

Einkettige Polyprenylphosphate bilden primitive Membranen**

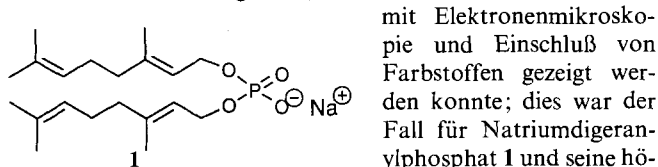
Gianluca Pozzi, Véronique Birault, Birgit Werner, Olivier Dannenmüller, Yoichi Nakatani, Guy Ourisson* und Susumu Terakawa

Terpenoidkomponenten sind ubiquitär und in großer Vielfalt in biologischen Membranen vorhanden (archeale Lipide, Hopanoide, Carotinoide, Steroide, Dolichole, Ubiquinonabkömmlinge usw.). Wir haben weiterhin gezeigt, daß der Bau vieler Molekülfossilien (sogenannte sedimentarische Biomarker) es unter Berücksichtigung bekannter Biosynthesemechanismen ermöglicht, die Strukturen ihrer Vorläufermoleküle abzuleiten; dies scheinen oft bis jetzt noch nicht entdeckte Membranterpenoidlipide zu sein. Auf diese Weise kamen wir zu dem Schluß, daß die allgemeine Rolle von Terpenoiden darin bestand, in allen lebenden Organismen an der Membranbildung oder Membranverstärkung beteiligt zu sein^[1].

Wir haben auch gezeigt, daß die synthetisierten oder postulierten Membranterpenoide in einer hypothetischen Evolutionsreihe angeordnet werden können, und auch vorgeschlagen, daß die einfachsten Verbindungen dieser Substanzgruppe, die an einer Vielfalt von biologischen Funktionen beteiligt sind, unter den Molekülen zu finden sein müssen, die für die einfachsten „azymatischen“, also nicht enzymkatalysierten Reaktionen, zugänglich sind^[2]. Dies führte uns zu dem Postulat, daß die einfachsten Membranbausteine acyclische Polyprenoidphosphate gewesen sein dürften, wobei die Kohlenwasserstoffketten so lang waren, daß die Moleküle einen amphiphilen Charakter aufwiesen, der Voraussetzung für die spontane Bildung von Vesikeln ist. Diese Phosphate könnten im wesentlichen durch eine Reaktion des allgemeinen Typs (a) gebildet worden sein.



Wir haben eine Reihe von Dipolyprenylphosphaten synthetisiert und in der Tat festgestellt, daß ihre Salze Vesikel bilden, was

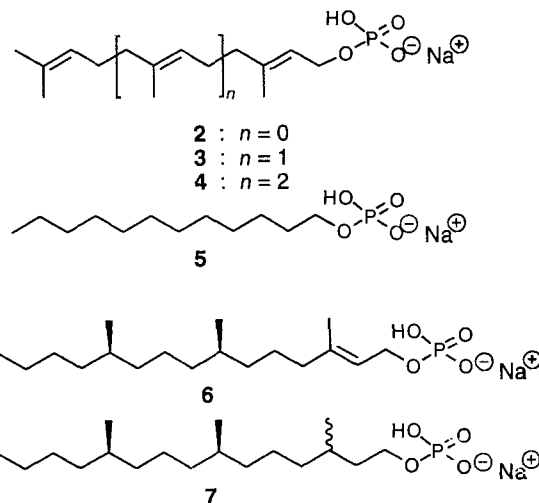


mit Elektronenmikroskopie und Einschluß von Farbstoffen gezeigt werden konnte; dies war der Fall für Natriumdigeranyolphosphat **1** und seine hö-

heren Isoprenologen mit zwei C_{15} - oder C_{20} -Ketten^[3]. Auf einer Wasseroberfläche bilden die gleichen Dipolyprenylphosphate Monoschichten, welche sich bei Zugabe von Cholesterin oder Hopanoiden^[4], genauso wie die von *N*-Acylphospholipiden dichter zusammenlagern. Es wurde außerdem gezeigt, daß die Zugabe von Diphytanylphosphat (eine Mischung aus *R*- und *S*-Diastereomeren) die Abgrenzungseigenschaften von Dipalmitoylphosphatidylcholinvesikeln verstärkt^[5].

Wir fragten uns, ob Monopolyterpenylphosphate und/oder -pyrophosphate in Analogie zu einigen Fettsäuren^[6] und vielen anderen einkettigen Amphiphilen^[7] sich nicht auch autoassoziiieren können, um Doppelschichtstrukturen und insbesondere geschlossene Vesikel auszubilden. Diese Phosphate und die entsprechenden Pyrophosphate wurden als Zwischenstufen bei der Biosynthese von Polyterpenoiden beschrieben^[8], aber ihr Phasenverhalten wurde nicht untersucht. Es wurde lediglich kurz erwähnt, daß die Ammoniumsalze des Monofarnesylphosphats in leicht sauren wäßrigen Lösungen (uncharakterisierte) Micellen bilden^[9]. Es wurde auch gezeigt, daß Phytanyltrimethylammonium-Phytanylphosphat **7** trotz der besonderen Struktur, bei der sich sowohl die kationische als auch die anionische Kopfgruppe an einer identischen lipophilen Kette befinden, zu stabilen Vesikeln führt^[10]. Wenn die Natriumsalze von Monoprenylphosphaten Vesikel bilden können, würde uns das nicht nur in die Lage versetzen, einen Schritt zurück zu einfacheren Membranen, die wahrscheinlich „primitiver“ als die der Dipolyprenylphosphate sind, zu gehen, sondern es wäre gleichzeitig eine experimentelle Bestätigung eines Teils der Hypothesen von Wächtershäuser, die Bestandteil seiner Theorie des „pyritgesteuerten“ chemoautotrophen Ursprungs des Lebens zur Bildung von Polyterpenoidmembranen sind^[11]. Daß diese Phosphate in der Tat interessante Phaseigenschaften haben können, wurde durch die wohlbekannte Verwendung langkettiger Alkylphosphate als Industriedetergentien nahegelegt, obwohl diese Seifen in der Regel Micellen und keine geschlossenen Vesikel ausbilden^[12].

Zur Herstellung von Phosphaten mit ungesättigten Polyterpenylketten kann natürlich nicht die Hydrogenolyse von Diphenylphosphaten, wie sie für die erste saubere Präparation von langkettigen *N*-Alkylphosphaten verwendet wurde^[13], herangezogen werden. Wir haben jetzt eine Reihe von Monopolyprenylphosphaten synthetisiert, darunter die von Geraniol **2**, Farnesol **3**, Geranylgeraniol **4**, Dodecanol **5** (zum Vergleich), Phytol **6** und von (3*R*,3*S*)-Phytanol **7**, und zwar in Form ihrer Natrium- oder Ammoniumsalze nach einer von Cramer entwickelten und von Danilov et al.^[14] angepaßten Phosphorylierungsmethode.



[*] Prof. G. Ourisson

Centre de Neurochimie CNRS

Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles

Université Louis Pasteur

5 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg (Frankreich)

Telefax: Int. + 88607620

Dr. Pozzi

Centro C.N.R. Sintesi e Stereochimica Speciali Sistemi Organici, Milano (Italien)

V. Birault, O. Dannenmüller, Prof. Y. Nakatani

Université Louis Pasteur, Strasbourg (Frankreich)

Dr. B. Werner

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München

Prof. S. Terakawa

Hamamatsu University School of Medicine, Photon Medical Research Center, Hamamatsu (Japan)

[**] Prebiomimetic Chemistry, Teil 3 (Teil 1: Lit. [3]; Teil 2: M. Keller, D. Hafenbradl, K. O. Stetter, G. Teller, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2015–2017; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1898–1900). Diese Arbeit wurde durch das Centre National de la Recherche Scientifique und die Université Louis Pasteur im Rahmen des ULP/Research-Development-Corporation-of-Japan-„Supermolecules“-Programms unterstützt. Für die gewährten Forschungsspenden bedankt sich G. P. beim CNRS und der Académie des Sciences (Marion-Merrell-Dow/ULP-Stipendium), B. W. beim CNRS und der Alexander-von-Humboldt-Stiftung (Lynen-Stipendium) und V. B. bei Rhône-Poulenc-Rorer.

Als Cyclohexylammoniumsalze wurden diese Phosphate aus dem Reaktionsgemisch nach einer von Julia et al.^[15] entwickelten Methode isoliert. Für die Bildung der Pyrophosphate von Geraniol **8**, Farnesol **9**, Geranylgeraniol **10**, Phytol **11** sowie von Phytanol **12** haben wir die schnelle Synthesemethode von Keller

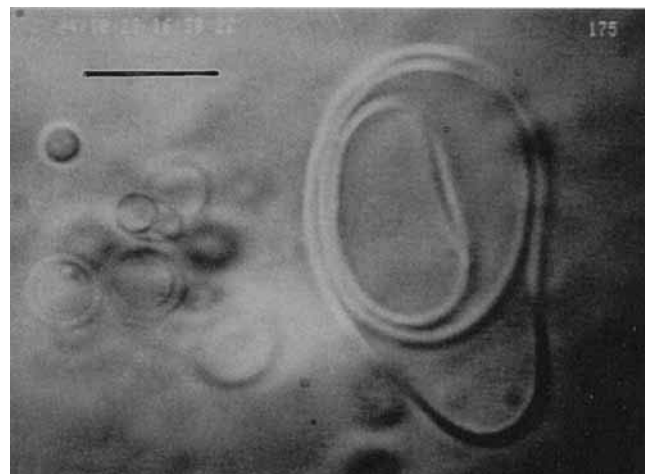
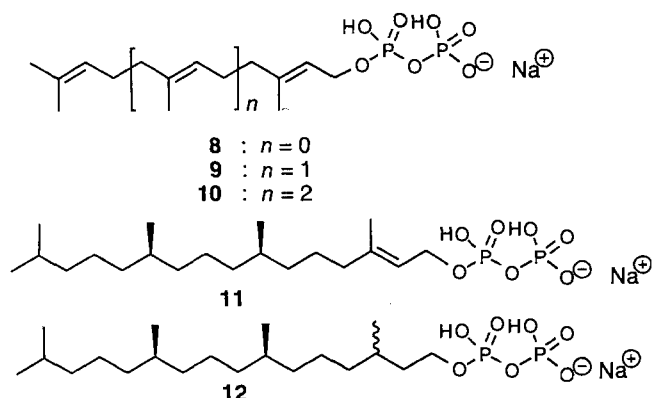


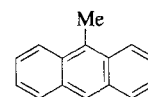
Abb. 1. Kopie einer Videoaufnahme des Differential-Interferenz-Kontrastbildes einer multivesikulären Struktur von Natriumgeranylgeranylphosphat in einer Pufferlösung bei pH 4.1 und 23 °C. Der Balken entspricht 5 μm .

und Thompson^[16] genutzt, und aus diesen Pyrophosphaten können durch kontrollierte Hydrolyse wieder die Phosphate erhalten werden. Nach Aufbringen auf eine Kationenaustauschersäule, um die entsprechenden Natrium- oder Ammoniumsalze zu erhalten, wurden die Produkte, die dünnstschichtchromatographisch sauber waren, potentiometrisch untersucht ($\text{p}K_{\text{a}1} = 3.2\text{--}3.3$, $\text{p}K_{\text{a}2} = 6.6\text{--}6.7$ für die Phosphate; während der Titration der Pyrophosphate trat Hydrolyse ein, so daß die $\text{p}K_{\text{a}}$ -Werte und die der Phosphate identisch waren) und ihre ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen. Die Suspensionen dieser Verbindungen in Wasser wurden elektronenmikroskopisch (Kryomikroskopie) untersucht, und die Bildung von Vesikeln aus den Feststoffen in Gegenwart verschiedener Puffer wurde mit zwei unterschiedlichen optischen Mikroskopiertechniken verfolgt, der Differential-Interferenz-Mikroskopie und der Konfokalmikroskopie, beides Methoden, die nur die Beobachtung von Riesenvesikeln zulassen.

Die Tabelle 1 faßt die ermittelten Resultate zusammen. Die Verbindungen **2** und **8**, die nur die C_{10} -Kette von Geraniol tragen, lösen sich offensichtlich entlang des gesamten pH-Bereichs vollständig in Wasser. Im Fall des Farnesylphosphates konnte mit Lichtmikroskopen keine Vesikelbildung festgestellt werden, wohingegen die Elektronenmikroskopie die Anwesenheit kleiner Vesikel anzeigte. Alle anderen Phosphate und Pyrophosphate bildeten bei Kontakt des Feststoffs mit einem geeigneten Puffer Riesenvesikel (Durchmesser $> 10\ \mu\text{m}$, Abb. 1). Das Vesikel-

wachstum, ausgehend vom Feststoff, kann durch verschiedene Prozesse beschrieben werden: Man beobachtet die Bildung von Blasen, die wachsen, bis sie sich schließlich als geschlossene Vesikel von der Feststoffoberfläche ablösen, oder die Entstehung von Röhren, deren distales Ende kontinuierlich zu einer Anschwellung, dann zu einer Blase und schließlich zu einem frei beweglichen Vesikel wird. Am besten ließen sich Riesenvesikel in einem Acetat- oder Phthalatpuffer bei pH 4 beobachten. Bei den Pyrophosphaten trat nichtsdestoweniger nach wenigen Minuten Hydrolyse ein. Weiterhin muß eingeräumt werden, daß unser Meßaufbau keine Änderung der Beobachtungstemperatur, die in allen Fällen bei 23 °C liegt, zuläßt. Diese scheint dennoch oberhalb der Phasenübergangstemperatur dieser Polyterpenylphosphate zu liegen; man erinnere sich, daß durch eine Verzweigung der lipophilen Ketten die Phasenübergangstemperatur so stark herabgesetzt wird, daß es unmöglich ist, sie zu messen, wenn man den Fall der Archaeolipide^[17] verallgemeinern will.

Weiterhin haben wir der Vesikelpräparation 5% des Fluoreszenzfarbstoffes 9-Methylanthracen **13** (Nile Red) zugegeben und die Laservorrichtung des Konfokalmikroskopes dazu verwendet, die Fluoreszenz der Vesikel nach Anregung bei $\lambda = 485\ \text{nm}$ und $551\ \text{nm}$ in der xz - und xy -Ebene zu messen (Abb. 2). Die Ergebnisse zeigen, daß zumindest einige der Vesikel quasi sphärisch und leer sind und aus einer lipophilen Schicht bestehen (sie emittieren im ersten Fall im grünen, im zweiten im roten Spektralbereich). Weiterhin wird wie erwartet beobachtet, daß lipophile Moleküle selektiv in die Vesikeldoppelschicht eindringen, was bei der Diskussion der Bildung wachsender Komplexibilität in selbstorganisierten Systemen von Wichtigkeit ist.



13

Es ist offensichtlich, daß **2** und **4** (oder **8** und **10**) sehr viel plausiblere primitive Membranbausteine sind als *N*-Alkylamphiphile oder die aus Meteoriten stammenden aromatischen Aminosäuren, denen vorher diese Rolle zugesprochen wurde^[18]. Gegenwärtig untersuchen wir die Eigenschaften dieser neuen Vesikel (insbesondere, um die jeweilige Bedeutung der Kettenverzweigungen und die der Doppelbindungen, zwei Punkte, die bis jetzt noch nicht ganz verstanden sind, herauszufinden) und deren Bildung unter präbiomimetischen Bedingungen, wie sie bereits vorher vorgeschlagen wurden^[2, 11].

Tabelle 1. Herstellung geschlossener Vesikel (siehe Experimentelles) [a].

Substanz	Elektronenmikroskopie	Lichtmikroskopie	pH oder pH-Bereich
2	n.t.	— (wasserlöslich)	
3	+	— (zu kleine Vesikel)	
4	+	+	2–8
5	n.t.	+	3–10
6	n.t.	+	3–9
7	n.t.	+	2.5–12.5
8	n.t.	— (wasserlöslich)	
9	n.t.	+	1.5
10	n.t.	+	2
11	n.t.	+	2–10
12	n.t.	+	2.5

[a] n.t.: nicht getestet; +: Vesikelbildung; —: keine Vesikelbildung (Leerfeld); untersuchter pH-Wert oder pH-Bereich, in dem Vesikelbildung auftritt.

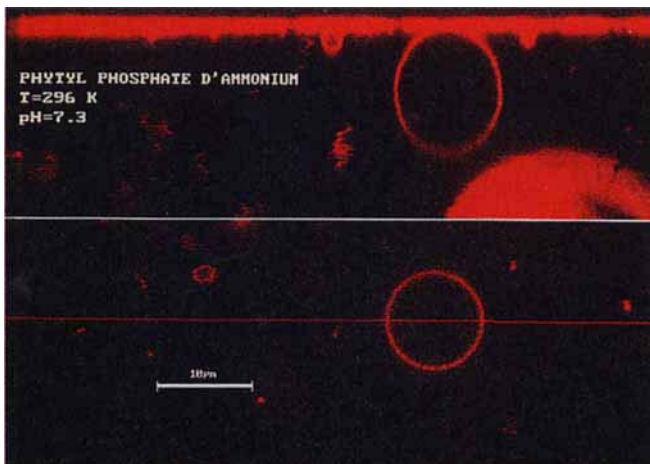


Abb. 2. Konfokalfluoreszenzbild eines Ammoniumphytanylphosphatvesikels, das 5% Nile Red 13 enthält und aus dem Feststoff in einem Puffer bei pH 7.3 und 23 °C entstanden ist. Anregungswellenlänge $\lambda = 551$ nm. Das gleiche Vesikel wird aus zwei zueinander orthogonalen Richtungen, der xy - und xz -Ebene, betrachtet. Der Balken entspricht 10 μm .

Experimentelles

Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie: Invertiertes Mikroskop (Axiovert 135, 63×1.4 -Plan-Achromat-Oil-DIC-Objektiv, $\times 2.5$ -Einsatzlinse, Carl Zeiss), Ladungskopplervorrichtung (CCD), Kamera (C2400-75i, Hamamatsu Photonics), Bildprozessor (Argus-20, Hamamatsu Photonics), S-VHS-Videorekorder (SVO-9500MDP, Sony), Videomonitor (PVM-1443, Sony) und Videodrucker VP-1500, Seikosha).

Konfokale Mikroskopie: Invertiertes Konfokalmikroskop (LSM Invert 410, Plan-Apo-X63-Objektiv, Carl Zeiss), Laserquellen Ar (488 nm, Bandpass 515–565-Filter) und He/Ne (543 nm, Langpass-595-Filter), Bildprozessor (Matrox 4M Ω), PC 486-488PX-Mikrocomputer, Farbmonitor (FT 3420 ETKL, Mitsubishi), Drucker (VP 1800 EPM, Sony) und Digital-Bildrekorder (Focus).

Beobachtungen am Mikroskop: Ein typisches Experiment wird wie folgt durchgeführt: 3 mg des Phosphats werden in 300 μL einer Lösung von Chloroform/Methanol (2:1) gelöst und ein Aliquot von 1.5 μL auf ein Deckglas (0.17 mm dick) getropft. Nach zehnminütiger Trocknung wird der auf dem Deckglas zurückbleibende lamellare Feststofffilm fokussiert und mit 4.5 μL Puffer (z.B. Acetattuffer, pH 4.1) bei 25 °C versetzt. Es wurde beobachtet, daß die Vesikelbildung an der Phasengrenzlinie Feststoff/Flüssigkeit beginnt. Neben den in der Abbildung gezeigten multilamellaren Strukturen wurden ebenfalls unilamellare Vesikel und Röhrenstrukturen beobachtet. Die Membranen erscheinen aufgrund der Interferenzbelichtung sehr dick.

Eingegangen am 26. Januar,
ergänzte Fassung am 2. August 1995 [Z 7663]

Stichworte: Membranen · Mikroskopie · Präbiotische Chemie · Polyphosphat · Vesikel

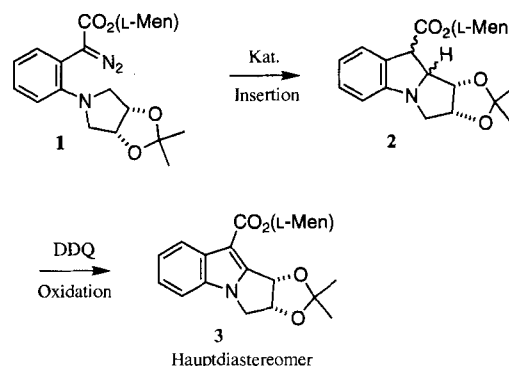
- [1] G. Ourisson, *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62, 1401–1404.
- [2] G. Ourisson, M. Rohmer, K. Poralla, *Ann. Rev. Microbiol.* **1987**, 41, 301–333; G. Ourisson, Y. Nakatani, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 11–23; G. Ourisson in *Early Life on Earth. Nobel Symp. Nr 84* (Hrsg.: S. Bengtson), Columbia University Press, New York, **1994**, S. 259–269.
- [3] N. Plobeck, S. Eifler, A. Brisson, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5249–5252.
- [4] A. Kamino, K. Ariga, T. Kunitake, V. Birault, G. Pozzi, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Coll. Surf. A* **1995**, 103, 183–194.
- [5] N. Nishikawa, H. Mori, M. Ono, *Chem. Lett.* **1994**, 767–770.
- [6] J. M. Gebicki, M. Hicks, *Nature* **1973**, 243, 232–233; W. R. Hargreaves, D. W. Deamer, *Biochemistry* **1978**, 17, 3759–3768; D. P. Cistola, J. A. Hamilton, D. Jackson, D. M. Small, *ibid.* **1988**, 27, 1881–1888.
- [7] T. Kunitake, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 692–710; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 709–726.
- [8] S. L. Spurgeon, J. W. Porter, *Biosynth. Isoprenoid Compd.* **1981**, 1, 1.
- [9] E. F. Brody, C. D. Gutsche, *Tetrahedron* **1977**, 33, 723–729.
- [10] K. Yamauchi, Y. Yoshida, T. Moriya, K. Togawa, M. Kinoshita, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1193, 41–47.
- [11] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, 52, 452–484.

- [12] A. A. Ruzza, M. R. K. Walter, F. Nome, D. Zanette, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 1463–1467, zit. Lit.; J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York, **1982**; T. Tahara, I. Satake, R. Matsuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, 42, 1201–1205.
- [13] D. A. Brown, T. Malkin, G. K. Maliphant, *J. Chem. Soc.* **1955**, 1584, 1588.
- [14] L. L. Danilov, T. N. Druzhinina, N. A. Kalinchuk, V. N. Maltsev, V. N. Shibaev, *Chem. Phys. Lipids* **1989**, 51, 191–203.
- [15] M. Julia, H. Mestdagh, C. Rolando, *Tetrahedron* **1986**, 42, 3841–3849.
- [16] R. K. Keller, R. Thompson, *J. Chromatogr.* **1993**, 645, 161–167.
- [17] D. Blöcher, R. Gutermann, B. Henkel, K. Ring, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 778, 74–80; D. Blöcher, L. Six, R. Gutermann, B. Henkel, K. Ring, *ibid.* **1985**, 818, 333–334.
- [18] D. W. Deamer, E. Harang Mahon, G. Bosco in *Early Life on Earth, Nobel Symp. Nr 84*, (Hrsg.: S. Bengtson), Columbia University Press, New York **1994**, S. 107–123.

Durch Screening ermittelte Katalysatoren und Reaktionsbedingungen für eine C-H-Insertionsreaktion**

Kevin Burgess*, Hee-Jong Lim, Alexander M. Porte und Gary A. Sulikowski

Diazoverbindungen mit geeignet ausgerichteten Substituenten können über metallunterstützte Reaktionen intramolekulare Ringbildungsreaktionen eingehen, vermutlich unter Insertion von Carbenkomplexfragmenten in C-H-Ketten^[1,2]. An den meisten der bekannten Reaktionen dieses Typs sind Rhodiumkomplexe^[3] beteiligt, die typischerweise optisch reine Aminosäureliganden tragen^[4]. Zwei von unserer Gruppe berichteten kürzlich, daß optisch aktive Kupferkatalysatoren besser für die in Schema 1 gezeigte Reaktion geeignet sind^[5]. Im günstigsten



Schema 1. L-Men = L-Menthyl.

Fall wurde das Produkt 3 in 64% Ausbeute als eine 2.3:1.0-Diastereomerenmischung isoliert. Diese Ergebnisse sollten durch Einsatz anderer Katalysatoren, die es mit einem hocheffizienten Katalysatorscreening zu ermitteln galt, verbessert werden.

[*] Prof. K. Burgess, H.-J. Lim, A. M. Porte, Prof. G. A. Sulikowski
Department of Chemistry, Texas A & M University
College Station, TX 77843-3255 (USA)
Telefax: Int. + 409/845-8839
E-mail: burgess@chemvx.tamu.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der Petroleum Research Foundation und der Robert A. Welch Foundation gefördert. K. R. dankt den National Institutes of Health für den NIH Research Career Development Award und der Alfred P. Sloan Foundation für ein Stipendium. G. A. S. dankt der American Cancer Society für den Junior Faculty Research Award und der American Cyanamid für den Cyanamid Faculty Award.