase nachgewiesen. Die bisher entdeckten Biotinenzyme sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Die bisher bekannten Biotinenzyme und ihre Substrate.

Biotinenzym	Substrat
Acetyl-CoA-Carboxylase	$\text{CH}_3\text{—CO—SCoA}$
Propionyl-CoA-Carboxylase	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CO—SCoA}$
β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	$(\text{CH}_3)_2\text{C—CH—CO—SCoA}$
Geranyl-CoA-Carboxylase	$\text{R—}(\text{CH}_3)\text{C—CH—CO—SCoA}$ [a] $\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$
Pyruvat-Carboxylase	
Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase	$\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$ oder $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CO—SCoA}$

[a] $\text{R} = (\text{CH}_3)_2\text{C=CH—}(\text{CH}_2)_2\text{—}$.

Obschon das primäre Strukturproblem der „aktivierten Kohlensäure“ nunmehr abgeschlossen ist, bleiben Fragen, die mit ihrer Bildungsweise und ihrer Reaktivität zusammenhängen, noch offen (vgl. [59, 68]). Leider kann ich auf diese Probleme hier nicht näher eingehen. Ich muß mich mit dem Hinweis begnügen, daß die Aktivierung der Kohlensäure in den CO_2 -Biotinenzymen auf dem vom Ureidosystem ausgehenden Elektronensog beruht, der die Elektrophilie des Carbonyl-C-Atoms und damit die Fähigkeit zur Transacylierung bestimmt. Akzeptoren der „aktivierten Kohlensäure“ sind Methyl- oder Methylengruppen, die unter dem Einfluß einer benachbarten Carbonylgruppe die Tendenz zur Bildung von Carbanionen besitzen (vgl. Tabelle 2). Nach Versuchen von *Rétey* bleibt die Konfiguration von Propionyl-CoA bei der Carboxylierung erhalten. Das bedeutet, daß die eintretende Carboxylgruppe diejenige Stelle einnimmt, die vom ausscheidenden Proton verlassen wurde. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, daß die Transcarboxylierung über einen Quasi-Sechsring verläuft (Abb. 15), worauf mich *John R. Johnson* im Anschluß an einen Vortrag an der Cornell Universität hingewiesen hat.

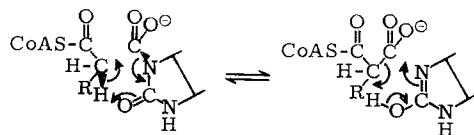


Abb. 15. Mechanismus der CO_2 -Übertragung.

- [64] M. D. *Lane* u. F. *Lynen*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 379 (1963).
 [65] H. G. *Wood*, H. *Lochmüller*, C. *Riepertinger* u. F. *Lynen*, Biochem. Z. 337, 247 (1963).
 [66] S. *Numa*, E. *Ringelmann* u. F. *Lynen*, Biochem. Z. 340, 228 (1964).
 [67] D. P. *Kosow* u. M. D. *Lane*, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 439 (1962).
 [68] J. *Knappe* u. F. *Lynen*: 14. Kolloquium d. Ges. f. physiol. Chemie. Springer-Verlag, Berlin 1964, S. 265.

Die Reaktivität der am Biotin gebundenen Kohlensäure drückt sich auch in den energetischen Verhältnissen aus.

Für die freie Energie des Zerfalls von CO_2 -Biotinenzym wurde von *Wood* in meinem Laboratorium der Wert $\Delta F^\circ = -4,74$ (kcal/Mol) bei pH = 7,0 bestimmt. Damit werden die CO_2 -Biotinenzyme in die „energiereichen“ Verbindungen des Stoffwechsels eingereiht, allerdings am unteren Ende dieser Reihe. Die CO_2 -Biotinenzyme sind noch unbeständiger als das freie CO_2 -Biotin, woraus man entnehmen kann, daß auch der Proteinteil der Biotinenzyme wesentlich zur Reaktivität der „aktivierten Kohlensäure“ beiträgt [68]. Welcher Art dieser Beitrag sein kann, ist vorerst noch unbekannt und setzt die Einsichtnahme in die Anordnung der Aminosäuren im „aktiven Zentrum“ der Biotinenzyme voraus.

Die Biosynthese der Terpene

Das sorgfältige Studium der Biotinenzyme hat, wie ich später zeigen werde, Wesentliches zum Verständnis der biologischen Fettsäuresynthese beigetragen. Für die Aufklärung der Umwandlung von Acetyl-CoA in die Terpene und in Cholesterin, unter welchem Aspekt unsere Arbeiten an der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase angefangen wurden, waren die erzielten Ergebnisse belanglos. Es stellte sich ja heraus, daß β -Methylcrotonyl-CoA gar nicht der gesuchte Baustein der Terpene und des Cholesterins ist. Den entscheidenden Fortschritt brachte die Entdeckung der Mevalonsäure im Arbeitskreis um *Karl Folkers* in den Forschungslaboratorien von Merck, Sharp und Dohme [69]. Diese Entdeckung löste Untersuchungen aus, bei denen mein Arbeitskreis und der um *Konrad Bloch* im Wettstreit lagen, und die in der gleichzeitigen Identifizierung des „aktivierten Isoprens“ mit Δ^3 -Isopentenyl-pyrophosphat gippten [70, 71]. Darüber hat *Konrad Bloch* in seinem Nobelpreisvortrag ausführlich berichtet.

Es erübrigt sich deshalb, auf den Verlauf unserer Untersuchungen im Detail einzugehen, und ich kann mich nach Art eines Malers damit begnügen, auf das fertiggestellte Bild der Terpensynthese noch ein paar Lichtpunkte aufzutragen. In Abb. 16 ist die Kette der Reaktionsschritte vom Acetyl-CoA zum Squalen wiedergegeben, die sich in drei Abschnitte unterteilen läßt. Im ersten Abschnitt wird das Kohlenstoffskelett der Mevalonsäure aus drei Molekülen Acetyl-CoA synthetisiert. Der Energiebedarf dieses Vorgangs wird von drei Thioesterbindungen gedeckt, die dabei unter Freisetzung von Coenzym A verbraucht werden, und von der Oxydation der beiden TPNH-Moleküle, welche die Reduktion des β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA zur Mevalonsäure bewirken. Im zweiten Abschnitt erfolgt die Umwandlung

- [69] A. F. *Wagner* u. K. *Folkers*, Advances in Enzymol. 23, 471 (1961).
 [70] F. *Lynen*, H. *Eggerer*, U. *Henning* u. I. *Kessel*, Angew. Chem. 70, 738 (1958).
 [71] S. *Chaykin*, J. *Law*, A. H. *Phillips*, T. T. *Tchen* u. K. *Bloch*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 998 (1958).

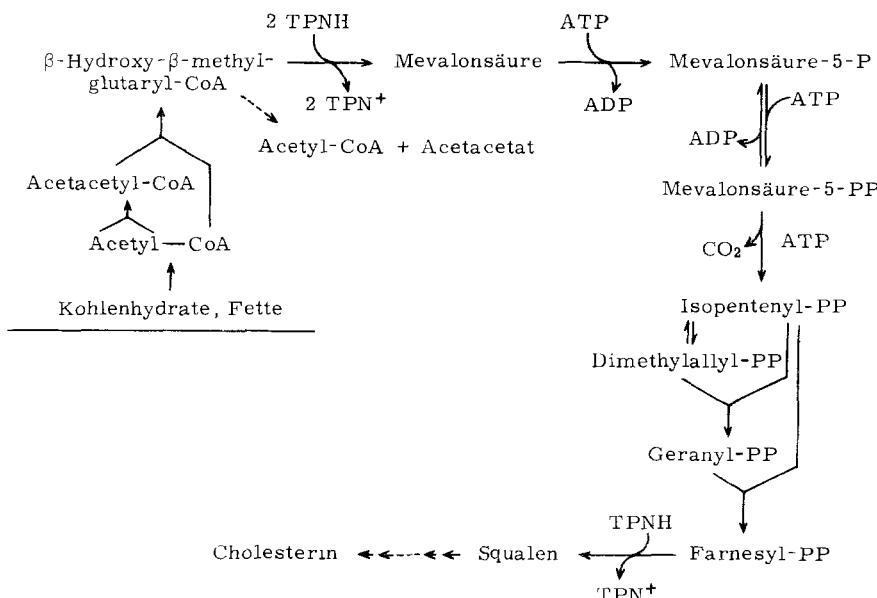


Abb. 16. Der Weg der Biosynthese der Terpene.

der Mevalonsäure in Isopentenyl-pyrophosphat. Die Bildung dieses „aktivierten Isoprens“ erfordert 3 Moleküle ATP und wird zusätzlich gefördert durch die Abspaltung eines Moleküls CO_2 . Für die Synthese der langen Kohlenstoffketten in der letzten Phase ist keine zusätzliche Energiequelle erforderlich, da durch die Abspaltung des anorganischen Pyrophosphates aus den Allyl-Verbindungen schon genügend Energie verfügbar ist. Im übrigen dürfte das gebildete anorganische Pyrophosphat im Milieu der Zelle sofortiger Hydrolyse durch Pyrophosphatase anheimfallen, was zur Irreversibilität des ganzen Prozesses noch beiträgt.

Zusammen mit Eggerer, Henning, Kessel, Knappe und Agranoff habe ich einfache Methoden entwickelt, um jedes der beteiligten Enzyme quantitativ zu bestimmen und ihre Reinigung zu verfolgen. Damit haben wir ein Fundament gelegt, das auch für den Arzt wertvoll werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt beansprucht das Enzym für die Reduktion des β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA besondere Beachtung. An ihm ist bemerkenswert, daß die Reduktion des Thioesters zum Alkohol praktisch irreversibel ist und in einem Akt besorgt wird, so daß die Zwischenstufe des Aldehyds in freier Form nicht auftritt [72, 73]. Da sich im aktiven Zentrum des beteiligten Enzyms nachweislich eine Sulfhydrylgruppe befindet, haben wir angenommen, daß das Aldehyd-Zwischenprodukt in Form des Halbmercaptals an der SH-Gruppe des Enzyms gebunden bleibt. Experimentell wurde diese Annahme allerdings noch nicht bewiesen.

Die Beschäftigung mit dem reduzierenden Enzym ist aber vor allem im Hinblick auf die physiologische Regulation der Terpen- und Cholesterinsynthese von Bedeutung. Das Enzym findet sich bei der Aufarbeitung von Leberhomogenaten in der Mikrosomenfraktion und hat im Tierkörper die Rolle des „Schrittmacher-Enzyms“ für die Cholesterinsynthese. Nancy Bucher

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

[73] I. F. Durr u. H. Rudney, J. biol. Chemistry 235, 2572 (1960).

[74, 75] hat nicht nur als erste auf diesen wichtigen Punkt hingewiesen, sondern ihre Vorstellung durch direkte Enzymbestimmungen während eines kurzen Aufenthalts in meinem Laboratorium auch experimentell unterbaut. Ihre Befunde wurden dann von anderer Seite bestätigt [76, 77].

Die Kontrolle der Cholesterinbildung an diesem Schritt der Synthesekette ist sehr sinnvoll, da die einmal entstandene Mevalonsäure im höheren Organismus infolge der Irreversibilität der Reduktase-Reaktion nur in die Sterinsynthese abfließen kann, während die Vorstufe β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA durch Spaltung in Acetyl-CoA und Acetacetat wieder dem Acetyl-CoA-Vorrat einverleibt wird (vgl. Abb. 16).

Die beiden anderen Enzyme, zu denen ich etwas bemerken möchte, sind die von uns Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase und Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase oder -Polymerase genannten Enzyme [78, 79]. Durch ihr Zusammenwirken kommt der Aufbau der Kohlenstoffkette durch elektrophile Addition an Methylendoppelbindungen zustande. Die Isomerase, unter deren Wirkung Isopentenyl-pyrophosphat in Dimethylallyl-pyrophosphat übergeht (vgl. Abb. 16), wird durch Thiolreagentien vollständig gehemmt, weshalb wir vermuten, daß die Wirkungsgruppe des Enzyms eine Sulfhydrylgruppe enthält und die Isomerisierung über die intermediäre Anlagerung und Abspaltung des SH-Enzyms an die Doppelbindung zustandekommt. Der Isomerase kommt im Prozeß der Terpensynthese eine sehr wichtige

[74] N. L. R. Bucher, in G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols. Churchill, London 1959, S. 46.

[75] N. L. R. Bucher, P. Overath u. F. Lynen, Biochim. biophysica Acta 40, 491 (1960).

[76] M. D. Siperstein u. V. M. Fagan, in G. Weber: Advances in Enzyme Regulation. Pergamon Press, London 1964, Bd. 2, S. 249.

[77] D. M. Regen, C. Riepertinger u. F. Lynen, unveröffentlicht.

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

[79] F. Lynen, in G. E. W. Wolstenholme u. C. M. O'Connor: Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport. Churchill, London 1961, S. 244.

tige Rolle zu, denn durch die Bildung des Dimethylallyl-pyrophosphats „zündet“ sie den Prozeß des Aufbaus der Kohlenstoffketten unter Mitwirkung der Polymerase. Einmal in Gang gekommen, kann dieser Prozeß, der bei jedem Schritt das homologe, um eine Isopreneinheit verlängerte Allylpyrophosphat bildet, weiterlaufen, und er ist nur begrenzt durch die Spezifität des an der Polymerisation beteiligten Enzyms. Das Enzym der Hefe macht praktisch auf der Stufe des Farnesylpyrophosphates halt, obgleich es in einer sehr langsamten Reaktion auch noch Geranyl-geranyl-pyrophosphat [80], die Muttersubstanz der Diterpene, des Phytols und der Carotinoide, entstehen läßt. Dagegen führt das polymerisierende Enzym im Milchsaft von *Hevea Brasiliensis* den Prozeß bis zur Bildung von hochmolekularem Kautschuk weiter [81].

Zu erwähnen ist weiterhin, daß sich die Alkylierungsfähigkeit der Allylpyrophosphate nicht auf die Doppelbindung des Isopentenylpyrophosphates beschränkt, sondern sich auch an den Doppelbindungen substituierter Hydrochinone [79] oder des Protohämins betätigen kann. Auf diesem Wege dürften die verschiedenen Vitamine K und Ubichinone sowie das Cytohämin des Warburgschen Atmungsfermentes entstehen. Dieser für das aerobe Leben wichtigsten Eisenverbindung, über deren Entdeckung Otto Warburg 1931 in seinem Nobelpreisvortrag berichtete [82], kommt die in Abb. 17 wiedergegebene Strukturformel zu, wie ich zusammen mit Grassl und Seyffert vor einem Jahr nachweisen konnte [83].

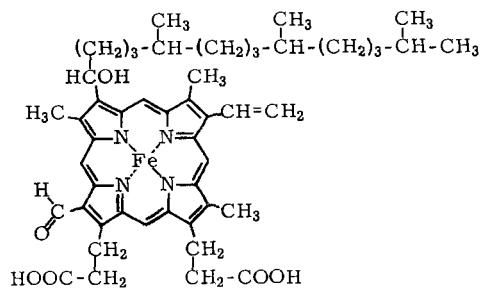


Abb. 17. Struktur des Cytohämins.

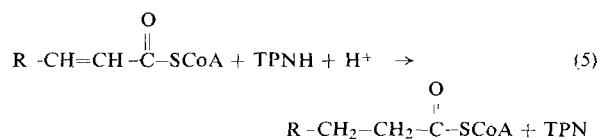
Unsere Arbeiten über die Biosynthese der Terpene hätten nicht in so kurzer Zeit zu den erzielten Erfolgen geführt, hätten wir nicht die chemischen Methoden Eggerers [84, 85] zur Verfügung gehabt, um Isopentenylpyrophosphat sowie Dimethylallyl-pyrophosphat und seine Homologen zu synthetisieren. Von großem Nutzen war auch unsere Methode, Allylpyrophosphate aus wässrigen Lösungen mit Kollidin zu extrahieren. Sie ermöglichte es mir mit Henning, im Farnesyl-pyrophosphat den ersten Vertreter dieser sehr säureempfindlichen Verbindungsklasse des Zellstoffwechsels zu entdecken [70, 79].

- [80] K. Kirschner, Dissertation, Universität München 1961.
- [81] U. Henning, E. M. Mösllein, B. Arreguin u. F. Lynen, Biochem. Z. 333, 534 (1961).
- [82] O. Warburg: Les Prix Nobel en 1931. Stockholm 1933.
- [83] M. Grassl, U. Coy, R. Seyffert u. F. Lynen, Biochem. Z. 338, 771 (1963).
- [84] H. Eggerer u. F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 630, 58 (1960).
- [85] H. Eggerer, Chem. Ber. 94, 174 (1961).

Der Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese

Durch die Erfolge beim Studium der Reaktionskette der Terpensynthese ermutigt, wandte ich mich wieder der Aufklärung der Fettsäuresynthese zu. Auf diesem Gebiet hatte ich mich zunächst geirrt, weil bei der Formulierung des Fettsäure-Cyclus angenommen wurde, daß die Synthese der Fettsäuren durch Umkehrung der Abbaureaktionen zustandekomme [30]. Ich wurde in dieser Annahme dadurch bestärkt, daß alle vier Reaktionsschritte des Fettsäure-Cyclus reversibel sind. Synthetische Versuche mit diesem System, von Stansly und Beinert [86] in Madison durchgeführt, lieferten jedoch nicht das erwartete Resultat.

Ich habe dann zusammen mit Seubert [87], angeregt durch Experimente Langdons [88], ein neues Enzym, weitverbreitet in tierischen Geweben und in der Hefe, aufgefunden, das Wasserstoff vom reduzierten Triphosphopyridinucleotid auf die CoA-Derivate α,β -ungeättigter Fettsäuren überträgt [Gleichung (5)] und von den am Fettsäureabbau beteiligten Acyl-CoA-Dehydrogenasen verschieden ist.



Durch Kombination dieses neuen Enzyms mit gereinigten Enzymen des Fettsäure-Cyclus und Hilfsenzymen zur Regeneration von reduziertem Diphospho- und Triphosphopyridinucleotid (Abb. 18) war es dann möglich, den Anbau von radioaktivem Acetyl-CoA an Capronyl-CoA zu erreichen unter Bildung von Fettsäuren mit 8, 10 und mehr Kohlenstoffatomen. Ob dieses System an der Synthese von Fettsäuren in Mitochondrien beteiligt ist, die alle für eine Synthese auf diesem Wege benötigten Enzyme enthalten, ist bisher noch nicht entschieden.

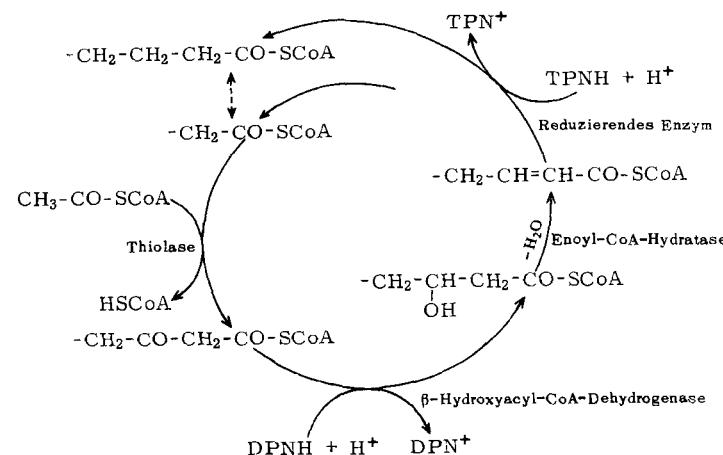
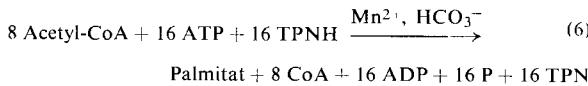


Abb. 18. Die Synthese der Fettsäuren durch Umkehrung der Abbaureaktionen.

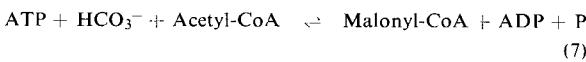
- [86] P. G. Stansly u. H. Beinert, Biochim. biophysica Acta 11, 600 (1953).
- [87] W. Seubert, G. Greull u. F. Lynen, Angew. Chem. 69, 359 (1957).
- [88] R. G. Langdon, J. Amer. chem. Soc. 77, 5190 (1955).

Der Hauptweg zur Biosynthese der Fettsäuren ist jedoch ein anderer. Zu seiner Aufklärung haben die Untersuchungen *Wakils* im Laboratorium von *Green* das Fundament gelegt. Er und seine Mitarbeiter isolierten aus Taubenleber zwei gereinigte Enzymfraktionen, die zur Synthese von Palmitinsäure aus Acetyl-CoA befähigt sind, jedoch zu dieser Synthese außer TPNH noch ATP ([89], vgl. auch [90]), Mn²⁺-Ionen und, was am meisten überraschte, Bicarbonat benötigen. Bemerkenswerterweise war der Bicarbonateffekt nicht auf den Einbau des CO₂ in die Fettsäureketten zurückzuführen. Radioaktiver Kohlenstoff aus zugesetztem CO₂ erschien nicht in der isolierten Palmitinsäure. Die Bilanzgleichung der Synthese gab *Wakils* Arbeitskreis [91] folgendermaßen an:



Eine weitere Besonderheit war der hohe Biotingehalt einer der beiden Proteinfraktionen, bei dem es sich um einen wesentlichen Bestandteil handeln mußte, weil die Fettsäuresynthese durch Avidin vollständig zu hemmen war [58]. Welche Funktion dieses zuerst entdeckte Biotinenzym hat und wie die Kohlensäure an der Fettsäuresynthese beteiligt ist, war aber in Madison zunächst noch unbekannt.

Als *Green* am 12. Juni 1958 über den Stand dieser Untersuchungen auf der Gordon Research Conference on Lipid Metabolism berichtete, trug ich in der Diskussion seines Vortrags die Hypothese vor, daß die Unentbehrlichkeit von ATP und Kohlensäure durch die intermediäre Bildung von Malonyl-CoA zu erklären sei (vgl. [22]). Malonyl-CoA könnte durch Carboxylierung aus Acetyl-CoA nach Gleichung (7) entstehen in Analogie zu den damals bereits eingehend untersuchten Carboxylierungen von β-Methylcrotonyl-CoA oder Propionyl-CoA.



Malonyl-CoA war von *Hayaishi* [92] als Zwischenprodukt der bakteriellen Decarboxylierung von Malonsäure sehr wahrscheinlich gemacht worden. Daß die gleiche Verbindung auch ein Zwischenprodukt der Fettsäuresynthese sein konnte, erschien mir aus chemischen Gründen sehr plausibel. Einmal, weil es einer chemischen Erfahrung entspricht, daß die Methylengruppe des Malonyl-CoA nucleophiler und zur Kondensation mit Thioestern besser geeignet sein sollte als die Methylgruppe des Acetyl-CoA. Außerdem konnte man voraussehen, daß bei der Kondensation mit Malonyl-CoA CO₂ abgespalten wird, was die Reaktion nach der Seite der gebildeten β-Ketosäure ziehen sollte.

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

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

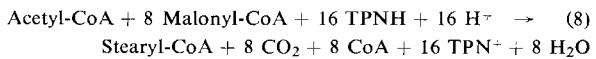
[91] S. J. Wakil, E. B. Titchener u. D. M. Gibson, Biochim. biophysica Acta 34, 227 (1959).

[92] O. Hayaishi, J. biol. Chemistry 215, 125 (1955).

Meine Hypothese ist dann auch binnen kurzem bestätigt worden. *Brady* [93], der an der Gordon-Konferenz teilnahm, *Wakil* [94] und auch mein Arbeitskreis [22] veröffentlichten in zeitlich kurzem Abstand Experimente, mit denen das Auftreten von Malonyl-CoA im Verlauf der Fettsäuresynthese sichergestellt wurde. *Wakil* [94] stellte fest, daß die biotinhaltige Enzymfraktion eine Acetyl-CoA-Carboxylase ist, was mit unseren Ergebnissen an der β-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase [22], wie berichtet, vorzüglich übereinstimmte.

Die zweite Enzymfraktion *Wakils* ist für die Umwandlung des Malonyl-CoA in die Fettsäuren verantwortlich, wobei außer TPNH als Reduktionsmittel auch noch Acetyl-CoA als „Starter“ der Synthesereaktion benötigt wird [95]. Seine beiden C-Atome werden am Methylen der synthetisierten Fettsäuren wiedergefunden, was nur so zu erklären ist, daß der Aufbau der Kohlenstoffketten durch sukzessiven Anbau von C₂-Einheiten aus Malonyl-CoA an Acetyl-CoA zustandekommt [96], vgl. [97]).

Einblick in die chemischen Details des Syntheseprozesses gewannen wir durch das Studium des reinen Enzyms aus Hefezellen, das sich vom tierischen Enzym im wesentlichen nur dadurch unterscheidet, daß als Syntheseprodukt keine freie Palmitinsäure, sondern ein Gemisch aus Palmityl- und Stearyl-CoA entsteht [96]. Die Synthese des Stearyl-CoA läßt sich durch Gleichung (8) beschreiben.



Rätselvoll an der Wirkung dieser „Fettsäure-Synthetase“ aus tierischen Organen oder aus Hefezellen war, daß die vom Studium des Fettsäureabbaus her bekannten Oxydationsprodukte, wie α,β-Dehydro-, β-Hydroxy- und β-Ketoacyl-CoA-Verbindungen keinesfalls Zwischenprodukte der Synthese sind. Der gereinigten Synthetase in physiologischen Konzentrationen zugefügt, werden sie nicht umgesetzt [95, 96].

Die Lösung des Rätsels brachte unsere Entdeckung, daß Sulfhydrylgruppen des Enzymproteins am Syntheseprozess beteiligt sind und die Zwischenprodukte, über welche die Kohlenstoffketten aufgebaut werden, kovalent an das Enzym gebunden sind [98, 99]. Daß mir dieser Einfall nach längerem ergebnislosen Experimentieren schließlich kam, war durch unsere Untersuchungen an der Thiolase oder der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase vorbereitet, die uns zur Annahme ähnlicher kovalenter Substrat-Enzym-Verbindungen geführt hatten. Nach unseren Versuchen am hochgereinigten Hefezym läßt sich die Fettsäuresynthese durch das in Abb. 19

[93] R. O. Brady, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 993 (1958).

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

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

[96] F. Lynen, I. Hopper-Kessel u. H. Eggerer, Biochem. Z. 340, 95 (1964).

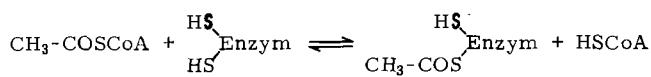
[97] P. R. Vagelos, Ann. Rev. Biochem. 33, 139 (1964).

[98] F. Lynen, S.-B. math.-naturwiss. Kl. bayer. Akad. Wiss. München, 4. März 1960.

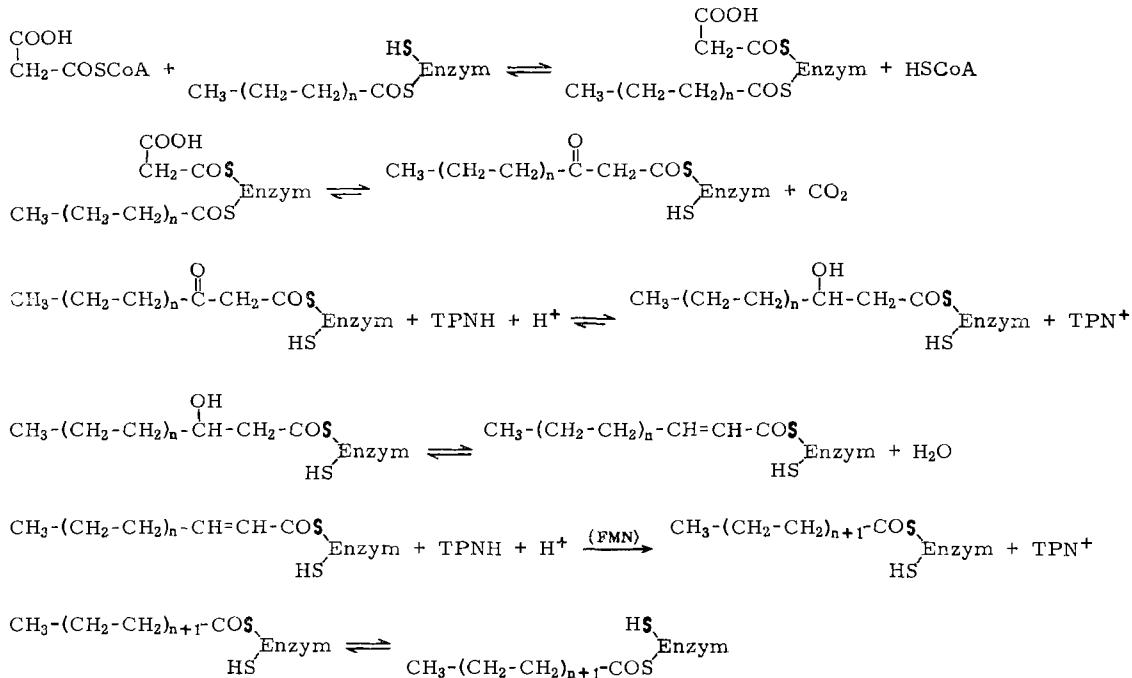
[99] F. Lynen, Federation Proc. 20, 941 (1961).

wiedergegebene Schema beschreiben [99–101]. Vorauszu schicken ist, daß mindestens zwei Arten von Sulfhydrylgruppen des Enzyms an den Reaktionen teilnehmen, die wir, nur um sie zu unterscheiden, vorerst als „zentrale“ und „periphere“ SH-Gruppen bezeichneten. Sie haben verschiedene Funktionen und sind in Abb. 19

Startreaktion



Kettenverlängerung



Abschlussreaktion

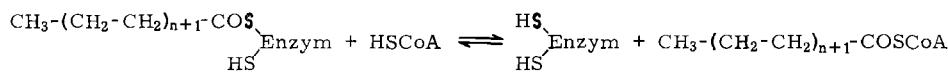


Abb. 19. Der Mechanismus der Fettsäuresynthese.

durch Fett- und Magerdruck voneinander abgegrenzt. Der Syntheseprozeß wird gestartet mit der Beladung des Enzyms mit Essigsäure und Malonsäure durch Übertragung der Säurereste vom Acetyl-CoA auf die „periphere“ Sulfhydrylgruppe und vom Malonyl-CoA auf die „zentrale“ Sulfhydrylgruppe. Es schließt sich die zur Verlängerung der Kohlenstoffkette führende und insofern als Kernstück der Synthese zu bewertende Kondensation unter Decarboxylierung an, was die Bildung des Acetacetyl-Enzyms thermodynamisch stark begünstigt. Auf die Bildung der Ketosäure folgt die schrittweise Umwandlung in die gesättigte Säure, wobei über die Reduktion durch TPNH zum α -Hydroxybutyryl-

[100] F. Lynen, Vortrag beim Symposium „Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen“, Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologische Chemie und der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft, Wien, 26.–29. September 1962.

[101] F. Lynen, in M. Sela: New Perspectives in Biology. Elsevier, Amsterdam 1964, S. 132.

Enzym, dessen Dehydratisierung zum Crotonyl-Enzym und eine abermalige Reduktion durch TPNH das gesättigte Butyryl-Enzym entsteht. Bei dieser zweiten Reduktion ist *Theorells* Flavinmononucleotid als wasserstoffübertragendes Coenzym beteiligt. Alle diese chemischen Umwandlungen vollziehen sich an Säureresten, die mit der „zentralen“ Sulfhydrylgruppe verbunden sind. Auf der Stufe des Butyryl-Enzyms wechselt der, verglichen mit Essigsäure, nun um eine C_2 -Einheit verlängerte Carbonsäurerest auf die „periphere“ SH-Gruppe über, wobei die „zentrale“ SH-Gruppe frei wird und einen neuen Malonylrest übernehmen kann.

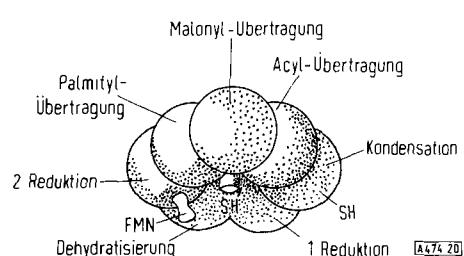


Abb. 20. Hypothetische Struktur des Multienzymkomplexes für die Fettsäure-Biosynthese.

oder sieben Enzymen bestehend vorstellen, die um die „zentrale“ SH-Gruppe gelagert sind (Abb. 20), und zwar so, daß die an der SH-Gruppe gebundenen Carbonsäuren nacheinander mit den einzelnen Enzymen in Kontakt treten können. Unsere Vorstellung wird in Abb. 21 am Beispiel der Reduktion der β -Ketosäure

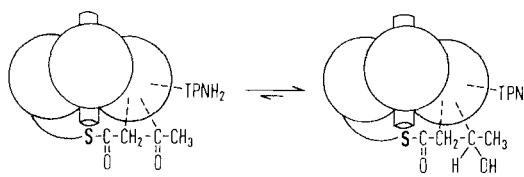


Abb. 21. Modell für die Reduktion der enzymgebundenen β -Ketosäuren durch TPNH.

zur β -Hydroxysäure noch einmal erklärt. Die Einzelheiten der Struktur des Enzymkomplexes sind weitgehend hypothetisch. So ist z. B. unentschieden, ob die zentrale Sulphydrylgruppe einem eigenen Strukturelement angehört, wie in Abb. 20 angenommen wurde, oder ob sie mit einer der Enzymkomponenten kovalent verbunden ist. Wir bevorzugen die erste Annahme, weil dann der Aufbau der Fettsäure-Synthetase aus Hefe dem des analogen Enzymsystems aus *Escherichia coli* entspräche, dessen Studium *Vagelos* und Mitarbeiter [97] in den letzten Jahren zu sehr schönen und unsere Arbeiten bestätigenden Erfolgen geführt hat. Der Multienzym-Komplex aus Hefe ist im Gegensatz zum Enzymsystem der Bakterien sehr stabil, und zur Aufspaltung in seine Komponenten bedarf es so drastischer Bedingungen, daß die Enzyme dabei größtenteils geschädigt werden. Bei der Fraktionierung des Hefeextrakts mit milden, die Enzymaktivität bewahrenden Methoden benimmt sich die Fettsäure-Synthetase wie ein einziges Teilchen, das im elektrischen Feld und in der analytischen Ultrazentrifuge einheitlich wandert und ein Molekulargewicht von etwa 2,3 Millionen besitzt. Das Ordnungsgefüge des Multienzym-Komplexes ist auch im Elektronenmikroskop sichtbar (Abb. 22). Die Aufnahme, die von Dr. *Hofschneider* [102] stammt läßt hohle, ovale, von einem Äquatorialring umgebene Teilchen erkennen. Der Längsdurchmesser der Teilchen beträgt etwa 250 Å, der Querdurchmesser etwa 210 Å. Die

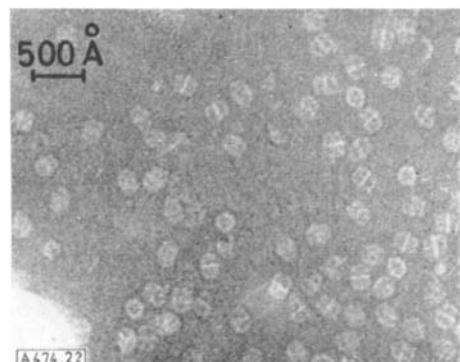


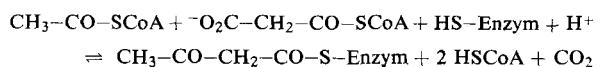
Abb. 22. Elektronenmikroskopisches Bild der gereinigten Fettsäure-Synthetase aus Hefe.

[102] A. Hagen u. P. H. Hofschneider: Proceedings of the Third European Regional Conference on Electron Microscopy. Czechoslovak Academy of Sciences, Prag 1964, Bd. B, S. 69.

elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur der Fettsäure-Synthetase läßt sich leider nicht in bisher bekannte Strukturschemata einordnen. Im Zusammenhang mit unseren chemischen Befunden ist ein Aufbau aus 3 ineinander verschachtelten Ringen möglich. Das würde zu der auch durch andere Befunde gestützten Annahme passen, daß in den Teilchen vom Molekulargewicht 2,3 Millionen drei funktionell komplett Enzymsätze für die Fettsäuresynthese vorliegen.

Ich muß es mir versagen, auf die vielen Experimente einzugehen, mit denen ich in Zusammenarbeit mit *Duba*, *Eggerer*, *Hagen*, *Kessel*, *Kirschner*, *Lorch* und *Schweizer* die chemischen Einzelheiten der Fettsäuresynthese aufklären konnte. Einmal erwies sich der Einsatz der gleichen Modellsubstrate wie beim Studium der Enzyme des Fettsäureaobaus wiederum als überaus nützlich. In anderen Experimenten setzten wir die gereinigte Fettsäure-Synthetase als Substrat ein und konnten dann durch stöchiometrischen Umsatz mit Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, und eventuell auch TPNH die natürlichen Zwischenprodukte, wie Acetyl-Enzym, Malonyl-Enzym, Acetacetyl-Enzym und D-(–)- β -Hydroxybutyryl-Enzym fassen.

Zusammen mit *Oesterhelt* habe ich mich in den letzten Monaten darum bemüht, die Gleichgewichtskonstante der Bildung des Acetacetyl-Enzyms aus Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Enzym nach Gleichung (9) zu messen, weil das Studium dieser Reaktion das Tor zur Aufklärung der Fettsäuresynthese geöffnet hat.



Die Resultate unserer Messungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Wir fanden als Mittelwert $K_{eq} = 1,95 \times 10^5$.

Tabelle 3. Gleichgewichtskonstante für die Kondensation von Acetyl-CoA (Ac-CoA) mit Malonyl-CoA (Mal-CoA) zu Acetacetyl-Enzym (AcAc-Enzym) nach Gleichung (9).

HS-CoA μM	CO ₂ μM	AcAc- Enzym μM	Mal-CoA μM	Ac-CoA μM	HS- Enzym μM	H ⁺ μM	K _{eq} × 10 ⁵
187,5	3390	2,120	59,2	52,7	2,420	0,316	1,06
187,0	10080	1,815	59,7	53,0	2,725	0,316	2,50
186,8	17000	1,425	60,0	53,3	3,115	0,316	2,62
186,3	23800	1,115	60,3	53,7	3,425	0,316	2,62
120,0	3660	1,295	58,7	65,3	0,425	0,316	1,33
220,0	3660	0,880	59,1	65,7	0,840	0,316	1,51
376,0	3660	0,510	59,5	66,1	1,210	0,316	1,75
553,0	3660	0,324	59,7	66,3	1,396	0,316	2,08
720,0	3660	0,222	59,8	66,4	1,498	0,316	2,12
220,0	3660	1,025	59,0	65,6	0,695	0,316	2,14
220,0	3660	1,220	118,8	65,4	0,500	0,316	1,77

Beim Vergleich des Wertes für die Gleichgewichtskonstante der Kondensation mit Malonyl-CoA:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Acetacetyl-Enzym}] [\text{CoA}]^2 [\text{CO}_2]}{[\text{Acetyl-CoA}] [\text{Malonyl-CoA}] [\text{Enzym}] [\text{H}^+]} = 1,95 \times 10^5 \text{ (0 } ^\circ\text{C)}$$

mit dem Wert für die Gleichgewichtskonstante der Kondensation mit Acetyl-CoA, die ebenfalls einen Thioester der Acetessigsäure liefert:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Acetacetyl-CoA}][\text{CoA}]}{[\text{Acetyl-CoA}]^2} = 1,6 \times 10^{-5} \text{ (25 }^{\circ}\text{C, pH = 7,0)}$$

wird der große Vorteil ersichtlich, der sich durch Verwendung von Malonyl-CoA zum Aufbau von Kohlenstoffketten ergibt. Die belebte Natur nützt diesen Vorteil außer beim Aufbau der Fettsäuren auch bei der Biosynthese der vielen anderen, unter die Polyacetat-Regel von *Birch* [103] fallenden Naturstoffe aus [101]. Berücksichtigt man, daß auch die Kondensation mit Malonyl-CoA letzten Endes nur zum Einbau des Acetylrestes führt, so könnte man den großen Vorzügen dieses Bausteins bei Biosynthesen mit der Bezeichnung „aktiviert aktivierte Essigsäure“ gut Rechnung tragen.

Die wichtige Frage, warum der Fettsäureaufbau am Multienzym-Komplex auf der Stufe von Palmitin- oder Stearinäure, aber nicht vorher oder nachher, abbricht, ist noch ein Rätsel. Dagegen läßt sich die Frage nach den Vorteilen, die sich beim Ablauf einer aus vielen Schritten bestehenden Synthesekette an einem Multienzym-Komplex ergeben, leicht beantworten. In kinetischer Hinsicht muß ein solcher Prozeß analogen Prozessen, die von getrennten Enzymen katalysiert werden, überlegen sein, da die Diffusionswege der Substrate durch die kovalente Bindung an den Komplex auf ein Minimum beschränkt sind. Aus dem gleichen Grund sind die lokalen Substratkonzentrationen im Multienzym-Komplex hoch, so daß auch die Bildung der Michaelis-Verbindungen zwischen den verschiedenen Substraten und den zugehörigen Teilenzymen begünstigt wird. Von großer physiologischer Bedeutung dürfte sein, daß Störungen des Syntheseprozesses durch fremde Enzyme, wie etwa durch die Enzyme des Fettsäureabbaus, unterbunden sind. In dieser Hinsicht kann man von einer Kompartimentierung biochemischer Reaktionen auf kleinstem Raum sprechen. Durch diese räumliche Scheidung von Fettsäureaufbau und Fettsäureabbau gewinnt die Zelle die Möglichkeit, beide Prozesse getrennt ablaufen zu lassen und, was noch wichtiger ist, auch unabhängig voneinander zu regulieren. Das ist eine große Leistung, da ja bei beiden Prozessen, abgesehen vom stereochemischen Unterschied bei den β -Hydroxysäuren, die gleichen Zwischenstufen durchlaufen werden. Man wird dem Multienzym-Komplex der Fettsäure-Synthetase am besten gerecht, wenn man ihn mit den Montagehallen der Technik vergleicht. In beiden Fällen werden die von außen zugeführten Einzelteile oder Bausteine Stück für Stück zusammengefügt und umgemodelt und erst in Form des fertigen Endprodukts aus der Fabrikationsstätte entlassen.

Zur biologischen Regulation der Fettsäuresynthese

Wie steht es nun bei der Fettsäuresynthese mit der Zulieferung des Bausteins Malonyl-CoA? Wir haben bereits erfahren, daß es durch Carboxylierung aus Acetyl-CoA entsteht unter Beteiligung eines spezifischen Biotinenzymes und von ATP als Energiequelle [Gleichung (7)].

[103] *A. J. Birch*, in *L. Zechmeister*: *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*. Springer-Verlag, Wien 1957, Bd. 14. S.186.

Der Syntheseprozeß wird also auch beim Aufbau der Fettsäuren durch die Spaltung von ATP angetrieben. ATP ermöglicht die Fixierung der Kohlensäure am Acetyl-CoA, die dann bei der Verlängerung der Kohlenstoffkette unter Anbau des C_2 -Bausteins wieder ausgestoßen wird.

Eine Eigentümlichkeit der tierischen Acetyl-CoA-Carboxylase ist der Bedarf an Citronensäure zur Ausbildung voller Aktivität [104–106]. Beim eingehenden Studium ergab sich, daß das Aktivierungsphänomen in den Bereich der sogenannten „allosterischen Effekte“ [107] fällt und mit der Aggregation mehrerer Enzym-Moleküle zu einer Übereinheit von mehr als 2 Millionen Molekulargewicht zusammenhängt [106, 108]. Die Erklärung der Steuerung des Stoffwechsels in den Organismen durch allosterische Effekte gewinnt heute zunehmend an Bedeutung. Im Falle der Acetyl-CoA-Carboxylase ist die Citrat-Aktivierung allein anscheinend nur von untergeordneter Bedeutung. Sie wird aber dadurch entscheidend, daß ihr in den CoA-Verbindungen höherer Fettsäuren, wie Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure, mächtige Gegenspieler gegenüberstehen. In Zusammenarbeit mit *Bortz* und *Numa* [108] wurde gefunden, daß solche Coenzym-A-Derivate die Acetyl-CoA-Carboxylase schon in minimalen Konzentrationen hemmen, und zwar durch Konkurrenz mit Citrat. In Gegenwart von Palmityl-CoA bleiben die Aktivierung der Enzymwirkung und die Aggregation des Proteins aus.

Diese Befunde tragen zum Verständnis der biologischen Steuerung der Fettsäuresynthese im tierischen Organismus sehr wesentlich bei. Die Carboxylierungsreaktion ist dort der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt [109, 110], woraus folgt, daß sich jede Beeinflussung der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität in der Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese widerspiegelt. Nun ist seit langem bekannt (vgl. [101]), daß im Stadium des Hungers oder der Zuckerkrankheit die Fettsäuresynthese praktisch vollständig darniederliegt, aber gleichzeitig der Fettsäurespiegel im Blut erhöht ist, infolge der Mobilisierung der Fettdepots. Auch beim normalen Tier führt fettreiche Ernährung zu einer drastischen Hemmung der Fettsäuresynthese. Das daraus abgeleitete Konzept einer homöostatischen Kontrolle des Syntheseprozesses kann durch unsere Befunde an der gereinigten Acetyl-CoA-Carboxylase erklärt werden. Nach Versuchen an Hungerratten und an diabetischen Tieren ist der Spiegel an Fettsäure-CoA-Derivaten in der Leber gegenüber der Norm wesentlich erhöht [111, 112]. Das

- [104] *M. Matsuhashi, S. Matsuhashi u. F. Lynen*, Biochem. Z. 340, 263 (1964).
- [105] *M. Waite u. S. J. Wakil*, J. biol. Chemistry 237, 2750 (1962).
- [106] *P. R. Vagelos, A. W. Alberts u. D. B. Martin*, J. biol. Chemistry 238, 533 (1963).
- [107] *J. Monod u. F. Jacob*, Cold Spring Harbor Symposia Quantitat. Biol. 26, 389 (1961).
- [108] *S. Numa, W. M. Bortz u. F. Lynen*, in *G. Weber*: *Advances in Enzyme Regulation*. Pergamon Press, London 1965, Bd. 3, S. 407.
- [109] *J. Ganguly*, Biochim. biophysica Acta 40, 110 (1960).
- [110] *S. Numa, M. Matsuhashi u. F. Lynen*, Biochem. Z. 334, 203 (1961).
- [111] *W. M. Bortz u. F. Lynen*, Biochem. Z. 339, 77 (1963).
- [112] *P. K. Tubbs u. P. B. Garland*, Biochem. J. 93, 550 (1964).

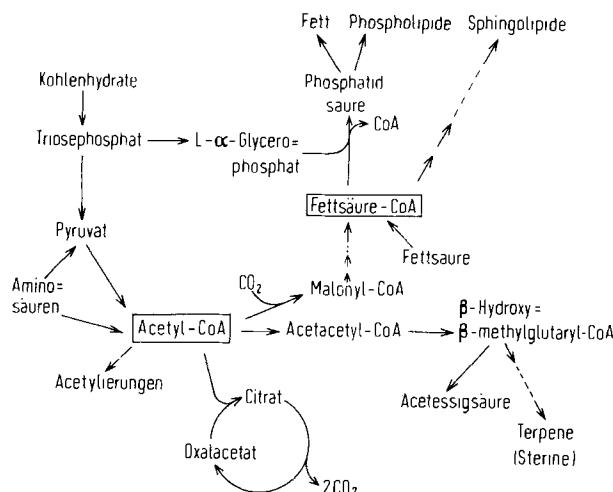


Abb. 23. Schema der Lipogenese.

muß, wie ein Blick auf das Schema der Lipogenese (Abb. 23) zeigt, zu einer sehr sinnvollen Regulierung der Fettsäuresynthese führen. Die als Inhibitoren wirkenden Fettsäure-Coenzym-A-Verbindungen sind ja die letzten Glieder in der Synthesekette, von wo aus der Einbau in die komplexen Lipide erfolgt. Reichern sich die Fettsäure-CoA-Verbindungen in den fettbildenden Geweben an, so wird in der Acetyl-CoA-Carboxylase gerade dasjenige Enzym gehemmt, unter dessen Wirkung die Reaktionsfolge der Fettsäuresynthese von den übrigen Umsetzungen der „aktivierten Essigsäure“ abzweigt. Wir treffen somit beim Fettsäureaufbau erneut auf das Phänomen der „Endprodukt-Hemmung“ [113],

[113] H. E. Umbarger, Cold Spring Harbor Symposia Quantitat. Biol. 26, 301 (1961).

deren große Bedeutung in den letzten Jahren beim Studium vieler Biosynthesen erkannt wurde und die zur Ökonomie der Lebensvorgänge entscheidend beiträgt. Denn eine Erhöhung des intrazellulären Spiegels der Fettsäure-CoA-Verbindungen ist das Zeichen dafür, daß der Bedarf für den Aufbau komplexer Lipide wie der Neutralfette, der Phospholipide, der Sphingolipide usw. gedeckt ist. Unter diesen Umständen wäre es eine Verschwendug, würde weiteres Acetyl-CoA auf den Weg dieser Biosynthese geleitet.

Im vergangenen Jahr wurde auch über eine Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch freie Fettsäuren berichtet [114, 115]. In unseren Versuchen am gereinigten Enzym waren sie aber als Hemmstoffe den entsprechenden Coenzym-A-Derivaten gegenüber deutlich unterlegen [108].

Die praktische Bedeutung unserer Beobachtungen liegt auf der Hand. Wenn es gelingt, Stoffe zu finden, die gleich den Fettsäure-Coenzym-A-Verbindungen die Acetyl-CoA-Carboxylase hemmen, aber im Gegensatz zu ihnen nicht in die Neutralfette oder Phosphatide eingebaut werden, dann müßte es gelingen, die Fettsäuresynthese medikamentös zu beeinflussen. Hier sehe ich Ansatzpunkte zu einer gezielten Therapie der Kreislaufkrankheiten, was zur Bedeutung der Grundlagenforschungen beiträgt, für die mir vom Königlichen Karolinischen Institut die höchste wissenschaftliche Auszeichnung verliehen wurde. Ich teile sie mit vielen tüchtigen Mitarbeitern, die kürzere oder längere Strecken des Weges mit mir gewandert sind.

Eingegangen am 14. Juni 1965 [A 474]

[114] H. R. Levy, Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 267 (1963).

[115] Y. Yugari, T. Matsuda u. M. Suda: VI. Internat. Congr. Biochem., New York 1964, Abstr. S. 602.

Die Biosynthese des Cholesterins

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1964 [*]

VON PROF. DR. KONRAD BLOCH

JAMES BRYANT CONANT LABORATORY, HARVARD UNIVERSITY,

CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS (USA)

In den frühen dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts fand eines der hervorragendsten Kapitel der organischen Chemie mit der Strukturaufklärung des Cholesterins nach jahrzehntelangen Bemühungen seinen Abschluß. Aber nun wurde die Frage nach der Biosynthese des Cholesterins für den Chemiker und den Biochemiker zu einer außergewöhnlichen Herausforderung, denn es war nicht zu erkennen – wenigstens nicht auf den ersten Blick – wie dieses komplizierte Molekül aus den einfacheren, in der Zelle verfügbaren Bausteinen ent-

stehten sollte. Um so bemerkenswerter ist es, daß viele der anfänglichen Spekulationen den Prinzipien, nach denen die Biosynthese des Cholesterins verläuft, recht nahe kamen. Das Hauptproblem war die Bildung des tetracyclischen Systems, und so ziemlich alle frühen Hypothesen stimmten darin überein, daß ein entsprechend gefaltetes offenkettiges Molekül die Vorstufe sein müsse, was sich später als richtig erwies. Alle diese frühen Annahmen haben die auf sie folgenden experimentellen Arbeiten in irgendeiner Weise beeinflußt, keine aber so sehr wie L. Ruzickas Hypothese vom einheitlichen Ursprung der Terpene und Steroide und wie R. Robinsons Vorschlag, Cholesterin könnte sich durch

[*] © 1965. The Nobel Foundation. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.