

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.

Cyclisierung des Kohlenwasserstoffs Squalen bilden. Diese kühnen und faszinierenden Ideen waren um so gewichtiger, als es einige experimentelle Befunde gab, die ihnen entsprachen. So hatte *Shannon* – nach einem Vorschlag von *Heilbron, Kamm* und *Owens* [1] – schon 1926 gezeigt, daß Squalen im Tierfutter den Cholesteringehalt der Gewebe erhöht [2].

Zusammenhängende Untersuchungen über die Biosynthese des Cholesterins begannen 1937 mit zwei unabhängigen Arbeiten, die einander aber in bemerkenswerter Weise ergänzten: *Rittenberg* und *Schoenheimer* an der Columbia-Universität untersuchten Stoffwechselreaktionen mit Hilfe stabiler Isotope und kamen im Verlauf dieser grundlegenden Forschungen zu dem Ergebnis, daß das Cholesterin aus kleineren Molekülen entstehen müsse, möglicherweise den gleichen, die auch im Fett- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel eine Rolle spielen [3]. Im gleichen Jahr beobachteten *Sonderhoff* und *Thomas* den Einbau von Trideuterioacetat in die unverseifbaren Inhaltsstoffe von Hefezellen und schrieben: „es läßt sich darauf schließen, daß die Sterine der Hefe auf einem recht unmittelbaren Wege aus der Essigsäure entstehen“ [4].

Als Student unter *Hans T. Clarke* an der Columbia-Universität und später als Assistent von *R. Schoenheimer* lernte ich das neue und leistungsfähige Verfahren der Isotopenmarkierung kennen und hatte teil an der Faszination, die von seiner Anwendung zur Lösung biosynthetischer Probleme ausging, denn dieses Gebiet des Stoffwechsels war vorher unzugänglich gewesen. *Schoenheimer*, Pathologe und Biochemiker, hatte sich seit langem mit dem Ursprung und dem Stoffwechsel des Cholesterins beschäftigt und plante, dieser Frage auf den Grund zu gehen, als der Tod 1941 seiner ungewöhnlichen Karriere ein vorzeitiges Ende setzte. *Rittenberg* und ich nahmen die vorhandenen Fäden auf und begannen, die Verwendung markierter Essigsäure zur Biosynthese des Cholesterins im tierischen Gewebe systematisch zu studieren. Wir konnten bald zeigen, daß Essigsäure eine Vorstufe sowohl für die aliphatische Seitenkette als auch für das tetracyclische Gerüst des Sterinmoleküls ist [5, 6]. Nach meiner Übersiedlung an die Universität von Chicago setzte ich diese Untersuchungen fort mit dem Ziel, den Ursprung aller Kohlenstoffatome des Cholesterins kennenzulernen, und in der Hoffnung, daß sich aus dem Verteilungsmuster Schlüsse auf den Biosyntheseweg ziehen lassen würden. Die C-Atome der Isooctyl-Seitenkette sowie die angularen Methylgruppen waren durch chemischen Abbau verhältnismäßig leicht zu isolieren und konnten auf ihren Isotopengehalt analysiert werden. Mit der Information für diese wenigen Kohlenstoffatome in Händen (vgl. Schema 1) wagten wir die Annahme, daß ein aus zwei C-Atomen bestehendes Stoffwechselprodukt der

[1] I. M. Heilbron, E. D. Kamm u. W. M. Owens, J. chem. Soc. (London) 1926, 1630.

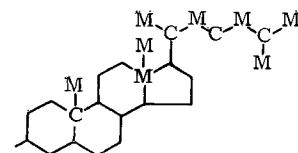
[2] H. J. Channon, Biochem. J. 20, 400 (1926).

[3] D. Rittenberg u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 121, 235 (1937).

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

[5] K. Bloch u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 145, 625 (1942).

[6] K. Bloch u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 159, 45 (1945).



Schema 1. Bildung einzelner Kohlenstoffatome des Cholesterins aus Methylgruppe (M) und Carboxylgruppe (C) der Essigsäure [10].

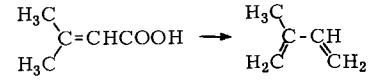
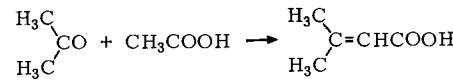
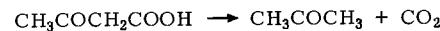
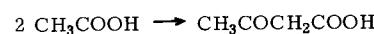
Essigsäure der wichtigste, wenn nicht sogar der einzige Baustein des Cholesterins ist [7].

Unsere Argumente waren weitgehend deduktiv, und wir suchten daher nach überzeugenderen Indizien für die ausschließliche Bildung des Sterinmoleküls aus Acetat. Eine Mutante von *Neurospora crassa*, die *E. L. Tatum* isoliert hatte, eignete sich für diesen Zweck vorzüglich, denn eine Störung im Pyruvatstoffwechsel machte das Wachstum dieser Mutante von exogenem Acetat abhängig. Züchtete man die Mutante auf markiertem Acetat, so synthetisierte sie Ergosterin praktisch ohne Verdünnung des Isotops, und das bewies, daß so gut wie keine andere Kohlenstoffquelle zur Bildung des Steringerüstes beitrug [8].

Man mag fragen, warum die Mutantentechnik, die so viel zur Aufklärung von Biosynthesewegen beigetragen hat, beim Studium der Cholesterinsynthese nicht öfter angewendet worden ist. Vielleicht hat man es versucht, dann aber offenbar ohne Erfolg. Hefe- oder Pilzmutanten, die kein Sterin enthalten, sind nie beschrieben worden, und die Suche nach entsprechenden bakteriellen Mutanten wäre nutzlos gewesen, denn das bakterielle Phylum vermag Sterine nicht zu synthetisieren. Trotzdem haben bakterielle Mutanten – wenn auch unvorhergesehen – bei der Entdeckung einer wichtigen Sterinvorstufe eine wesentliche Rolle gespielt.

Unsere Überlegungen, welche Möglichkeiten zum Aufbau großer Moleküle aus Acetat-Einheiten bestünden, wurden stark beeinflußt durch Untersuchungen über die Kautschuk-Biosynthese: *Bonner* und *Arreguin* hatten gezeigt, daß auch dieses Isopren-Polymer aus Acetat entsteht, und sie vermuteten, daß drei Moleküle Acetat über Acetacetat und  $\beta$ -Methylcrotonsäure zum isoprenoiden Baustein dieses Makromoleküls zusammengetreten (vgl. Schema 2) [9].

Mit der Annahme, daß dieses Reaktionsschema auch für die Cholesterinbildung zutrifft, konnten wir für



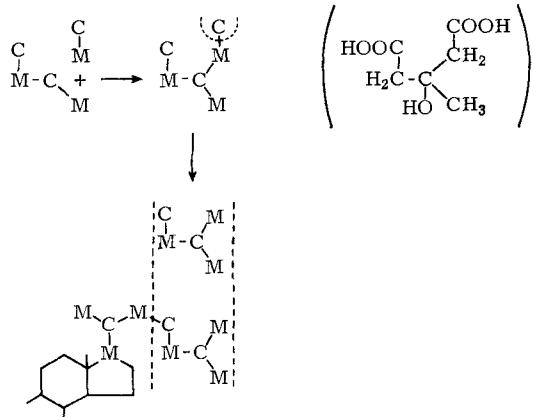
Schema 2. Für die Bildung von Isopren aus Essigsäure vorgeschlagene Reaktionsfolge [9].

[7] H. N. Little u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 183, 33 (1950).

[8] R. C. Ottke, E. L. Tatum, I. Zabin u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 189, 429 (1951).

[9] J. Bonner u. B. Arreguin, Arch. Biochem. Biophysics 21, 109 (1949).

Teile des Cholesterinmoleküls voraussagen, wo sich die aus der Methyl- und Carboxylgruppe der Essigsäure stammenden Isotope befinden sollten. Für die Isooctyl-Seitenkette des Cholesterins ließ sich das Verteilungsmuster experimentell prüfen [10]. Hier stimmten Voraussage und Experiment befriedigend überein (vgl. Schema 3), und so entwickelte sich die Vorstellung, daß das Cholesterin wie viele andere Naturstoffe aus einer polyisoprenoiden Vorstufe hervorgehen müsse.



**Schema 3.** Vorausgesagte (oben) und beobachtete (unten) Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome ( $M = \text{Methylgruppe}$ ,  $C = \text{Carboxylgruppe}$ ) in der Seitenkette des Cholesterins.

Den Grund für diese Vorstellung hatte freilich *Robinsons* Hypothese bereitet, nach der Cholesterin durch Cyclisierung von Squalen, einem polyisoprenoiden Kohlenwasserstoff, entsteht [10a, 11]. So bot sich in Umrissen folgendes Bild: Acetat → isoprenoides Zwischenprodukt → Squalen → Cyclisierungsprodukt → Cholesterin.

Um diese allgemeine Hypothese zu bestätigen, versuchte ich, im Haifisch die Bildung von Squalen aus markiertem Acetat nachzuweisen, denn dieses Tier akkumulierte diesen Kohlenwasserstoff aus bisher unbekannten Gründen in großen Mengen. Dieses Unternehmen verlangte einen Ausflug in die vergleichende Biochemie, und dafür wählte ich die biologische Station in Bermuda. Experimente mit Haifischen oder mit der sehr lipoidreichen Haifischleber erwiesen sich aber als außerordentlich schwierig, und ich erreichte das gesteckte Ziel nicht. Glücklicherweise aber hatte *R. G. Langdon* im Chicagoer Laboratorium mit dem realistischeren Studium der Squalensynthese in Rattenleber Erfolg [13]. Er gewann markiertes Squalen, das sich dann am ganzen Tier leicht als Vorstufe des Cholesterins erwies [14]. Erst viel später (1958) gelang ein strenger Beweis der Squalen-Cholesterin-Umwandlung mit authentischem, chemisch synthetisiertem [ $^{13}\text{C}$ ]-all-trans-Squalen [15].

[10] J. Wuersch, R. L. Huang u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 195, 439 (1952.)

[10a] Ruzicka hat darauf hingewiesen [12], daß eine mögliche Beziehung zwischen Triterpenen und Sterinen in seinem Laboratorium schon 1925 diskutiert wurde: „Man kann die Hypothese aufstellen, daß die Steroide und die Triterpene wenigstens teilweise einen gemeinsamen Ursprung haben“. (E. A. Rudolph, Dissertation, ETH Zürich 1925.)

[11] R. Robinson, Chem. and Ind. 53, 1062 (1934).

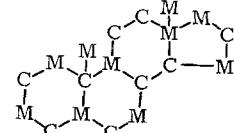
[12] L. Ruzicka, Experientia 9, 357 (1953).

[13] R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 129 (1952).

[14] R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 135 (1952).

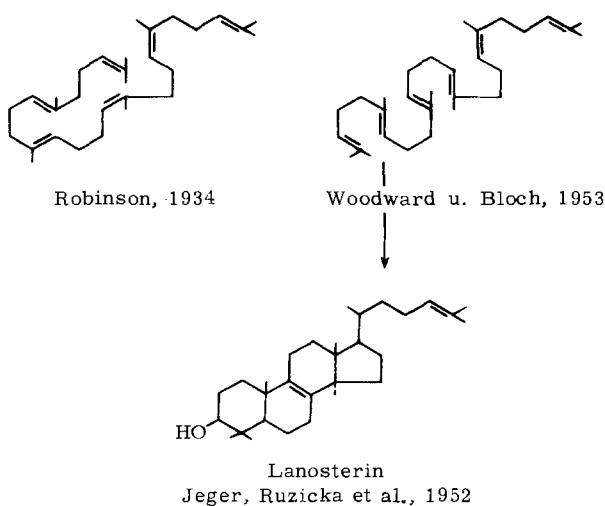
[14] R. K. Maudgal, T. T. Tchen, N. F. Hsu, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 2471 (1955).  
[15] R. K. Maudgal, T. T. Tchen u. K. Bloch, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2589 (1958).

Diese Ergebnisse ließen keinen Zweifel an der Schlüsselstellung des Squalens in der Cholesterin-Biosynthese. Ob sich aber die Kohlenwasserstoffkette tatsächlich in der von *Robinson* vermuteten Weise faltete, ließ sich noch nicht entscheiden. Dazu war zu prüfen, ob die Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome auf die Positionen des tetracyclischen Steringerüstes ebenso mit der Voraussage übereinstimmte, wie dies für die Seitenkette der Fall war. Das aber verlangte den chemisch schwierigen, vollständigen Abbau – Kohlenstoffatom für Kohlenstoffatom – des Cholesterins, eine Aufgabe, die *Cornforth* und *Popják* zwischen 1953 und 1957 [16–18] auf elegante und endgültige Weise lösten. Das Ergebnis zeigt Schema 4.



**Schema 4.** Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome ( $M =$  Methylgruppe,  $C =$  Carboxylgruppe) im tetracyclischen Gerüst des Cholesterins [16-18].

Mittlerweile hatte es sich aus mehreren Gründen als notwendig erwiesen, *Robinsons* Hypothese genauer zu prüfen. Vom Lanosterin, dem Sterin aus dem Wolfett, wußte man seit einiger Zeit, daß es in sich strukturelle Eigenheiten sowohl der Sterine als auch der pentacyclischen Triterpene vereinigt, aber erst 1952 konnten *Ruzicka, Jeger et al.* [19] eindeutig zeigen, daß Lanosterin die Struktur des 4,4,14-Trimethylcholestans hat. Ich hörte von dieser Entwicklung im Herbst 1952 nach einem Vortrag im chemischen Institut der Harvard Universität. In der Diskussion, die sich diesem Vortrag anschloß und an der sich auch Professor *E. R. H. Jones* beteiligte, schlug Professor *R. B. Woodward* mit eindringlichen Argumenten eine neue Art der Squalen-Faltung vor (Schema 5).



### **Schema 5. Hypothesen der Squalen-Faltung und die Beziehung zwischen Squalen und Lanosterin.**

[16] J. W. Cornforth, G. D. Hunter u. G. Popják, Biochem. J. 54, 590 (1953).

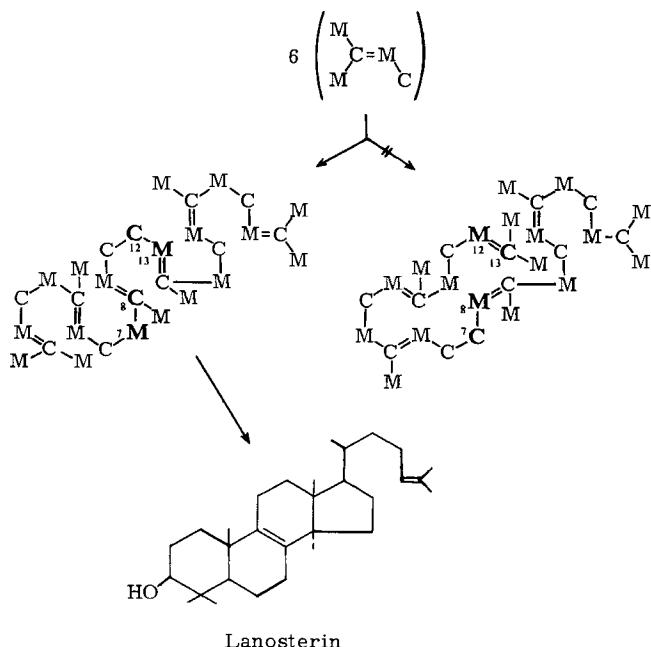
[17] J. W. Cornforth, G. D. Hunter u. G. Popják, Biochem. J. 54, 597 (1953).

[18] J. W. Cornforth, I. Y. Gore u. G. Popják, Biochem. J. 65, 94

(1957).

[19] W. Voser, M. W. Mijovic, H. Heusser, O. Jeger u. L. Ruzicka, Helv. chim. Acta 35, 2414 (1952).

Der besondere Wert dieses Vorschlags bestand darin, daß er die Struktur des Lanosterins systematisch ableiten konnte. Darüber hinaus setzte er das Lanosterin in der Biosynthesekette zwischen Squalen und Cholesterin. Eine wichtige Folgerung aus der von Woodward postulierten Cyclisierung war unmittelbar zu prüfen: Die Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome im Cholesteringerüst mußte sich an vier von insgesamt 27 Positionen (an C-7, C-8, C-12 und C-13) von der aus Robinsons Cyclisierungsschema abgeleiteten Verteilung unterscheiden (Schema 6).



Schema 6. Verteilung der Acetat-Kohlenstoffatome nach dem Cyclisierungsschema von Woodward und Bloch (links) und Robinson (rechts). Positionen, an denen sich die Verteilungen unterscheiden, sind fett gedruckt.

Nach Chicago zurückgekehrt vermochte ich zu zeigen, daß C-13 des Cholesterins aus einer Acetat-Methylgruppe hervorgeht, was mit Woodward's Hypothese übereinstimmte. Dieses willkommene Ergebnis ermutigte uns, das neue und sehr viel plausiblere Schema für die Cyclisierung des Squalens zu akzeptieren [20]. Dauben et al. [21] schlugen kurz darauf unabhängig ein ähnliches Schema vor. Später ließ sich auch der „richtige“ Ursprung von C-7, einem der vier kritischen C-Atome, nachweisen [21a, 22], und schließlich konnten Cornforth und Popják im Verlauf ihrer Arbeiten über den vollständigen Abbau des Cholesteringerüstes die Herkunft der C-Atome 8 und 12 klären. Die gleichen Forscher gaben dem noch vagen und spekulativen Bild dann einige kräftige Striche, indem sie zeigten, daß aus methyl-markiertem Acetat gewonnenes Squalen die

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

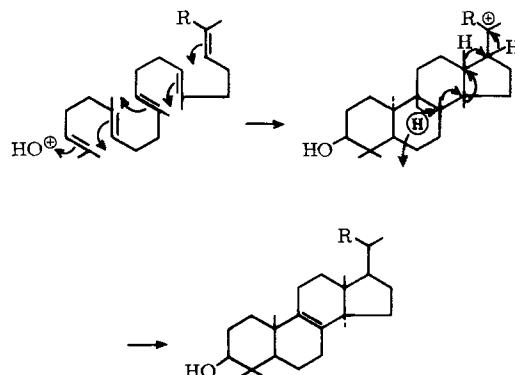
[21] W. G. Dauben, S. Abraham, S. Hotta, I. L. Chaikoff, H. L. Bradlow u. A. H. Soloway, J. Amer. chem. Soc. 75, 3038 (1953).

[21a] Ich machte diese Beobachtung während eines Urlaubsjahres (1953) an der ETH Zürich. Dieser Aufenthalt brachte viele anregende Diskussionen mit den Professoren Ruzicka, Prelog, Jeger und ihren Mitarbeitern. Ihr Wissen und ihr Rat waren für den Fortschritt unserer Untersuchungen von großem Wert.

[22] K. Bloch, Helv. chim. Acta 36, 1611 (1953).

Isotope tatsächlich in der Anordnung enthält, die sich aus Woodward's Hypothese ergibt [23]. Der wichtige Nachweis, daß Lanosterin aus Squalen [24] und Cholesterin aus Lanosterin entsteht [25], kam bald danach. Die Leberhomogenate, die wir für diese Versuche benötigten, stellten wir nach der Vorschrift von N. L. R. Bucher [26] her, und diese Technik erwies sich auch für alle weiteren Untersuchungen über die Sterin-Biogenese als außerordentlich nützlich.

1953 veröffentlichten Ruzicka et al. die erste von zwei Arbeiten über den Ursprung der Terpene und Sterine und über die biogenetischen Beziehungen, die sich aus den verschiedenen Strukturen ableiten ließen. Zahlreiche Naturstoffe – einige deutlich, andere weniger deutlich miteinander verwandt – kamen hier in einen plausiblen Zusammenhang und erschienen als Zweige eines einzigen biogenetischen Stammbaumes [12]. Diese Anschauungen wurden in einer 1955 erschienenen Arbeit [27] weiterentwickelt, die Cornforth [28] sehr treffend „die Apotheose der Isoprenregel“ genannt hat. Die hier vorgebrachten stereochemischen Argumente gestatteten unter anderem eine verfeinerte Formulierung des Mechanismus, nach dem Squalen zum Lanosterin cyclisiert (Schema 7).



Schema 7. Mechanismus der Cyclisierung von Squalen zu Lanosterin [12, 27].

Drei Postulate dieser Formulierung interessierten uns vor allem: 1. Die Cyclisierung beginnt mit dem Angriff eines formalen  $\text{OH}^+$ -Kations an dem C-Atom des Squalens, das später als C-3 des Steringerüstes erscheint. 2. Die Cyclisierung ergibt sich durch Wechselwirkungen zwischen elektrophilen Zentren und den Elektronen geeignet angeordneter Doppelbindungen. Diese Wechselwirkungen führen direkt, d. h. ohne ein stabiles Zwischenprodukt, zum Lanosterin. 3. Sobald sich das tetracyclische System gebildet hat, wandern in einer synchronen Umlagerung zwei Wasserstoffatome und zwei Methylgruppen an benachbarte Kohlenstoffatome, womit die Lanosterinbildung abgeschlossen ist.

Wir prüften diese Postulate experimentell und erhielten in jedem Fall Ergebnisse, die mit der Theorie im Ein-

[23] J. W. Cornforth u. G. Popják, Biochem. J. 58, 403 (1954).

[24] T. T. Tchen u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 77, 6085 (1955).

[25] R. B. Clayton u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 218, 319 (1956).

[26] N. L. R. Bucher, J. Amer. chem. Soc. 75, 498 (1953).

[27] A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger u. D. Arigoni, Helv. chim. Acta 38, 1890 (1955).

[28] J. W. Cornforth, Rev. pure appl. Chem. 4, 275 (1955).

klang standen. T. T. Tchen fand, daß die OH-Gruppe an C-3 des Cholesterins aus molekularem Sauerstoff, dem formalen Äquivalent des OH<sup>+</sup>-Kations, entsteht und nicht aus dem Wasser stammt. Darüber hinaus konnte er zeigen, daß bei der enzymatischen Cyclisierung des Squalens zum Lanosterin in D<sub>2</sub>O kein Deuterium an ein Kohlenstoffatom tritt. Eine solche Deuterierung wäre zu erwarten gewesen, wenn eines der als intermediär angenommenen Carbonium-Ionen nicht direkt zum Lanosterin weiterreagieren würde [29].

Bei der Bildung von Lanosterin aus Squalen müssen zwei Methylgruppen, die im Squalen an Verzweigungsstellen sitzen, ihre Plätze wechseln. Dafür kamen eine 1-3-Wanderung oder, wahrscheinlicher, zwei 1-2-Verschiebungen in Frage. Unabhängige Untersuchungen von Cornforth, Popják et al. [30] und von uns entschieden zugunsten der 1-2-Verschiebungen (Wanderung je einer Methylgruppe von C-8 an C-14 und von C-14 an C-13). Jede der beiden Arbeitsgruppen löste das Problem auf ihre Weise, aber beide machten davon Gebrauch, daß man massenspektrometrisch zwischen Molekülen unterscheiden kann, die um ein oder mehrere isotope Atome differieren. Wir verwendeten synthetisch hergestelltes [<sup>13</sup>C]-all-trans-Squalen [31], überführten es enzymatisch in Lanosterin, oxydierten das Produkt vollständig zu Essigsäure und wandelten diese in Äthylen um, das im Massenspektrometer analysiert wurde. Das Ergebnis zeigte, kurz gesagt, daß die im Lanosterin an C-14 stehende Methylgruppe nicht die gleiche ist, die sich im Squalen am entsprechenden Kohlenstoffatom befindet, sondern daß sie durch eine 1-2-Verschiebung vom benachbarten C-Atom kommt. Logischerweise mußte dann auch die zweite der beiden wandernden Methylgruppen an ein benachbartes Kohlenstoffatom gehen. Cornforth, Popják et al. gingen von [<sup>13</sup>C]-Mevalonsäure aus und überführten diese in Cholesterin. Auch sie analysierten die durch Oxydation des Produktes gewonnene Essigsäure und konnten den weiteren Schluß ziehen, daß die Methylwanderung von C-14 an C-13 intramolekular und nicht intermolekular verläuft. Der Erfolg dieser Untersuchungen über die Cyclisierung des Squalens war insofern besonders erfreulich, als er zeigte, daß nur eine enge Zusammenarbeit zwischen Chemikern und Biochemikern die Klärung biochemischer Reaktionsmechanismen ermöglicht.

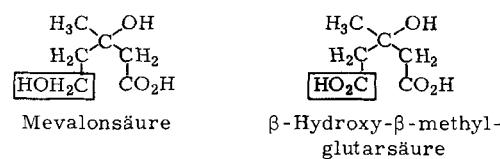
Wenn wir unsere mehr historische als systematische Beschreibung der Cholesterin-Biosynthese fortsetzen, so müssen wir jetzt zu den früheren Stufen des Prozesses zurückkehren und die Entdeckung der Mevalonsäure erwähnen, die sich als das Bindeglied zwischen der Essigsäure und der biologischen Isopren-Einheit erwies. Seit 1952 hatten mehrere Laboratorien nach verzweigten Zwischenstufen der Sterinsynthese mit fünf oder sechs Kohlenstoffatomen gesucht, ohne jedoch eine Substanz mit der erforderlichen biologischen Aktivität zu finden.

[29] T. T. Tchen u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 226, 931 (1957).

[30] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning u. G. Popják, Tetrahedron 5, 311 (1959).

[31] D. W. Dicker u. M. Whiting, J. chem. Soc. (London) 1958, 1994.

$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutarsäure (im Schema 3 oben rechts dargestellt) war als pflanzlicher Bestandteil bekannt [32] und schien auch strukturell als Kondensationsprodukt von drei Molekülen Acetat und als Vorstufe einer verzweigten C<sub>5</sub>-Einheit attraktiv [33], aber seine biologische Aktivität enttäuschte. (Später fand man, daß diese Verbindung sehr wohl ein Zwischenprodukt der Sterinsynthese ist, allerdings in der Form ihres Mono-CoenzymA-Derivates). Der entscheidende Fortschritt kam erst 1956 mit der Isolierung von Mevalonsäure durch Wright, Folkers et al. [34] in den Laboratorien der Firma Merck, Sharp and Dohme. Es war das Ziel dieser Arbeiten gewesen, einen Faktor zu isolieren und zu charakterisieren, der sich bei Stämmen von *Lactobacillus acidophilus*, welche Acetat zum Wachstum brauchen, als ungewöhnlich wirksamer Acetat-Ersatz erwiesen hatte [35]. Angesichts der strukturellen Ähnlichkeit von Hydroxymethylglutarat und Mevalonsäure (sie stimmen im Kohlenstoffgerüst überein, vgl. Schema 8) prüften Tavormina, Gibbs und Huff den bakteriellen Wuchsstoff und fanden in ihm eine bemerkenswert aktive Vorstufe des Squalens und der Sterine [36]. Nahm man an, daß nur eines der beiden Enantiomere biologisch verwertet werden kann, so war die Umwandlung praktisch quantitativ.



Schema 8. Strukturen von Mevalonsäure und  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutarsäure

Die Entdeckung der Mevalonsäure als einer Schlüsselsubstanz in der Biosynthese der Terpene und Sterine ist ein Beispiel für jene Zufälligkeiten, von denen der Fortschritt der Wissenschaft oft so entscheidend abhängt. Es ist um so bemerkenswerter, als man bis heute nicht weiß, welche Funktion die Mevalonsäure in den *Lactobacilli* erfüllt. Sterine spielen im bakteriellen Stoffwechsel keine wesentliche Rolle, und Mevalonsäure ist für *Lactobacilli* auch keine Vorstufe einer polyisoprenoïden Substanz.

In den Laboratorien von Rudney [37, 38] und Lynen [39, 40] fand man dann bald darauf auch die enzymati-

[32] R. Adams u. B. L. Van Duuren, J. Amer. chem. Soc. 75, 2377 (1953).

[33] K. Bloch, Harvey Lectures, Ser. 48 (1952–1953), Ser. 68 (1952).

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

[35] H. R. Skeggs, L. D. Wright, E. L. Cresson, G. D. E. MacRae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Bacteriol. 72, 519 (1956).

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

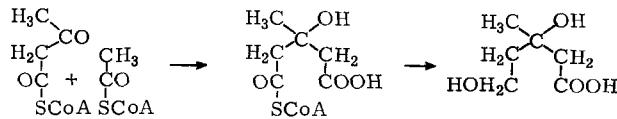
[37] H. Rudney, J. biol. Chemistry 227, 363 (1957).

[38] 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. 57.

[39] F. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sorbo u. L. Kroepelin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 (1958).

[40] F. Lynen [38], S. 59.

sche Synthese von Mevalonsäure aus Acetyl-CoA über Acetacetyl-CoA und Hydroxymethylglutaryl-CoA (Schema 9). Lynens fundamentale Entdeckung des Acetyl-CoA (1951) war eine wesentliche Voraussetzung für das Studium der frühen Stufen der Sterin-Biosynthese und für das Verständnis aller Phasen des Fettsäure-Stoffwechsels. Zu klären bleibt, woher das zur Synthese von Hydroxymethylglutaryl-CoA benötigte Acetacetyl-CoA kommt. Diese C<sub>4</sub>-Einheit könnte sich aus einem Acetyl- und einem Malonyl-Rest bilden [41], wie das in der Biosynthese langkettiger Fettsäuren der Fall ist. Energetisch wäre dieser Prozeß sicher günstiger als die Umkehrung der β-Ketothiolase-Reaktion. Wir haben aber gefunden, daß die Synthese von Sterinen aus Acetat in biotin-armen Hefekulturen normal verläuft, während die Fettsäuresynthese erheblich gestört ist [42]. Diese Beobachtung würde gegen die Beteiligung von Biotin-CO<sub>2</sub> und damit von Malonyl-Einheiten an der Sterin-Synthese sprechen, mindestens in einigen Organismen. Auch wäre es für die Regulation des Stoffwechsels günstiger, wenn die Acetacetyl-Vorstufen für die Sterin- und Fettsäure-Synthese auf verschiedenen Wegen entstünden, denn dann ließe sich der Eintritt von Acetyl-CoA in jeden der beiden Stoffwechselwege schon auf der frühesten Stufe kontrollieren.



Schema 9. Biosynthese der Mevalonsäure [37–40].

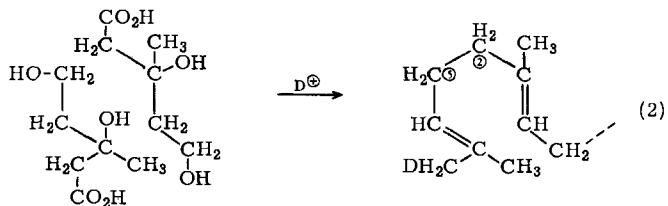
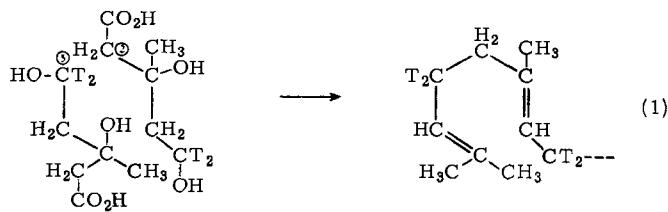
Mevalonsäure steht auf der gleichen Oxydationsstufe wie Isopren und kann formal durch Decarboxylierung und Abgabe von zwei Molekülen Wasser in dieses übergehen. Damit bestand die Möglichkeit, daß die vermuteten mono- und sesquiterpenoiden Zwischenstufen der Sterin-Synthese aus Untereinheiten hervorgehen, die in naher Beziehung zum Isopren stehen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, verwendeten wir [<sup>5</sup><sub>3</sub>H<sub>2</sub>]-Mevalonat als Ausgangsmaterial für die enzymatische Squalen-Synthese und fanden, daß von den insgesamt 12 Wasserstoffatomen an C-5 (6 Moleküle Mevalonsäure ergeben ein Molekül Squalen) nur ein kleiner Bruchteil verloren geht [43]. Von den beiden Verknüpfungsstellen in der Mevalonsäure blieb also mindestens eine auch bei der Bildung der neuen C–C-Bindung im Zustand einer (CH<sub>2</sub>-)-Gruppe. Spätere Versuche in D<sub>2</sub>O und mit [<sup>5</sup>D<sub>2</sub>]-Mevalonsäure bestätigten diese Folgerung und gestatteten den gleichen Schluß für das C-Atom 2 der Mevalonsäure. Obwohl uns weder die Natur noch die Zahl der Zwischenstufen bekannt waren, konnten wir aus diesen Ergebnissen ein Reaktionsschema für die Verknüpfung von C<sub>5</sub>- oder C<sub>6</sub>-Einheiten entwerfen (Schema 10) [44].

[41] J. D. Brodie, G. Wasson u. J. W. Porter, J. biol. Chemistry 238, 1294 (1963).

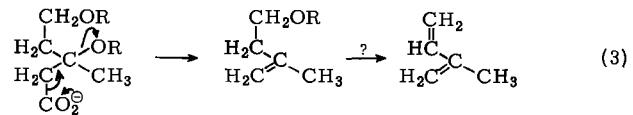
[42] D. Bloomfield u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 235, 337 (1960).

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

[44] H. Rilling, T.T. Tchen u. K. Bloch, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 167 (1958).



3-4 Atome D  
pro Molekül  
Squalen



Schema 10. Untersuchungen über die Bildung von Squalen aus Mevalonsäure und über die Art der biologischen Isopren-Einheit mit deuterierten und tritierten Verbindungen.

Die neue C–C-Bindung mußte sich bilden, ohne daß an den reagierenden Zentren Wasserstoff abgespalten oder aufgenommen wurde, d. h. die miteinander reagierenden Mevalonsäure-Derivate mußten in den Positionen 2 und 5 (–CH<sub>2</sub>–)-Gruppen haben. Weiter konnte man schließen, daß die Abspaltung der OH-Gruppe vom tertiären Kohlenstoffatom und der Carboxylgruppe synchron verlaufen und zu einer C<sub>5</sub>-Verbindung führen, die eine Methylengruppe enthält [Reaktion (3) im Schema 10]. Für die zum Squalen kondensierende Einheit kamen damit nur das Isopren selbst oder ein Derivat des Isoprens in Frage [44].

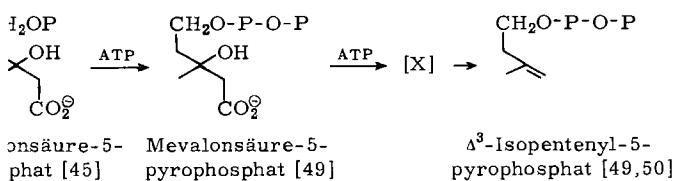
Parallel zu diesen Arbeiten untersuchten wir, welche Cofaktoren für die Synthese von Squalen aus Mevalonsäure in Hefeextrakten benötigt werden, und fanden, daß man Adenosintriphosphat (ATP) und reduziertes Triphosphopyridinucleotid (TPNH) zufügen muß [43]. Auf der Suche nach phosphorylierten Zwischenstufen isolierte T.T. Tchen ein stabiles Monophosphat der Mevalonsäure und die zugehörige Kinase [45, 46]. Lynen [40] zeigte, daß das Mevalonsäure-Derivat das 5-Phosphat war. Tchen wies darauf hin, daß eine Phosphorsäureester-Gruppierung besonders zur Eliminierung einer OH-Gruppe geeignet ist und daher die Bildung der vermuteten Methylengruppe beträchtlich fördern sollte. Diese Annahme brauchte später nur geringfügig geändert zu werden.

Mevalonsäure-5-phosphat erwies sich als vorzügliches Substrat der Squalen-Synthese. Da seine Umsetzung

[45] T.T. Tchen, J. Amer. chem. Soc. 79, 6344 (1957).

[46] T.T. Tchen, J. biol. Chemistry 233, 1100 (1958).

aber an die abermalige Zugabe von ATP gebunden war, mußte eine weitere Phosphorylierung angenommen werden. Zu diesem Zeitpunkt (Mai 1958) fand in London ein Ciba-Symposium über die Biogenese der Terpene und Sterine statt. Drei Laboratorien suchten damals nach phosphorylierten Derivaten der Mevalonsäure: *Lynens* Gruppe und wir arbeiteten mit Hefeextrakten, *Popják* und *Cornforth* verwendeten Leberpräparate. Wir berichteten über die Isolierung von zwei neuen Mevalonsäure-Derivaten, von denen eines zwei Atome Phosphor im Molekül enthielt und bei milder Hydrolyse mit Säure Orthophosphat und Mevalonsäure-monophosphat ergab. Das andere Derivat ließ sich mit Schlangengift-Phosphatase in Orthophosphat und  $\Delta^3$ -Isopentenol spalten. Wir schrieben diesen Verbindungen zunächst (und etwas übereilt) die Strukturen des Mevalonsäure-3,5-diphosphates und des Isopentenyl-phosphates zu [47], hatten diese Zuordnungen aber bald zu revidieren, als sich herausstellte, daß auch die  $C_5$ -Verbindung zwei Atome Phosphor im Molekül enthielt und daher Isopentenyl-pyrophosphat sein mußte [48, 49]. Logischerweise war die  $C_6$ -Verbindung dann als Mevalonsäure-5-pyrophosphat zu formulieren (Schema 11) [49]. *Lynen* und seine Mitarbeiter kamen zum gleichen Schluß und konnten darüber hinaus die Identität des Isopentenyl-pyrophosphates durch chemische Synthese sichern [50].



Schema 11. Phosphorylierte Derivate der Mevalonsäure.

Die chemisch interessanteste Reaktion auf dem Weg von der Mevalonsäure zum Isopentenyl-pyrophosphat ist die unter Mitwirkung von ATP stattfindende  $\beta$ -Eliminierung am Mevalonsäure-5-pyrophosphat, d. h. der Schritt, der die biologische Isopren-Einheit erzeugt. Daß diese Reaktion nach einem Synchronmechanismus verläuft, hatten wir auf Grund unserer Untersuchungen mit deuterierten Verbindungen bereits vermutet [44]. Wir waren daher erfreut zu finden, daß gereinigte Anhydrodecarboxylase tatsächlich die gleichzeitige Abspaltung der Carboxylgruppe und der OH-Gruppe am tertiären Kohlenstoffatom katalysiert [51]. Mit  $^{18}\text{O}$  gehaltene Ergebnisse sprachen für die intermediäre Bildung von 3-Phosphomevalonsäure-5-pyrophosphat [51a]. Dabei wirkt ATP als Phosphorylierungsmittel für die OH-Gruppe am tertiären Kohlenstoffatom und fördert so deren Eliminierung (Schema 12).

[47] K. Bloch [38], S. 4.

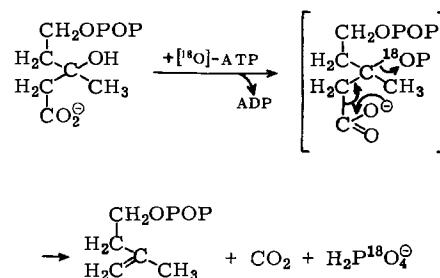
[48] K. Bloch: Proceedings of the IVth International Congress of Biochemistry. Pergamon Press, London 1958, Bd. IV, S. 50.

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

[50] F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning u. I. Kessel, Angew. Chem. 70, 739 (1958).

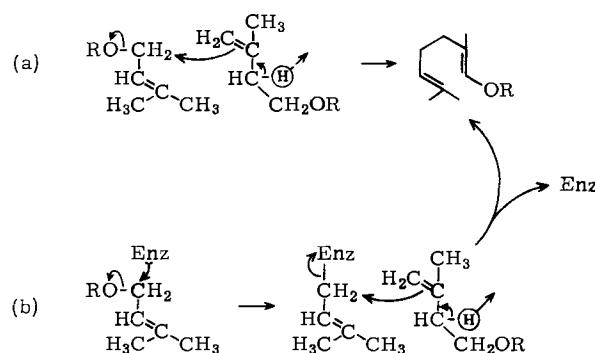
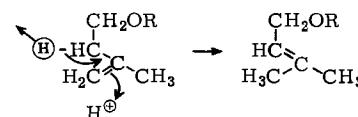
[51] A. de Waard, A. H. Phillips u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 81, 2913 (1959).

[51a] M. Lindberg, C. Yuan, A. de Waard u. K. Bloch, Biochemistry 1, 182 (1962).



Schema 12. Unter Decarboxylierung verlaufende  $\beta$ -Eliminierung am Mevalonsäure-5-pyrophosphat. Das Produkt ist Isopentenyl-pyrophosphat [51, 51a].

Das symmetrische Squalen enthält zwei endständige Isopropyliden-Gruppen. Da die biologische Isopren-Einheit die Isopropenyl-Struktur hat, folgt daraus, daß zwei der sechs miteinander kondensierenden Isopentenyl-Gruppen auf irgendeiner Stufe der Squalen-Synthese isomerisieren müssen. Denkbar war, daß ein Isopropenyl-Ester in einer doppelten Substitution mit dem Enzym unter Bildung von Pyrophosphat und Isopentenyl-Enzym reagiert und daß diese Verbindung dann zur Dimethylallyl-Struktur isomerisiert [47]. Diese Möglichkeit scheidet heute jedoch aus. *Lynen* schlug eine Isomerisierung des freien Isopentenyl-pyrophosphates zum Dimethylallyl-pyrophosphat vor (Schema 13) [50]. Er konnte diesen Schritt durch die Isolierung der entsprechenden Isomerase beweisen, die ein wesentlicher Bestandteil des koppelnden Enzymsystems ist, wenn man Isopentenyl-pyrophosphat als alleiniges Substrat benutzt [52].

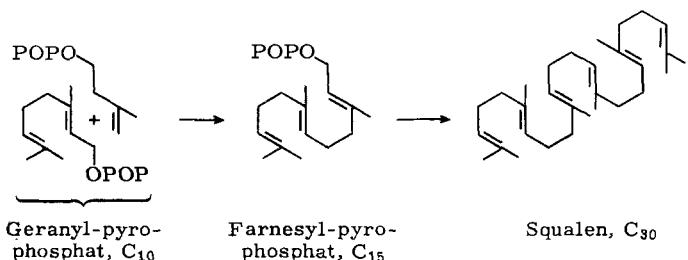


Schema 13. Isomerisierung von Isopentenyl-pyrophosphat und Kondensation der Isopentenyl-Einheiten.

Die Entdeckung von Geranyl-pyrophosphat [53] und Farnesyl-pyrophosphat [54] in *Lynens* Laboratorium vervollständigte die Beschreibung des Syntheseweges und aller enzymatischen Schritte bis zur Sesquiterpen-Stufe (Schema 14). *Popják* konnte zeigen, daß die glei-

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

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



Schema 14. Mono- und Sesquiterpen-Vorstufen des Squalens [50,52,53].

chen Zwischenprodukte bei der Squalen-Synthese mit Leberenzymen auftreten [54, 55].

Für alle, die sich an der Charakterisierung der zwischen Mevalonsäure und Squalen liegenden Produkte beteiligten war dieser Zeitraum besonders aufregend. Die Chemie war neuartig und großenteils unerwartet, und die Mittel, die zur Klärung der Struktur von nur in Mikrogramm-Mengen vorhandenen Stoffen angewendet wurden, müssen – am Herkömmlichen gemessen – als höchst unorthodox gelten. Die nahezu vollständige Abhängigkeit der entscheidenden Experimente von der Technik der Isotopenmarkierung und ihren Varianten hat kaum eine Parallele.

Die Polymerisierung von C<sub>5</sub>-Einheiten durch Verknüpfung über Methylengruppen ist unter den enzymatischen Reaktionen zur Bildung von C–C-Bindungen einmalig. Sowohl die einleitende Umsetzung zwischen zwei C<sub>5</sub>-Einheiten als auch die anschließenden Additionen von C<sub>5</sub>-Resten lassen sich als nucleophile Angriffe der Elektronen der Exomethylengruppe des Isopentenyl-pyrophosphates auf ein Kation deuten, das jeweils durch Eliminierung von Pyrophosphat aus einem Allyl-pyrophosphat entsteht. Alle diese Vorgänge sollen synchron verlaufen (Schema 13, Reaktion a). Dieser Mechanismus ist einleuchtend und als Arbeitshypothese nützlich, aber ihm fehlt der Beweis, den nur Untersuchungen mit gereinigten Enzymen erbringen können. Vielleicht sind wir – geleitet durch Vorstellungen aus der organischen Chemie – zu leicht geneigt, Reaktionsschritte in der Biosynthese der Terpene und Sterine als synchrone Ereignisse zu formulieren. Die moderne Enzymchemie legt eine Alternative nahe: Einleitend könnte sich aus dem Allyl-pyrophosphat und dem kondensierenden Enzym unter Eliminierung von Pyrophosphat ein covalenter Enzym-Substrat-Komplex bilden (Schema 13, Reaktion b). Dieser Komplex, und nicht das freie Allyl-pyrophosphat, würde dann mit einer zweiten C<sub>5</sub>-Einheit reagieren und so die neue C–C-Bindung bilden.

Es ist außerordentlich wahrscheinlich, daß man im Isopentenyl-pyrophosphat die universelle „monomere“ Vorstufe einer großen Zahl linearer und cyclischer Isopren-Derivate hat, die in der Natur vorkommen. Obwohl die Reinigung der polymerisierenden Enzyme noch nicht weit fortgeschritten ist, kann man doch sagen, daß sich die Produkt-Spezifitäten dieser Enzyme über einen weiten Bereich, von den Monoterpenen bis zu den

polyisoprenoiden Makromolekülen, erstrecken. Zwei Beispiele einer relativ hohen Kettenlängen-Spezifität sind bereits bekannt: Die von *Lynen* aus Hefe [53] und von *Popják* aus Leber [55] gewonnene Farnesylypyrophosphat-Synthetase liefert als Endprodukt überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, Farnesylypyrophosphat. Längere Ketten, z. B. C<sub>20</sub>-Pyrophosphat, werden mehr als hundertmal langsamer gebildet als das C<sub>15</sub>-Pyrophosphat. Das zweite spezifische Enzym, eine von uns aus *Micrococcus lysodeikticus* isolierte und gereinigte Terpen-Synthetase, erzeugt vor allem Geranylgeranyl-pyrophosphat, möglicherweise in kleiner Menge auch das C<sub>25</sub>-Homologe, sicher aber kein C<sub>15</sub>-Pyrophosphat [56]. In diesen Kettenlängen-Spezifitäten spiegelt sich deutlich die Ökonomie zellulärer Prozesse. Ein Abbruch der Kette auf der C<sub>15</sub>-Stufe ist zu erwarten, wenn das Enzym an einem Syntheseweg beteiligt ist, der zum Squalen und damit zu Sterinen führt, was in Hefe und Leber der Fall ist. In Bakterien findet keine Sterinsynthese statt, aber *Micrococcus lysodeikticus* produziert Carotinoide, und daher ist es sinnvoll, wenn die bakterielle Terpen-Synthetase auf die Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat, der C<sub>20</sub>-Vorstufe der Carotinoide, spezialisiert ist.

Formal kann die Squalen-Bildung als Dimerisierung von zwei Farnesyl-Einheiten beschrieben werden, und *Lynen* hat gezeigt, daß es sich dabei um zwei Moleküle Farnesyl-pyrophosphat handelt [50]. Die Umsetzung ist reduktiv, was die Notwendigkeit von TPNH erklärt, die wir früher bei der Synthese von Squalen aus Mevalonsäure beobachtet hatten [43]. Wiederum haben wir – wie bei der Verkoppelung der Isopentenyl-Einheiten – eine Wechselwirkung zwischen zwei reaktionsfähigen Methylengruppen, doch ist die Analogie nur oberflächlich, da die Farnesyl-Dimerisierung reduktiv verläuft und eine Umsetzung zwischen zwei gleichartigen Gruppen ist (Schwanz-Schwanz-Verknüpfung). In der (C<sub>5</sub> + C<sub>5</sub>)-Kondensation werden die Isopentenyl-Einheiten Kopf-Schwanz verknüpft, und ein Reduktionsmittel wird nicht benötigt. Brillante Deutungen sind für den letzten Schritt der Squalen-Synthese versucht worden [57]. Aus den eleganten Untersuchungen von *Cornforth* und *Popják* [58] kennen wir den sterischen Verlauf der Reaktion, aber ihr Mechanismus ist bis heute ungeklärt geblieben. Leider haben einige unserer eigenen Beiträge zu diesem Thema das Bild eher verdunkelt als geklärt. Frühe Versuche zur Squalen-Synthese in D<sub>2</sub>O oder aus [D]-Mevalonat mit rohen Hefeextrakten schienen zu zeigen, daß die Bildung der mittleren C–C-Bindung des Squalens mit der Abspaltung und Wiederaufnahme von zwei Wasserstoffatomen an den reagierenden Zentren verbunden ist [44]. Logischerweise nahmen *Cornforth* und *Popják* als Zwischenprodukt das Dehydrosqualen an [57], das eine zentrale Doppelbindung enthält. Diese Hypothese mußte aber aufgegeben werden, als sie mit Hilfe der Massenspektrometrie fanden, daß nur eines der an den reagierenden

[56] A. A. Kandutsch, H. Paulus, E. Levin u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 239, 2507 (1964).

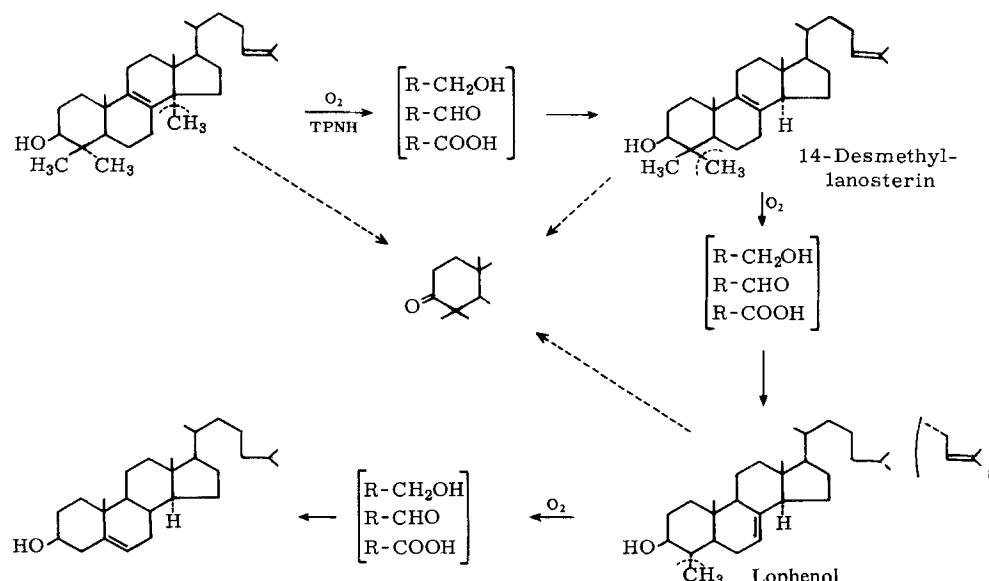
[57] G. Popják u. J. W. Cornforth, Adv. Enzymol. 22, 281 (1960).

[58] G. Popják, Proceedings of the VIth International Congress of Biochemistry, New York 1964. Bd. VII, S. 545.

Zentren stehenden Wasserstoffatome bei der ( $C_{15} + C_{15}$ )-Kondensation ersetzt wird [59]. Unsere späteren Ergebnisse bestätigten das [60]. Eine wichtige Einzelheit ist damit geklärt, aber der Schleier, der den Mechanismus der ( $C_{15} + C_{15}$ )-Kondensation umgibt, bleibt noch zu lüften. Gegenwärtig scheint es, als trafe einer von zwei Vorschlägen zu, die von Cornforth und Popják stammen und nach denen entweder eine der Farnesyl-Einheiten vor der Kondensation zu einem Derivat vom Nerolidol-Typ isomerisiert oder ein enzym-gebundener Farnesyl-Rest einer Stevens-Umlagerung unterliegt [61]. Squalen-Synthetase, von der man nicht weiß, ob sie ein einheitliches Enzym ist oder nicht, ließ sich noch nicht in löslicher Form gewinnen, und das beschränkt die Möglichkeiten zur Klärung mechanistischer Einzelheiten dieser Reaktionen beträchtlich. Ähnliche Schwierigkeiten müssen überwunden werden, bevor wir hoffen können, mehr über den Mechanismus der Squalen-Cyclisierung und über die anschließenden Schritte in der Biosynthese des Cholesterins zu erfahren.

Enzymatisch sind die letzten Schritte der Cholesterin-Synthese noch kaum charakterisiert, und man kennt wenig mehr als einige Zwischenprodukte. Auf Grund der chemischen Veränderungen bei der Umwandlung des Lanosterins zum Cholesterin ist anzunehmen, daß dafür sehr viele Enzyme benötigt werden, möglicherweise mehr als die Hälfte der am Syntheseweg insgesamt beteiligten Fermente. Einige Stufen dieser Umwandlung sind die Abspaltung der Methylgruppen an C-14 und C-4, die Reduktion der Isooctenyl-Seitenkette und die (formale) Verschiebung der Doppelbindung aus der 8,9- in die 5,6-Stellung des Ringsystems (Schema 15).

selprodukte zu finden und die Sequenz ihres Auftretens zu klären. Wir injizierten Ratten markiertes Acetat und töteten die Tiere wenige Minuten später. Bei der Chromatographie der unverseifbaren Gewebebraktion fanden wir einige radioaktive Stoffe unbekannter Natur [62]. Einer von diesen, etwas polarer als Lanosterin und weniger polar als Cholesterin, konnte ein teilweise entmethyliertes Derivat des Lanosterins sein, aber seine Menge war zu gering, als daß sie zu sehen oder zu wägen gewesen wäre. Wir mußten daher versuchen, seine Struktur zu klären, ohne die normalen chemischen oder physikalischen Methoden nutzen zu können. Einige Informationen erhielten wir durch die Kombination radiochemischer und enzymatischer Techniken, die im Prinzip schon bei der Identifizierung des Isopentenylpyrophosphates angewendet worden waren. Zusammengekommen zeigten sie, daß sich die unbekannte Substanz vom Lanosterin nur durch das Fehlen der Methylgruppe an C-14 unterscheidet. Die Struktur mußte daher die des 14-Desmethyllanosterins oder des 4,4-Dimethylcholesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ols sein [63, 64]. Bedingungen, unter denen sich dieses Sterin akkumuliert, sind noch nicht bekannt, und synthetisiert wurde bisher nur sein 24,25-Dihydroderivat, nicht das Sterin selbst. Die physikalischen Eigenschaften des 14-Desmethyllanosterins kennt man daher noch nicht. Zu beweisen bleibt auch, daß die Verbindung tatsächlich ein Stoffwechselprodukt des Lanosterins ist, obwohl eigentlich keine andere Möglichkeit besteht. Auf jeden Fall ergab sich durch die Isolierung dieses kurzlebigen Zwischenproduktes und aus seiner leichten Umwandlung ins Cholesterin die Reihenfolge der Schritte auf dem Weg vom



Schema 15. Oxydative Entfernung der Methylgruppen vom Lanosterin und die letzten Stufen der Cholesterin-Biosynthese.

Da es keine Anhaltspunkte für die Reihenfolge der Umwandlungen gab und die Zwischenprodukte vermutlich nur in Spuren auftreten, verwendeten wir die Puls-Technik der radioaktiven Markierung, um neue Stoffwechsel-

Lanosterin zum Cholesterin. Daß die Entmethylierung an C-14 der Abspaltung der Methylgruppen an C-4 vorangeht, wurde bald auch durch die Isolierung zweier Monomethylsterine bewiesen:  $4\alpha$ -Methyl- $\Delta^7$ -cholesten-

[59] G. Popják, S. de Witt Goodman, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth u. R. Ryhage, J. biol. Chemistry 236, 1934 (1961).

[60] C. R. Childs u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 237, 62 (1962).  
[61] G. Popják, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 156, 376 (1962).

[62] P. B. Schneider, R. B. Clayton u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 224, 175 (1957).

[63] F. Gautschi u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 79, 1145 (1957).  
[64] F. Gautschi u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 233, 1343 (1958).

$3\beta$ -ol (Methostenol oder Lophenol) aus tierischen [65] oder pflanzlichen [66] Quellen und  $4\alpha$ -Methyl- $\Delta^8$ -cholestenol aus Tumorgewebe [67] werden leicht in Cholesterin umgewandelt und sind offenbar Stoffwechselprodukte des Lanosterins. Allein aus strukturellen Indizien folgt natürlich noch nicht, daß die Reihenfolge der Entmethylierungsreaktionen in allen Systemen die gleiche ist. So hat beispielsweise *Djerassi* aus Pflanzen ein Derivat des 14-Methylcholestens, das  $14\alpha$ -Methyl- $\Delta^8$ -cholesten- $3\beta$ - $6\alpha$ -diol (McDougallin), isoliert [68], das möglicherweise auf dem Hauptstoffwechselweg liegt. In tierischen Geweben ist dieses Sterin allerdings inert [68a].

In der isolierten Leber geht die Entmethylierung des Lanosterins nur in Gegenwart von Sauerstoff vor sich. Pro Mol Cholesterin entstehen 3 Mol  $\text{CO}_2$  [69]. Vermutlich wird jede der drei Methylgruppen zunächst in einer Oxygenase-Reaktion hydroxyliert und anschließend über eine Aldehyd- zur Carboxylgruppe oxydiert, die dann als  $\text{CO}_2$  abgespalten wird. Es gibt zahlreiche Beispiele für die stufenweise Oxydation von Methylgruppen in Steroiden und cyclischen Terpenen (Soya-Sapogenol, Aldosteron, Abietinsäure), und die sauerstoff-abhängige enzymatische Hydroxylierung endständiger Methylgruppen in aliphatischen Ketten ist eine wohlbekannte Reaktion.

Eines der vermuteten, teilweise oxydierten Zwischenprodukte, das 4-Hydroxymethylen- $\Delta^7$ -cholesten-3-on, ist synthetisiert worden [70] und zeigt im gewöhnlich verwendeten Lebersystem die erwartete biologische Aktivität, d. h. es ergibt ein  $C_{27}$ -Sterin und  $\text{CO}_2$ . Diese Umwandlung geht sowohl unter anaeroben Bedingungen als auch in Gegenwart von Luft vor sich, was zu erwarten ist, wenn nur der erste Schritt der Entmethylierung sauerstoff-abhängig ist. Auch die entsprechende Carbonsäure, das 4-Carboxy- $\Delta^7$ -cholesten-3-on, wird vom Leberhomogenat unter Decarboxylierung umgesetzt, doch verläuft die Reaktion auch in Abwesenheit des Enzyms so rasch, daß zu klären bleibt, ob es sich hier um einen enzymatischen Prozeß handelt [70a]. Auf jeden Fall scheinen die enzymatische und die nicht-enzymatische Abspaltung des oxydierten  $C_1$ -Substituenten sehr ähnliche Reaktionen zu sein. Die Decarboxylierung wird durch eine benachbarte Doppelbindung oder durch eine  $\beta$ -ständige Ketogruppe gefördert [71].

Strukturelle Veränderungen, deren Reihenfolge noch zu klären ist, sind die Sättigung der Doppelbindung in der Isooctenyl-Seitenkette und die formale Verschiebung der ringständigen Doppelbindung aus der 8,9- in die

[65] W. W. Wells u. D. H. Neiderhiser, J. Amer. chem. Soc. 79, 6569 (1957).

[66] C. Djerassi, J. S. Mills u. R. Villotti, J. Amer. chem. Soc. 80, 1005 (1958).

[67] A. A. Kandutsch u. A. E. Russell, J. biol. Chemistry 235, 2253, 2256 (1960).

[68] C. Djerassi, J. C. Knight u. D. I. Wilkinson, J. Amer. chem. Soc. 85, 835 (1963).

[68a] M. Slaytor u. K. Bloch, unveröffentlicht.

[69] J. A. Olson, M. Lindberg u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 226, 941 (1957).

[70] J. Pudles u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 235, 12 (1960).

[70a] J. J. Britt, G. Scheuerbrandt u. K. Bloch, unveröffentlicht.

[71] M. Lindberg, F. Gautschi u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 238, 1661 (1963).

5,6-Stellung. Ob die Seitenkette stets im gleichen Stadium des gesamten Prozesses reduziert werden muß und ob dieses Stadium in der Lanosterin-Cholesterin-Umwandlung früh oder spät auftritt, ist ungeklärt. Die Struktur des Desmosterins ( $\Delta^{5,24}$ -Cholestadienol) läßt vermuten, daß die Reduktion der letzte Schritt der Synthesekette ist [72], doch würde das Vorkommen von Sterinen mit gesättigter Seitenkette (Dihydrolanosterin, Lophenol,  $4\alpha$ -Methyl- $\Delta^8$ -cholestenol,  $\Delta^7$ -Cholestenol) mit gleichem Recht für die Sättigung auf einer viel früheren Stufe des Lanosterin-Stoffwechsels sprechen. Die reduzierenden Enzymsysteme sind entweder verhältnismäßig unspezifisch [73], oder die Substratspezifität ist nicht in allen Geweben gleich. Wir wissen auch noch nicht, auf welcher Stufe die  $\Delta^{8(9)}$ -Doppelbindung in die  $\Delta^7$ -Stellung verschoben wird. Vor allem die Arbeiten von *Frantz et al.* haben aber gezeigt, daß diese Isomerisierung der Einführung der 5,6-Doppelbindung vorausgeht [74, 75]. Ein  $\Delta^{5,7}$ -Cholestadienol liegt zweifellos auf dem Hauptsyntheseweg, der schließlich mit einem reduzierenden Schritt zum Cholesterin führt.

## Ausblick

Die Richtung weiterer Untersuchungen zur Biosynthese der Terpene und Sterine erscheint ebenso klar vorgezeichnet, wie die Aspekte, denen besondere Aufmerksamkeit gelten wird. Biosynthetische Studien beginnen stets beim lebenden Tier oder bei der ganzen Zelle und gehen dann immer mehr zu Experimenten *in vitro* über. Nur mit isolierten und gereinigten Enzymen kann man schließlich etwas über den Mechanismus biologischer Reaktionen erfahren, und für viele Schritte der Cholesterin-Synthese ist dies noch ein recht fernes Ziel. Wir wissen über die ersten Phasen des Prozesses, d. h. über die Sequenz vom Acetyl-CoA bis zum Farnesyl-pyrophosphat, gut Bescheid. Zweifellos hat dazu die Tat sache beigetragen, daß die entsprechenden Enzyme löslich sind und daher mit Hilfe herkömmlicher Verfahren gereinigt werden können. Es ist vielleicht nicht ohne Bedeutung, daß alle Substrate dieser löslichen Enzyme die gleichfalls wasserlöslichen CoA-Derivate oder Pyrophosphate sind. Dagegen sind Squalen und die ihm folgenden Glieder der Biosynthesekette stark hydrophobe Moleküle, und die mit ihnen reagierenden Enzyme sind fest an partikuläre Zellbestandteile gebunden. Möglicherweise verlangt die Umsetzung dieser lipoiden Substrate komplexere Katalysatorsysteme, in denen auch Lipoproteine eine Rolle spielen. Auf jeden Fall genügen die uns heute zur Verfügung stehenden Methoden häufig nicht, um mit Enzymen zu experimentieren, die an der Umsetzung lipphiler Substrate beteiligt sind.

Eingehendere Kenntnisse über die Enzyme der Cholesterin-Biosynthese sind auch erforderlich, bevor man

[72] W. M. Stokes u. W. A. Fish, J. biol. Chemistry 235, 2604 (1961).

[73] J. Avigan, S. de Witt Goodman u. D. Steinberg, J. biol. Chemistry 238, 1283 (1963).

[74] G. J. Schroepfer u. J. D. Frantz, J. biol. Chemistry 236, 3137 (1961).

[75] M. E. Dempsey, J. D. Seaton, G. J. Schroepfer u. R. W. Trockmann, J. biol. Chemistry 239, 1381 (1964).

Fragen der Stoffwechselregulation beantworten kann. Hier handelt es sich um Probleme von sehr allgemeiner, über das rein akademische Interesse hinausgehender Bedeutung. Zahlreiche Einflüsse aus der Umgebung, Nahrungbestandteile sowie hormonale Faktoren ändern die Geschwindigkeit der Cholesterin-Synthese, aber unser Wissen ist noch zu gering, als daß sich sagen ließe, an welchen Stellen die physiologische Regulation am wirksamsten ist. Wenn das Prinzip der negativen Rückkoppelung, wie in so vielen Reaktionssketten, auch in der Cholesterin-Synthese auftritt, dann sollte der erste für diese Synthese spezifische Schritt geschwindigkeitsbestimmend sein und durch Cholesterin, das Endprodukt der Synthesekette, beeinflußt werden. Auf Grund dieser Überlegungen kommt besonders die Reduktion von Hydroxymethylglutaryl-CoA zu Mevalonsäure als Regelstelle in Frage. Es gibt auch experimentelle Hinweise dafür, besonders in den Arbeiten *Buchers*, die gezeigt haben, daß cholesterinreiche Nahrung, Röntgenbestrahlung oder Hunger ihre tiefgreifende Wirkung auf die Cholesterin-Synthese auf einer Stufe ausüben, die mindestens sehr in der Nähe der Mevalonsäure-Bildung liegt [76]. Diese Arbeitshypothese der homöostatischen Regulation bleibt weiterhin interessant [77], und man darf hoffen, daß die raschen Fortschritte in der Aufklärung von Regelmechanismen im allgemeinen auch zu einem besseren Verständnis der Vorgänge führen, die an der Regulation der Cholesterin-Biosynthese im speziellen beteiligt sind.

Parallel mit dem Interesse an den chemischen und enzymatischen Aspekten der Cholesterin-Biosynthese haben auch die Versuche zugenommen, die Rolle der Sterine als Zellbestandteile zu verstehen. Die bekannten Umwandlungen des Cholesterins im Stoffwechsel, die Bildung von Steroidhormonen und Gallensäuren er-

[76] *N. L. R. Bucher* [38], S. 46.

[77] *M. D. Siperstein u. V. M. Fagan*: Advances in Enzyme Regulation. Pergamon Press, Oxford 1964, Bd. 2, S. 249.

füllen sicher einen ganz speziellen Zweck, denn man findet sie nur bei Wirbeltieren. In einigen Geweben und Zellen hat das Cholesterin dagegen eindeutig keine Stoffwechselfunktion. In Organismen, welche die Sterine nicht metabolisieren, sie aber dennoch produzieren oder benötigen – und das gilt für alle mit Ausnahme der primitivsten Formen des Lebens –, müssen die Sterine irgendeine Rolle als strukturelle Zellbestandteile spielen. Die vergleichende Biochemie zeigt, welcher Art diese Rolle sein könnte: Bakterien oder blaugrüne Algen, d. h. primitiv organisierte Zellen, die keine von Membranen umgebene intrazelluläre Organellen haben, enthalten auch keine Sterine. Die Bildung von Strukturen, die mit Membranen versehen sind und spezielle Funktionen haben, gilt heute als ein Meilenstein in der evolutionären Differenzierung [78], und es scheint, daß die parallele Entwicklung der Sterin-Biosynthese ein biochemischer Ausdruck der morphologischen Veränderungen ist. Die Sterine sind in den differenzierten Zellen nicht statistisch verteilt, sondern befinden sich bevorzugt an der cytoplasmatischen Membran und ihren endoplasmatischen Erweiterungen. Wir wissen noch nicht, warum und zu welchem Zweck die Sterine in der Evolution der Organismen entstanden sind. Möglicherweise bieten sie mit der Stabilität, Ebenheit und hydrophoben Natur ihres Molekülgerüstes eine Kombination von Eigenschaften, die sie ganz besonders zur Stabilisierung der empfindlichen Membranen höher entwickelter Zellen geeignet sein ließ.

Die hier beschriebenen Untersuchungen sind von folgenden Organisationen großzügig gefördert worden: National Institute of Health, National Science Foundation, Life Insurance Medical Research Fund, Nutrition Foundation, Eugene Higgins Trust Fund of Harvard University.

Eingegangen am 12. April 1965 [A 475]  
Übersetzt von Dr. H. Grünwald, Heidelberg

[78] *R. Y. Stanier u. C. B. van Niel*, Arch. Mikrobiol. 42, 17 (1962).

## Die Röntgenstrukturanalyse komplizierter Moleküle

Nobel-Vortrag am 12. Dezember 1964 [\*]

VON PROF. DR. DOROTHY CROWFOOT-HODGKIN

LABORATORY OF CHEMICAL CRYSTALLOGRAPHY, OXFORD UNIVERSITY, OXFORD (ENGLAND)

Das Phänomen der Röntgenbeugung an Kristallen begann mir erstmals in einem Buch „Concerning the Nature of Things“, das *W. H. Bragg* 1925 für Schul Kinder geschrieben hatte. In diesem Buch hieß es: „Man kann sagen, daß die Entdeckung der Röntgenstrahlen unseren Gesichtssinn mehr als 10000-mal verstärkt hat,

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

so daß wir jetzt sogar einzelne Atome und Moleküle „sehen“ können“. Etwa zur gleichen Zeit hörte ich auch zum ersten Male von der Biochemie, und hier erschienen mir diejenigen Moleküle, die zu „sehen“ mich am meisten verlangte. Als Chemiestudentin in Oxford mit *Robinson* und *Hinshelwood* unter meinen Lehrern faszinierten mich die Gebäude, welche die Chemiker mit Hilfe von Experiment und Imagination errichtet hatten – aber die Frage ließ mich nicht los, ob es nicht besser