

EXPERIENTIA

Vol. XX - Fasc. 9

Pag. 473-528

15. IX. 1964

Über Ursprung und Funktion einiger Methylgruppen in verzweigten Fettsäuren, in Pflanzensterinen und in Chinonen der Vitamin-K- und Ubichinongruppe*

Von E. LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S et O) und
Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (S et O, France)

Im ersten Teil dieses Berichtes werden wir uns besonders für die C-Methylierung durch Methionin und den Einbau von Propionsäure in bakterielle Fettsäuren interessieren. Im zweiten Teil werden wir die Biogenese der «Extra-Methylgruppe» des Ergosterins und der «Extra-Äthylgruppe» der Phytosterine studieren. Die bei der Biosynthese der Tuberkulostearinsäure und des Ergosterins gemachten Beobachtungen führen dazu, verschiedene Mechanismen für die C-Methylierung durch Methionin in Betracht zu ziehen.

Im dritten Teil dieses Berichtes werden wir die besondere Rolle der Methylseitenkette der natürlichen Chinone der Vitamin-K- und Ubichinongruppe besprechen; dabei werden wir auf die mögliche Rolle dieser Substanzen in der oxydativen Phosphorylierung zu sprechen kommen und zeigen, dass sich diese Substanzen in saurer Lösung leicht zu sehr reaktionsfähigen Methylen-chinon-chromanen isomerisieren.

I. Biosynthese methylverzweigter Fettsäuren

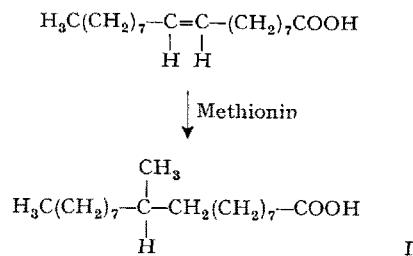
Vier verschiedene Mechanismen sind gegenwärtig bekannt, durch die methylverzweigte Fettsäuren in der Natur aufgebaut werden: (1) C-Methylierung durch Methionin, (2) Einbau von Propionsäure, (3) Einbau der verzweigten Kohlenstoffkette des Leucins und des Iso-leucins, wodurch iso- und anteiso-Säuren entstehen, (4) Einbau von Mevalonsäure.

Da unsere eigenen Arbeiten sich nur auf die ersten zwei Mechanismen beziehen, verweisen wir bezüglich der zwei anderen auf einige Originalarbeiten¹⁻⁴ sowie Übersichtsartikel⁵. Einige Kommentare über die «Rolle» der methylverzweigten Fettsäuren finden sich in einem früheren Vortrag⁶.

(1) *C-Methylierung durch Methionin*. Die C-Methylierung zahlreicher Phenole und Terpenoide durch Transmethylierung in Gegenwart von Methionin ist von BIRCH et al.⁷ zuerst 1954 vorgeschlagen und dann in einer Reihe ausgezeichneter Arbeiten mit Hilfe von Isotopen bewiesen worden. (Siehe die Zusammenfassungen von BIRCH⁸.)

Auf dem Gebiete der methylverzweigten Fettsäuren haben zuerst LENNARZ et al.⁹ gezeigt, dass in *Myco-*

bacterium phlei Tuberkulinsäure (10-Methylstearinsäure) (I) aus Ölsäure in Gegenwart von ¹⁴C-Methionin entsteht.



In dieser Arbeit wurde die Reihenfolge: Stearin-säure → Ölsäure → 10-Methylstearinsäure bewiesen.

TANAKA und UMEZAWA¹⁰ haben auch gezeigt, dass die Methylgruppe des Methionins für die Biosynthese einer methylverzweigten Fettsäure des Antibiotikums Variotin verwendet wird.

Die von LENNARZ et al.⁹ entdeckte Transmethylierung erinnert stark an eine ganz analoge Reaktion, die

* Sechste PAUL-KARRER-Vorlesung, gehalten am 1. Juli 1964 an der Universität Zürich; ein ähnlicher, englischer Text wird als «Second Jubilee Lecture» der Biochemical Society im Biochemical Journal, im Druck (1964), erscheinen. – Unsere Arbeiten wurden durch Grant AI-02838 vom National Institute of Health (U.S. Public Health Service) und durch Unterstützungen des Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, gefördert.

¹ W. J. LENNARZ, Biochim. biophys. Res. Comm. 6, 112 (1961).

² M. G. HORNIG, D. B. MARTIN, A. KARMEN und P. ROY VAGELOS, J. biol. Chem. 236, 669 (1961).

³ E. KLENK und W. KAHLKE, Z. physiol. Chem. 333, 133 (1963).

⁴ J. CHRISTOPHE und G. POPJÄK, J. Lipid Res. 2, 244 (1961).

⁵ E. LEDERER, *Biosynthesis of Lipids*, Vth Intern. Congress of Biochemistry (G. Popják, Pergamon Press, London 1963), Bd. 7, p. 90. – E. LEDERER, *Biosynthèse des acides gras bactériens ramifiés* (Accademia Nazionale dei Lincei, VII Corso Estivo di Chimica, Milano 1962), p. 159 (1964).

⁶ E. LEDERER, Biochem. J., im Druck (1964).

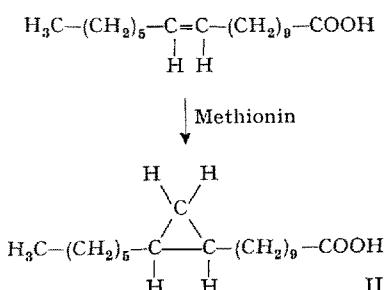
⁷ A. J. BIRCH, P. ELLIOTT und A. R. PENFOLD, Austr. J. Chem. 7, 169 (1954). – A. J. BIRCH, R. J. ENGLISH, R. A. MASSY-WESTROPP, M. SLAYTON und H. SMITH, J. chem. Soc. 1958, 365.

⁸ A. J. BIRCH, Proc. chem. Soc. 1962, 3. – A. J. BIRCH, Pure appl. Chem. 7, 527 (1963).

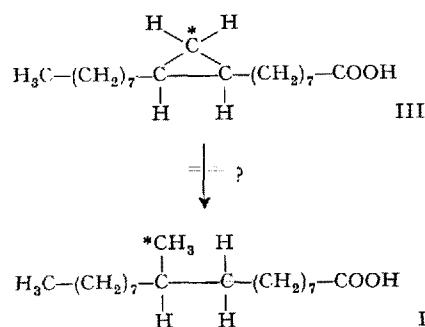
⁹ W. J. LENNARZ, G. SCHEUERBRANDT und K. BLOCH, J. biol. Chem. 237, 664 (1962).

¹⁰ N. TANAKA und H. UMEZAWA, J. Antibiotics 15, 189 (1962). – J. gen. appl. Microbiol. 8, 160 (1962).

schon vorher von HOFMANN und LIU¹¹ beschrieben worden war; die Bildung von Lactobacillsäure (II) aus Vaccensäure (*cis*-Octadecen-11-Säure) in Gegenwart von Methionin.



Wir haben uns daraufhin die Frage gestellt, ob eine der Lactobacillsäure isomere 9,10-Methylenstearinsäure (III) der biogenetische Vorläufer der Tuberkulostearinsäure (I) sein könnte.



Um diese Frage zu beantworten, wurde aus Ölsäure und $^{14}\text{CH}_2\text{I}_2$ hergestellte ^{14}C -markierte Dihydrosterku-

linsäure (III) hergestellt und dann mit *M. phlei* inkubiert; nach einigen Tagen wurden die Fettsäuren extrahiert, die Methylester der Säuren durch Gaschromatographie getrennt; es stellte sich aber heraus, dass die Tuberkulostearinsäure (I) keine Spur von Isotop enthielt¹².

Dieses negative Resultat entmutigte uns nicht, da man ja allgemein in biosynthetischen Experimenten aus negativen Versuchen kaum mit Sicherheit Schlüsse ziehen kann. Wir dachten vielmehr, dem Problem von einer anderen Seite näherzutreten: wenn wirklich Cyclopropanderivate Vorläufer der methylverzweigten Substanzen sind, dann sollte man in der von der Methylgruppe des Methionins stammenden Methylgruppe der Tuberkulostearinsäure (oder des Ergosterins, siehe unten) *nur zwei* der Wasserstoffe der Methylgruppe des Methionins finden.

Es wurde daher beschlossen, CD_3 -Methionin einzusetzen; diese Substanz ist vor kurzem von LAW et al.¹³ verwendet worden, um die Biosynthese der bakteriellen Cyclopropanäuren zu studieren; sie haben dabei, wie erwartet, den Einbau von zwei D-Atomen in den Cyclopropanring festgestellt.

Dr. LAW war dann auf einige Monate zu uns nach Gif gekommen und inkubierte wachsende Zellen von *M. smegmatis* mit CD_3 -Methionin; das Massenspektrum des Methylesters der aus diesen Versuchen isolierten Tuberkulostearinsäure zeigt eindeutig, dass *nur zwei* Deuteriumatome der CD_3 -Gruppe des Methionins eingebaut worden waren (Figur 1)¹⁴.

Der kleine Peak bei m/e 315 ist ausschliesslich auf die natürlichen schweren Isotope des Molekül-Ions bei m/e 314 zurückzuführen. Die ausführlichen Arbeiten von RYHAGE und STENHAGEN¹⁵ über Massenspektrometrie von Fettsäuren erlauben es auch, die genaue Stellung des Deuteriums in der Moleköl zu ermitteln. Die Spaltung der Bindung beiderseits der Verzweigung führt zu Peaks bei m/e 171 und 199, deren Massendifferenz dem C-10 und seiner Methylgruppe entspricht. Die zusätzlichen 2 Masseneinheiten (m/e 171, 201) in der deuterierten Moleköl zeigen, dass 2 D-Atome in der C-10-

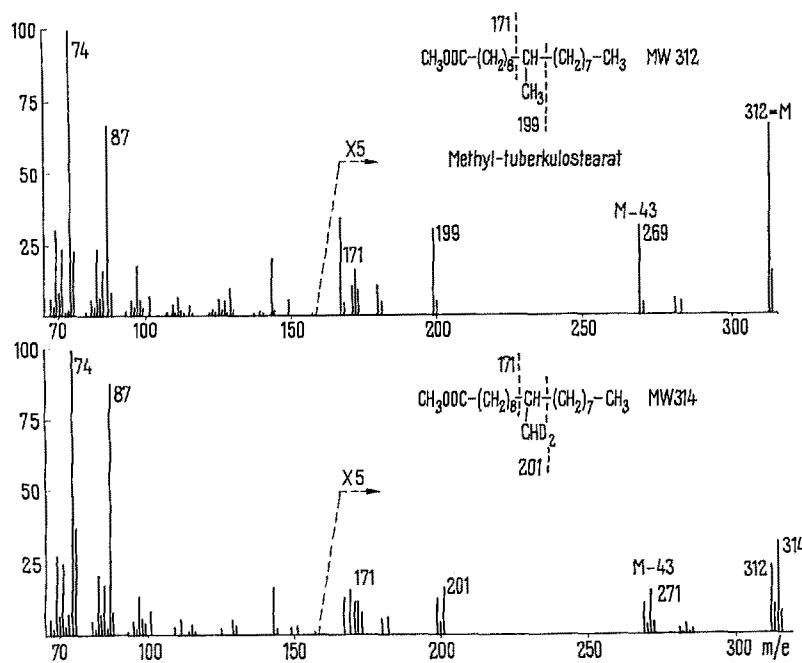


Fig. 1. Massenspektrum von Methyl-tuberkulostearat; oben: normal, unten: deuteriert.

¹¹ K. HOFMANN und T. Y. LIU, Biochim. biophys. Acta 37, 364 (1960).

¹² Unveröffentlichte Versuche mit P. SARDA und D. MERCIER.

¹³ J. H. LAW, H. ZALKIN und T. KANESHIRO, Biochim. biophys. Acta 70, 143 (1963). - S. POHL, J. H. LAW und R. RYHAGE, Biochim. biophys. Acta 70, 583 (1963).

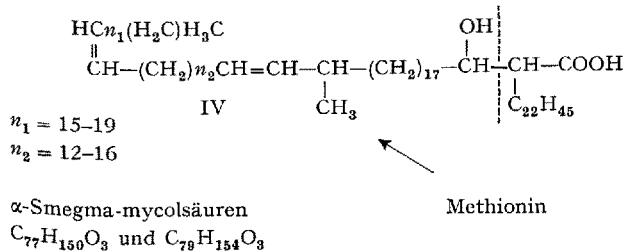
¹⁴ G. JAUREGUIBERRY, J. H. LAW, J. MCCLOSKEY und E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 258, 3587 (1964); Biochemistry, im Druck (1964).

¹⁵ R. RYHAGE und E. STENHAGEN, J. Lipid Res. 1, 361 (1960).

Gruppe vorhanden sind. Da im deuterierten Präparat auch normale Tuberkulostearinsäure vorhanden ist, erscheinen alle Peaks, die die deuterierte Methylgruppe enthalten, als Doublets (z.B. m/e 199–201, 269–271).

Wir werden noch im zweiten Kapitel auf den genaueren Mechanismus dieser Methyl- oder besser Methylenübertragung zu sprechen kommen.

Vor kurzem wurde in Gif ein neues Beispiel der C-Methylierung durch Methionin entdeckt; es handelt sich um eine der hochmolekularen Mycolsäuren, die für Mycobakterien so charakteristisch sind. Für eine dieser Säuren wurde von ETÉMADI et al.¹⁶ die Struktur (IV) vorgeschlagen und es wurde gezeigt, dass die Methylseitenkette von Methionin stammt (während die lange Seitenkette in α von Tetracosansäure kommt^{17,18}).



Für den biogenetischen Zusammenhang von Cyclopropan- und methylverzweigten Säuren ist es wohl interessant, dass bisher nur entweder eine oder die andere Art in einem und demselben Bakterienstamm bekannt war (z.B. Cyclopropanäuren in Lactobazillen, *E. coli*, usw. ..., Tuberkulostearinsäure in Mycobakterien, usw.).

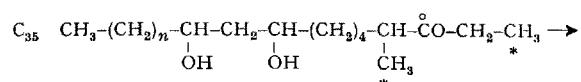
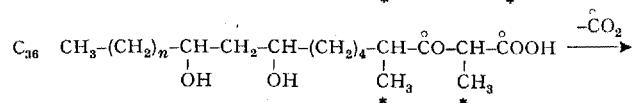
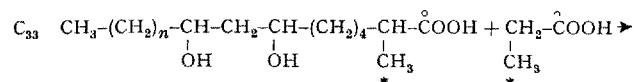
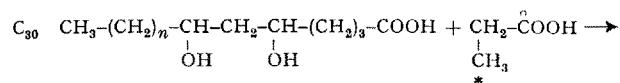
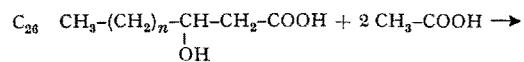
In letzter Zeit haben wir aber in Gif überzeugende Beweise erhalten, dass einige der hochmolekularen Mycolsäuren auch von Methionin stammende Cyclopropangruppen enthalten (M. GASTAMBIDE-ODIER und A. H. ETÉMADI, unveröffentlichte Versuche). Es scheint darum um so wahrscheinlicher, dass zwischen Cyclopropanbildung und C-Methylierung nahe Zusammenhänge bestehen.

(2) *Einbau von Propionsäure*. Die Verwendung von Propionsäure für die Biosynthese der von Streptomyceten erzeugten methylverzweigten Macrolide ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden: von GRISEBACH et al.¹⁹ und KANEDA et al.²⁰ für Erythronolid, von BIRCH et al.²¹ für Methymycin, von GRISEBACH und ACHENBACH²² sowie GILNER und SRINIVASAN²³ für Magnamycin, von BIRCH et al.²⁴ für Nystatin, usw.

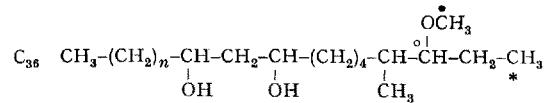
Dass die Propionsäure in ihrer «aktivierten Form» als Methylmalonsäure reagiert, ist von KANEDA und CORCORAN^{25a} sowie GRISEBACH et al.¹⁹ bewiesen worden (siehe auch^{25b}).

In Gif konnten wir zeigen, dass Propionsäure auch von Mycobakterien zum Aufbau von methylverzweigten Lipiden verwendet wird.

Die Biosynthese des Phthiocerols (VI) ist vor kurzem von GASTAMBIDE-ODIER geklärt worden²⁶; es erwies sich, dass die Methylgruppe des Methionins nur in die Methoxylgruppe des Phthiocerols eingebaut wird. Der verzweigte Teil der Kohlenstoffkette stammt aus Pro-



V Phthiodiolon



VI Phthiocerol

*C = C-Atomi aus $3-^{14}\text{C}$ -Natriumpropionat; $\circ\text{C}$ = C-Atom aus $1-^{14}\text{C}$ -Natriumpropionat; $\bullet\text{C}$ = C-Atom aus Methyl- ^{14}C -Methiouin

Biosynthese des Phthiocerols ($n = 20$ oder 22)

¹⁶ A. H. ETÉMADI, R. OKUDA und E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. Fr. 1964, 868.

¹⁷ A. H. ETÉMADI und E. LEDERER, Biochim. biophys. Acta, im Druck (1964).

¹⁸ Es sei hervorgehoben, dass die für (IV) vorgeschlagenen Bruttoreformeln hier durch Massenspektrometrie sichergestellt werden konnten. Für weitere Einzelheiten über Struktur und Biosynthese der Mycolsäuren siehe: J. ASSELINEAU und E. LEDERER, in K. BLOCH, *Lipid Metabolism* (Wiley, London 1960), p. 336. – J. ASSELINEAU, *Les lipides bactériens* (Hermann, Paris 1962). – E. LEDERER, Angew. Chem. 76, 241 (1964); 6th Intern. Congress of Biochemistry (New York 1964), im Druck.

¹⁹ H. GRISEBACH, H. ACHENBACH und U. C. GRISEBACH, Naturwiss. 47, 206 (1960). – H. GRISEBACH, W. HOFHEINZ und H. ACHENBACH, Z. Naturforsch. 17b, 64 (1962).

²⁰ T. KANEDA, J. C. BUTTE, S. B. TAUBMAN und J. W. CORCORAN, J. biol. Chem. 237, 322 (1962).

²¹ A. J. BIRCH, E. PRIDE, R. W. RICKARDS, P. J. THOMSON, J. D. DUTCHER, D. PERLMAN und C. DJERASSI, Chem. and Ind. 1960, 1245.

²² H. GRISEBACH und H. ACHENBACH, Z. Naturforsch. 17b, 6 (1962).

²³ D. GILNER und P. R. SRINIVASAN, Biochem. biophys. Res. Commun. 8, 299 (1962).

²⁴ A. J. BIRCH, C. W. HOLZAPFEL, R. W. RICKARDS, C. DJERASSI, M. SUZUKI, J. WESTLEY, J. D. DUTCHER und R. THOMAS, Tetrahedron Letters 1964, 1485, 1491.

²⁵ (a) T. KANEDA und J. W. CORCORAN, Fed. Proc. 20, 273 (1961). – (b) H. GRISEBACH, VII Corso Estivo di Chimica; Biogenesi delle Sostanze Naturali (Accad. Nazionale dei Lincei, Fondazione Donegani, 1964), p. 105.

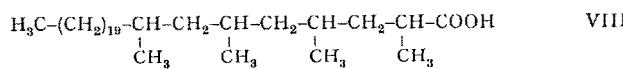
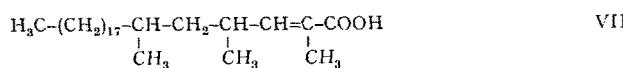
²⁶ M. GASTAMBIDE-ODIER, J. M. DELAUMÉNY und E. LEDERER, Chem. and Ind. 1963, 1285.

pionsäure. Das schon früher²⁷ vorgeschlagene Schema ist damit wahrscheinlich gemacht worden. Das als Vorstufe angesehene Phthiodiolon (V) ist ein häufiger Begleiter des Phthiocerols (VI).

Es stellt sich also heraus, dass von den zwei wichtigsten nur eine Methylverzweigung enthaltenden Fettstoffen der Mycobakterien (Tuberkulostearinsäure (I) und Phthiocerol (VI)) der erstere seine Verzweigung vom Methionin erhält, der andere von Propionsäure.

Diese Befunde zeigen erneut, wie gefährlich es ist, auf Grund struktureller Analogien Rückschlüsse auf biogenetische Vorgänge zu ziehen. Die Natur ist eben viel einfallsreicher und vielfältiger als der «Papierchemiker».

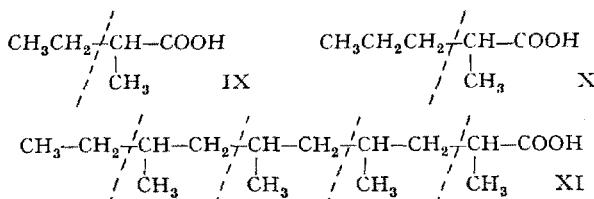
Propionsäure wird vom Tuberkelbazillus auch verwendet, um Verbindungen mit *mehreren* Methylverzweigungen aufzubauen. Es gibt in dieser Kategorie zwei Reihen von Säuren: die α, β -ungesättigten rechtsdrehenden Phthiensäuren (z.B. VII) und die gesättigten, linksdrehenden Mycocerosinsäuren (z.B. VIII).



Vorversuche mit GRISEBACH unter Verwendung von doppelt markierter Propionsäure (^3H in der Methylgruppe, ^{14}C in der Carboxylgruppe) hatten schon vor einigen Jahren den Einbau von Propionsäure nahegelegt. In neueren Versuchen wurde vor allem auf grösste Reinheit der C_{32} -Mycocerosinsäure Wert gelegt; durch wiederholte Gaschromatographie des Methylesters konnte diese Substanz in einheitlicher Form gewonnen werden, was durch Massenspektrometrie kontrolliert wurde. Die nach Inkubation von H_{37}R_a -Bazillen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionsäure erhaltenen radioaktiven C_{32} -Mycocerosinsäure wurde dann decarboxyliert, wobei 22% der Radioaktivität als CO_2 auftraten. Ein Einbau von 4 Molekülen Propionsäure hätte 25% ergeben müssen²⁸.

Es ist höchst wahrscheinlich, dass die Phthiensäuren (VII) ebenfalls nach demselben Prinzip aufgebaut werden²⁹.

Der Einbau von Propionsäure in methylverzweigte Fettsäuren ist anscheinend bei höheren Pflanzen noch nicht beobachtet worden; wohl aber ist ein solcher Ein-



bau im Tierreich bewiesen worden. So haben SAZ und WEIL³⁰ gezeigt, dass im *Ascaris* α -Methyl-Buttersäure (IX) und α -Methyl-Valeriansäure (X) auf diese Weise entstehen. Wir selber konnten in Gif zeigen, dass die von MURRAY^{31a} zuerst aus der Bürzeldrüse der Gans isolierte 2,4,6,8-Tetramethyldecansäure (XI) ebenfalls aus Propionsäure entsteht^{31b}.

II. Biosynthese der C-24-Seitenkette der Pflanzensterine

Die klassischen Untersuchungen von BLOCH, CORNFORTH, LYNEN, POPJÄK und anderen³² haben die Biosynthese des Sterinskelettes in Hefe und in höheren Tieren aufgeklärt; wir wissen jetzt, dass die wichtigsten Stufen von Acetat über Mevalonat zu Squalen führen und dass letzteres zu Lanosterin cyclisiert wird; dieses durchläuft dann mehrere Umwandlungen, wobei es drei Methylgruppen verliert, und das dadurch entstandene Zymosterin isomerisiert sich zu Desmosterin (XII), das der direkte Vorläufer des Cholesterins (XIII) im Tierkörper zu sein scheint^{33,34}.

Dass die Biogenese der Sterine in höheren Pflanzen ebenfalls demselben Schema entspricht, wurde in den letzten Jahren von mehreren Autoren experimentell bewiesen; so wurde der Einbau von Acetat und Mevalonat in Triterpene und Phytosterine sichergestellt^{35,36}.

Es kann daher kaum ein Zweifel bestehen, dass 27 Kohlenstoffatome der Phytosterine von Mevalonat über Lanosterin und (vielleicht) Desmosterin (XII) gebildet werden.

Nun ergibt sich die Frage der Herkunft der «Extra-Methylgruppe» (C-28) beim Ergosterin (XIV) und den

²⁷ E. LEDERER, Pure appl. Chem. 2, 587 (1961).

²⁸ M. GASTAMBIDE-ODIER, J. M. DELAUMÉNY und E. LEDERER, Biochim. biophys. Acta 70, 670 (1963).

²⁹ M. GASTAMBIDE-ODIER und J. M. DELAUMÉNY, unveröffentlichte Versuche.

³⁰ J. J. SAZ und A. WEIL, J. biol. Chem. 235, 914 (1960). — J. J. SAZ und A. WEIL, J. biol. Chem. 237, 2053 (1962).

³¹ (a) K. E. MURRAY, Austr. J. Chem. 15, 510 (1962). — (b) R. E. NOBLE, R. L. STJERNHOLM, D. MERCIER und E. LEDERER, Nature 199, 1600 (1963).

³² K. BLOCH, in *Vitamins and Hormones* (1957), Bd. 15, p. 119. — J. W. CORNFORTH, J. Lipid Res. 1, 3 (1959). — J. W. CORNFORTH, Pure appl. Chem. 2, 607 (1961). — G. POPJÄK und J. W. CORNFORTH, Adv. Enzymol. 22, 281 (1960). — F. LYNEN, H. EGGERER, U. HENNIG und I. KESSEL, Angew. Chem. 70, 738 (1958).

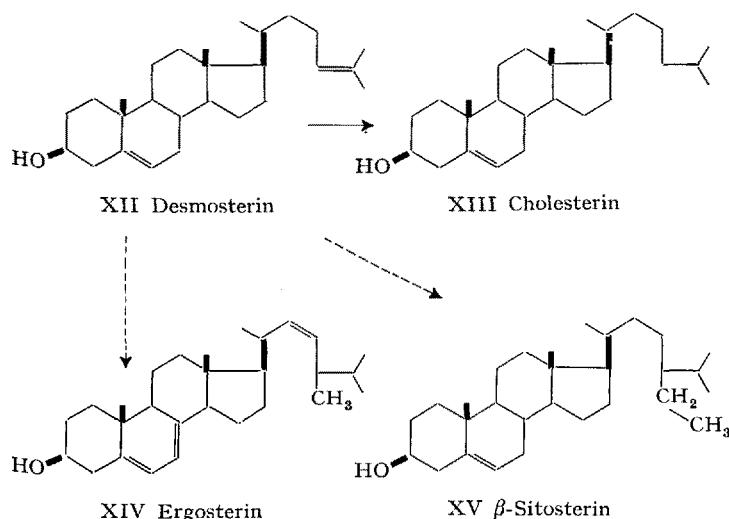
³³ W. M. STOKES, F. C. HICKEY und W. A. FISH, J. biol. Chem. 232, 347 (1958).

³⁴ Ein anderer Weg von Zymosterin über Lathosterin (Δ^7 -Cholestanol) und 7-Dehydrocholesterin ist in letzter Zeit vorgeschlagen worden. I. D. FRANTZ JR., A. T. SANGHIVI und G. J. SCHROEPFER JR., J. biol. Chem. 239, 1007 (1964). — M. E. DEMPSEY, J. D. SEATON, G. J. SCHROEPFER JR. und R. W. TROCKMAN, J. biol. Chem. 239, 1381 (1964).

³⁵ E. HEFTMANN, Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 225 (1963).

³⁶ R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, A. E. PURCELL und J. BONNER, Science 134, 671 (1961). — D. F. JOHNSON, E. HEFTMANN, G. V. C. HOUGHLAND, Arch. Biochem. Biophys. 104, 102 (1964). — H. J. NICHOLAS, J. biol. Chem. 237, 1476 (1962). — D. J. BAISTED, E. CAPSTICK JR. und W. R. NES, Biochemistry 1, 537 (1962). — E. G. GROS und E. LEETE, Chem. and Ind. 1963, 698. — A. R. BATTERSBY und G. F. PARRY, Tetrahedron Letters 1964, 787. — J. V. EUW und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 47, 711 (1964).

anderen C₂₈-Sterinen und der «Extra-Äthylgruppe», d.h. C-28 und C-29, beim β -Sitosterin (XV) und den anderen C₂₉-Phytosterinen.



Ursprung der «Extra-Methylgruppe» des Ergosterins. Im Jahre 1957 haben zuerst DANIELSSON und BLOCH³⁷ gezeigt, dass Formiat zum Einbau von C-28 in Ergosterin verwendet wird (siehe auch DAUBEN et al.³⁸).

Im selben Jahr zeigten dann ALEXANDER et al.³⁹, dass Methionin der direkte Methylspender für C-28 des Ergosterins ist, und PARKS⁴⁰ hat mit einem zellfreien, Ergosterin synthetisierenden enzymatischen System gefunden, dass S-Adenosylmethionin ein besserer Vorfänger als Methionin selbst ist.

ALEXANDER und SCHWENK⁴¹ haben dann aus Experimenten mit doppelt markiertem Methionin (¹⁴C und T in der Methylgruppe) geschlossen, dass alle drei Wasserstoffatome des Methionins mit dem Kohlenstoffatom übertragen werden.

Dies schien im Einklang mit früheren Arbeiten von DU VIGNEAUD et al.⁴², die die Biosynthese des Cholins und Kreatins studiert hatten; diese Autoren hatten intramolekular markiertes ¹⁴CD₃-Methionin verwendet und konnten feststellen, dass im Falle der von ihnen studierten N-Methylierung die ganze Methylgruppe des Methionins auf das Acceptor-molekül übertragen wird.

Es stellt sich aber nun heraus, dass der Isotopeneffekt des Tritiums bei den Versuchen von ALEXANDER und SCHWENK⁴¹ nicht beachtet wurde und dass ihre Resultate sich ebensogut mit dem Einbau von nur zwei H-Atomen vereinbaren lassen⁴³.

Wir beschlossen darum, auch hier CD₃-Methionin zu verwenden.

Ein «methionin-less»-Stamm von *Neurospora crassa* wurde vier Tage lang in Gegenwart von CD₃-Methionin inkubiert; das daraus isolierte Ergosterin wurde durch Gaschromatographie gereinigt und das Massenspektrum aufgenommen (Figur 2).

Man sieht hier wieder, dass *nur zwei* Deuteriumatome mit dem Kohlenstoffatom der Methylgruppe des Methionins übertragen werden.

Das Massenspektrum von «normalem» Ergosterin (XIV) hat einen Massenpeak bei m/e 396 und einen starken Peak bei m/e 253 entsprechend dem tetracyclischen Ringsystem (nach Verlust von H₂O und der Seitenkette). Das Massenspektrum des deuterierten Ergosterins hat einen Massenpeak bei m/e 398; der kleine Peak bei m/e 399 ist ausschliesslich auf die schweren Isotope des Peaks bei m/e 398 zurückzuführen. Es ist also keine Spur eines Peaks M+3 vorhanden. Der Peak bei m/e 253 ist unverändert, woraus geschlossen werden kann, dass, wie erwartet, die extra zwei Masseneinheiten sich in der Seitenkette befinden.

Da wir nun in zwei ziemlich verschiedenen Fällen (Tuberkulostearinsäure (I) aus *M. smegmatis* und Ergosterin (XIV) aus *N. crassa*) dieselbe Beobachtung gemacht haben, ist es wohl nötig, über den Mechanismus dieser «Methylenübertragung» nachzudenken.

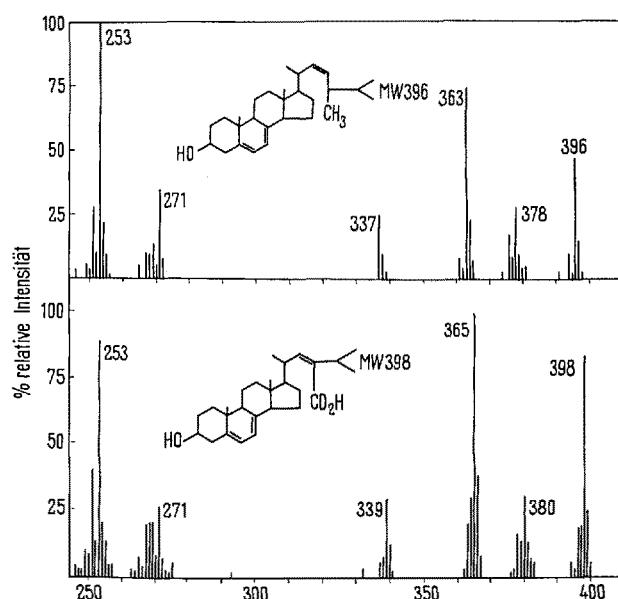


Fig. 2. Massenspektrum von Ergosterin; oben: normal, unten: deuteriert.

³⁷ H. DANIELSSON und K. BLOCH, J. Am. chem. Soc. 79, 500 (1957).

³⁸ W. G. DAUBEN, G. J. FONKEN und G. A. BOSWELL, J. Am. chem. Soc. 79, 1000 (1957).

³⁹ G. J. ALEXANDER, A. M. GOLD und E. SCHWENK, J. Am. chem. Soc. 79, 2967 (1957).

⁴⁰ L. W. PARKS, J. Am. chem. Soc. 80, 2023 (1958).

⁴¹ G. J. ALEXANDER und E. SCHWENK, J. Am. chem. Soc. 79, 4555 (1957).

Zunächst könnte man den Einwand machen, dass vielleicht ein Verlust von D-Atomen bei der Aktivierung des Methionins zu S-Adenosylmethionin stattfindet; dies scheint wenig wahrscheinlich zu sein, da DU VIGNEAUD et al.⁴² die Stabilität der CD₃-Gruppe bei ihren Versuchen über N-Methylierung gezeigt haben.

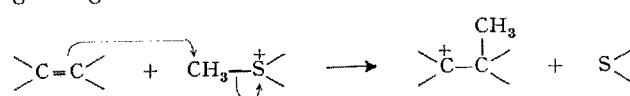
Es wäre ausserdem ein grosser Zufall, wenn bei einem solchen unspezifischen Austausch von Deuterium gerade nur D verloren ginge.

Neuerdings haben übrigens auch TROPP und LAW⁴⁴ einen Fall der C-Methylierung mit CD₃ gefunden, wo die ganze Gruppe übertragen wird: bei der Biosynthese von Thymidin aus Uridin in *E. coli* wurde ein CD₃-Thymidin erhalten.

Ein anderer Einwand wäre, dass nicht Methionin, aber Methylen-tetrahydrofolsäure der direkte Vorläufer ist; dies scheint höchst unwahrscheinlich, denn eines teils hat KISLIUK⁴⁵ gezeigt, dass die Reaktion Methylen-tetrahydrofolat → Methionin irreversibel ist, andererseits hat PARKS⁴⁶ gefunden, dass S-Adenosylmethionin für die Biosynthese des Ergosterins besser wirkt als Methionin.

C-Methylierungen bzw. C-Methylenierungen durch Methionin. Im «aktiven Methionin», dem S-Adenosylmethionin, ist die Methylgruppe Teil einer Methylsulfoniumgruppe (CH₃-S \langle); nach dem, was von den chemischen Eigenschaften solcher Gruppen bekannt ist, kann man mehrere Mechanismen in Betracht ziehen, durch die eine ungesättigte Substanz methyliert werden könnte.

(1) *Direkte Methylierung* durch Transfer der ganzen Methylgruppe des S-Adenosylmethionins auf einen ungesättigten Kohlenstoff:

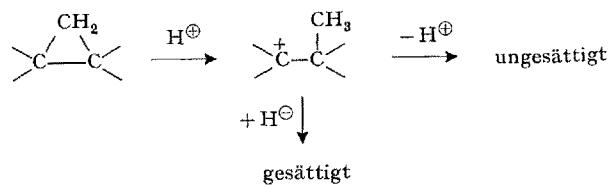


Diese Reaktion kann im Falle einer sehr stark nucleophilen Doppelbindung eintreten (z.B. mit Enaminen, Enolaten, Enoläthern, Enolen usw.). In den schon erwähnten Versuchen von TROPP und LAW⁴⁴ ist tatsächlich das Enamin Uridin zum CD₃-Thymidin methyliert worden.

Obige Reaktion ist hingegen wenig wahrscheinlich für den Fall von nicht aktivierten Doppelbindungen und scheint unwahrscheinlich für mit elektronenanziehenden Gruppen konjugierte Doppelbindungen (z.B. >C=C-C=O).

(2) *Indirekte Methylierung*, wobei S-Adenosylmethionin vor der Reaktion mit dem Substrat in eine andere, aktivierte Form übergeführt wird; dabei kann man wieder verschiedene Fälle unterscheiden:

(a) Bildung eines Cyclopropanderivates als Zwischenprodukt:

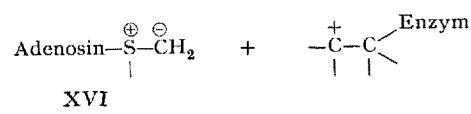


Die zur Überführung einer ungesättigten Verbindung in ein Cyclopropanderivat nötige Methylengruppe kann von einem vom S-Adenosylmethionin abgeleiteten Ylid (XVI) kommen (siehe auch LAW et al.⁴³). Es ist bekannt, dass Methylsulfoniumverbindungen leicht die entsprechenden Ylide geben und dass diese ihr Methylen an eine elektrophile Doppelbindung (z.B. >C=C-C=O) abgeben (siehe z.B. COREY⁴⁶).

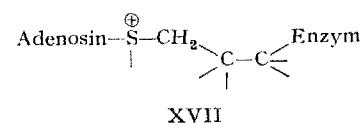
Eine nicht elektrophile Doppelbindung kann nicht spontan mit einem Ylid reagieren; es ist aber nicht ausgeschlossen, dass eine solche Doppelbindung unter der Wirkung eines Enzyms vorübergehend polarisiert wird und dadurch die Fähigkeit erlangt, mit einem Ylid zu reagieren:

Das so gebildete Zwischenprodukt (XVII) könnte entweder durch Reduktion zu einer C-Methylverbindung (XVIII) oder zu einem Cyclopropan (XIX) führen.

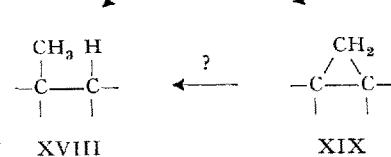
Es ist andererseits auch möglich, dass das Ylid erst ein Karben CH₂ gibt, welches dann mit einer nicht pola-



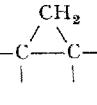
XVI



XVII



XVIII



XIX

⁴² V. DU VIGNEAUD, J. R. RACHELE und A. M. WHITE, J. Am. chem. Soc., 78, 5131 (1956).

⁴³ Der Isotopeneffekt von Tritium kann (bei 25°) 55 betragen (siehe L. MELANDER, *Isotope Effects on Reaction Rates* (Ronald Press Co., New York 1960), p. 22), d.h. der Verlust eines T-Atoms kann 55mal langsamer sein als der eines H-Atomes. Wenn man für die Versuche von ALEXANDER und SCHWENK⁴¹ nur einen kleinen Isotopeneffekt annimmt, z.B. 6, so wäre der theoretische Wert für ¹⁴C/T bei einem Transfer von CH₃ 92% in Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Autoren.

⁴⁴ B. TROPP und J. LAW, J. biol. Chem., im Druck (1964).

⁴⁵ R. L. KISLIUK, J. biol. Chem. 238, 397 (1963).

⁴⁶ E. J. COREY und M. CHAYKOVSKY, J. Am. chem. Soc. 84, 866, 867, 3782 (1962).

kann⁶³, und da die Bienen Pollen essen, ist ihr Sterin wahrscheinlich einfach aus der Nahrung übernommen.

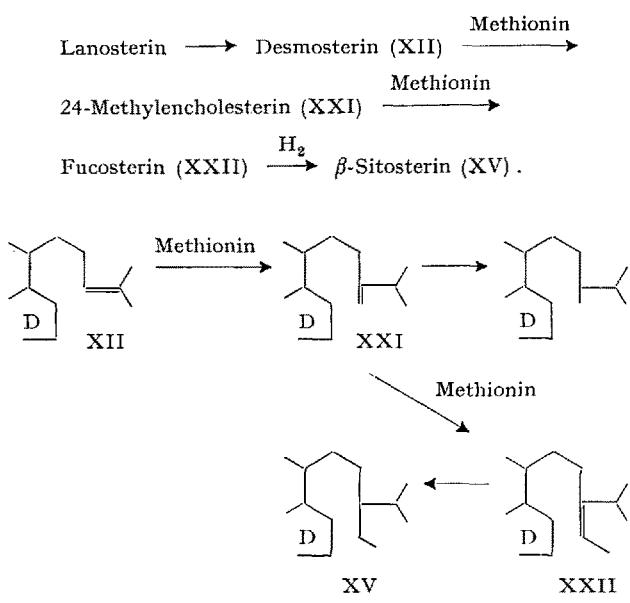
Vor kurzem haben wir dann die Pollensterine einer genaueren, massenspektrographischen Analyse unterworfen und haben festgestellt, dass es sich um ein Gemisch von C₂₇-, C₂₈- und C₂₉-Sterinen handelt, wobei in jeder Gruppe Substanzen mit einer und mit zwei Doppelbindungen existieren⁶⁴. Eine ähnliche Serie von Sterinen kommt auch in den Sporen von *Polystichum filix mas*⁶⁵ und in den Cotyledonen von *Phaseolus vulgaris* vor⁶⁶. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Gemische ganz allgemein in höheren Pflanzen existieren.

In diesem Gemisch von Pollensterinen kommen anscheinend folgende Komponenten vor: in der C₂₇-Gruppe: Cholesterin (XIII) und Desmosterin (XII) (?); ersteres ist schon von TSUDA et al.⁶⁷ als typisches Sterin der Rotalgen erkannt worden, und JOHNSON et al.⁶⁸ haben es auch in höheren Pflanzen aufgefunden (*Solanum tuberosum* und *Dioscorea spiculiflora*).

In der C₂₈-Gruppe kommen 24-Methylen-cholesterol (XXI) und Campesterin (24-Methyl-5-ergosten-3-ol) oder ein Stereoisomeres vor.

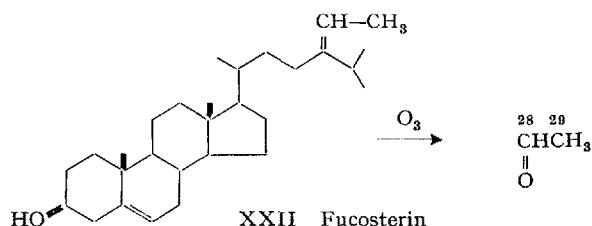
In der C₂₉-Gruppe gibt es wenigstens einen Vertreter mit einer Äthylidenseitenkette (z.B. Fucosterin XXII) und einen mit einer Äthylseitenkette (z.B. β-Sitosterin XV).

In dieser Analyse der Pollensterine waren also mehrere Vertreter einer biosynthetischen Serie aufgefunden worden, so dass wir folgendes Schema vorschlagen konnten⁶⁴:



Um die doppelte C-Methylierung mit Methionin auch experimentell zu studieren, wollten wir eine Fucosterin produzierende Alge verwenden; entgegen unseren Erwartungen enthielten aber mehrere *Nitella*- und *Nitzschia*-Stämme, die untersucht wurden, kein Fucosterin, sondern nur C₂₈- und C₂₉-Sterine mit gesättigter Seitenkette⁶⁹.

Schliesslich wurde eine Meeresbraunalge, *Laminaria sacharina*, verwendet; diese wurde eine Woche lang bei 15° mit ¹⁴CH₃-Methionin inkubiert und gab in guter Ausbeute radioaktives Fucosterin (XXII), dessen Seitenkette dann durch Ozonisierung abgespalten wurde; der entstandene Acetaldehyd wurde als 2,4-Dinitrophenylhydrazone isoliert, dann zu Essigsäure oxydiert und diese nach SCHMIDT⁷⁰ in ihre zwei Kohlenstoffatome gespalten; es ergab sich, dass beide Kohlenstoffatome (also C₂₈ und C₂₉ von Fucosterin) gleich stark radioaktiv waren.



Damit haben wir hier die Befunde von BADER et al.⁵⁷ für Fucosterin in Braunalgen bestätigt⁷¹.

Wie schon letztere Autoren vorgeschlagen haben, wäre eine 24-Methylenverbindung (XXI) die erste Stufe der doppelten C-Methylierung; wir haben eine solche Substanz, das 24-Methylencholesterol, als Pollen- und Bienensterin schon erwähnt (siehe oben).

Schliesslich sei noch die Frage der eventuellen Rolle des Ethionins diskutiert; dieses Homologe des Methionins ist vor kurzem als natürliche Aminosäure in Bakterien aufgefunden worden^{72,73}; in Analogie zur Rolle des Methionins in der Biosynthese des Ergosterins hätte man eine Beteiligung des Ethionins in der Biosynthese der C₂₉-Sterine annehmen können.

Dies scheint aber höchst unwahrscheinlich, denn CASTLE et al.⁵⁵ sowie NICHOLAS und MORIARTY⁵⁶ haben schon parallele Einbauversuche mit radioaktivem L-Ethionin und L-Methionin gemacht und haben gefunden, dass ersteres viel weniger in β-Sitosterin eingebaut wird als Methionin.

⁶³ M. BARBIER, M. F. HÜGEL und E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 91 (1960).

⁶⁴ M. F. HÜGEL, W. VETTER, H. AUDIER, M. BARBIER und E. LEDERER, Phytochemistry 3, 7 (1964).

⁶⁵ P. DUPÉRON, W. VETTER und M. BARBIER, Phytochemistry 3, 89 (1964).

⁶⁶ P. DUPÉRON, C. R. Soc. Biol. 157, 2268 (1963).

⁶⁷ K. TSUDA, S. AGAKI, Y. KISHIDA, R. HAYATSU und K. SAKAI, Chem. pharm. Bull. Tokyo 6, 724 (1958).

⁶⁸ D. J. JOHNSON, R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, Science 140, 198 (1963).

⁶⁹ Dies war anscheinend schon bekannt (persönliche Mitteilung von Dr. J. LAW).

⁷⁰ K. F. SCHMIDT, Ber. dtsch. chem. Ges. 57, 704 (1924). – E. F. PHARES, Arch. Biochem. 33, 173 (1951). – Siehe auch S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, B. IV, p. 458.

⁷¹ V. VILLANUEVA, M. BARBIER und E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. Fr. 1964, 1423.

⁷² J. D. LOERCH und M. F. MALLETT, Arch. Biochem. Biophys. 103, 272 (1963).

⁷³ Ethionin selber könnte aus Methionin durch C-Methylierung mit einer zweiten Molekel Methionin entstehen.

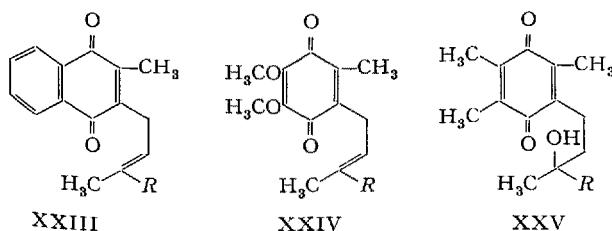
III. Über die mögliche Rolle der 2-Methylgruppe im Vitamin K und in den Ubichinonen

In den ersten zwei Teilen dieses Berichtes haben wir uns besonders für den Ursprung einiger Methylgruppen interessiert; in diesem dritten Teil werden wir hauptsächlich die mögliche Funktion einer besonderen Methylgruppe in mehreren Kategorien natürlicher, biologisch wichtiger Chinone diskutieren:

Drei hauptsächliche Gruppen von natürlichen 2-Methyl-3-oligoisoprenyl-Chinonen sind bekannt:

Chinone der Vitamin-K-Gruppe (XXIII); die Ubichinone (auch Coenzyme Q genannt) (XXIV); die Tocopherylchinone, die durch Oxydation aus den

Tocopherolen (Vitamin E) entstehen (XXV).



Die 2-Methylgruppe scheint in allen diesen Substanzen für die biologische Wirkung unentbehrlich zu sein⁷⁴; in den Chinonen der Vitamin-K- und Ubichinonreihe ist außerdem die dem Chinonring nächste Doppelbindung ebenfalls unentbehrlich⁷⁵.

Wir werden uns im folgenden hauptsächlich mit den Verbindungen der Vitamin-K-Gruppe beschäftigen. Es soll zunächst hier daran erinnert werden, welch hervorragende Rolle in der Isolierung und Strukturbestimmung der K-Vitamine PAUL KARRER geleistet hat⁷⁶.

Die einfachste Verbindung mit Vitamin-K-Wirkung ist das Menadion (2-Methyl-1, 4-Naphthochinon) (XXVI); alle anderen Vitamin-K-aktiven Substanzen besitzen ebenfalls diese 2-Methylgruppe, wie vor allem die ausgedehnten Untersuchungen von FIESER et al.⁷⁵ gezeigt haben.

Aus den Arbeiten von MARTIUS⁷⁷ folgt, dass Menadion wahrscheinlich nur ein Provitamin K ist, d.h. dass der Tierkörper eine ungesättigte isoprenoide Seitenkette in 3 «anhängt» und dadurch z.B. Vitamin K₂⁽²⁰⁾ produziert.

Unser allgemeines Interesse für 2-Methylnaphthochinone hat uns dazu geführt, eine von KOFLER⁷⁸ 1945 beschriebene Farbreaktion von Menadion näher zu studieren.

Dieser Autor hatte beobachtet, dass Menadion (XXVI), mit *o*-Phenyldiamin (XXVII) in Essigsäure erhitzt, ein fluoreszierendes Kondensationsprodukt ergibt, dem er die Formel C₁₇H₁₄N₂ zuschrieb und das er für die Kolorimetrie von Menadion empfahl. Eine solche Kondensation von *o*-Phenyldiamin mit einem *p*-Chinon ist anomal; wir haben gefunden, dass bei der chromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte sich zwei Substanzen in ungefähr gleicher Ausbeute isolieren lassen: Substanz A, Smp. 174–175°, C₁₇H₁₂N₂, die keine Fluoreszenz zeigt, und eine zweite, fluoreszierende Substanz B, Smp. 154–156°.

Wir konnten zeigen, dass Substanz A mit dem von FIESER und BRADSHER⁷⁹ aus 4-Methyl-1,2-Naphtho-

⁷⁴ Die 2-Methylgruppe der Ubichinone kommt von Methionin [H. RUDNEY und W. W. PARSON, J. biol. Chem. 238, 3137 (1963). – R. E. OLSON et al., J. biol. Chem. 238, PC 3146 (1963)]. Der Ursprung der entsprechenden Methylgruppe der Vitamine K und E scheint noch unbekannt zu sein. In den Plastochinonen, die beim Elektronentransport in den Chloroplasten mitwirken, fehlt die 2-Methylgruppe [M. KOFLER et al., Helv. chim. Acta 42, 2252 (1959). – F. L. CRANE, Plant Physiol. 34, 128, 546 (1959)].

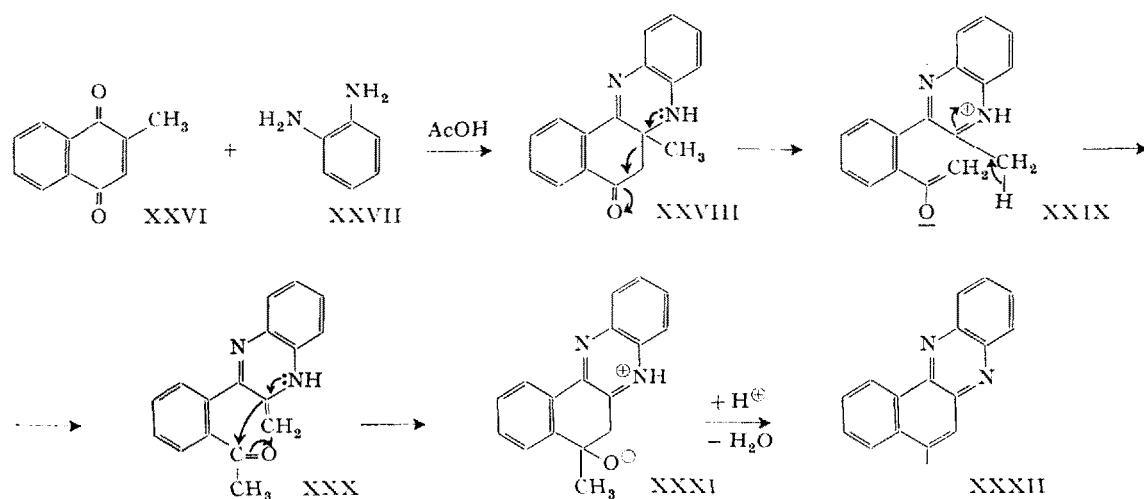
⁷⁵ L. F. FIESER, M. TISHLER und W. L. SAMPSON, J. biol. Chem. 137, 659 (1941). – A. F. BRODIE, Fed. Proc. 20, 995 (1961).

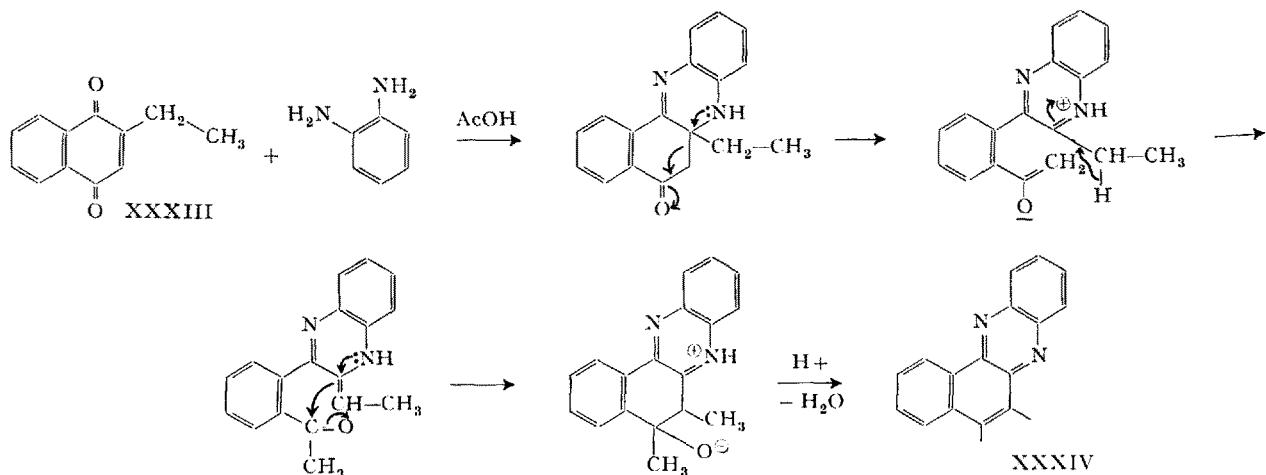
⁷⁶ H. DAM, A. GEIGER, J. GLAVIND, P. KARRER, W. KARRER, E. ROTHSCHILD und H. SALOMON, Helv. chim. Acta 22, 310 (1939). – P. KARRER und A. GEIGER, Helv. chim. Acta 22, 945 (1939). – P. KARRER, Helv. chim. Acta 22, 1146 (1939). – P. KARRER, A. GEIGER, R. LEGLER, A. RÜEGGER und H. SALOMON, Helv. chim. Acta 22, 1464 (1939).

⁷⁷ C. MARTIUS und H. O. ESSER, Biochem. Z. 331, 1 (1958). – M. BILETER und C. MARTIUS, Biochem. Z. 333, 430 (1960).

⁷⁸ M. KOFLER, Helv. chim. Acta 28, 702 (1945).

⁷⁹ L. F. FIESER und C. K. BRADSHER, J. Am. chem. Soc. 61, 417 (1939).



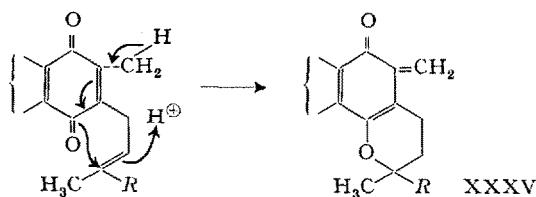


chinon und *o*-Phenyldiamin hergestellten Chinoxalin (XXXII) identisch ist. Die unerwartete Bildung dieser Substanz aus Menadion ist anscheinend durch den folgenden Mechanismus zu erklären: Addition von *o*-Phenyldiamin in 1,2 an Menadion, wodurch (XXVIII) entsteht, dann eine «Retro-Mannich»-Spaltung, die über die Zwischenstufe (XXIX) zu einem Methylketon (XXX) führt, das sich dann zu (XXXI) kondensiert und schliesslich zu dem Chinoxalin (XXXII) aromatisiert.

In ganz ähnlicher Weise konnten wir zeigen, dass das 2-Äthyl-1,4-Naphthochinon (XXXIII) in ein Dimethylchinoxalin (XXXIV) übergeführt wird⁸⁰.

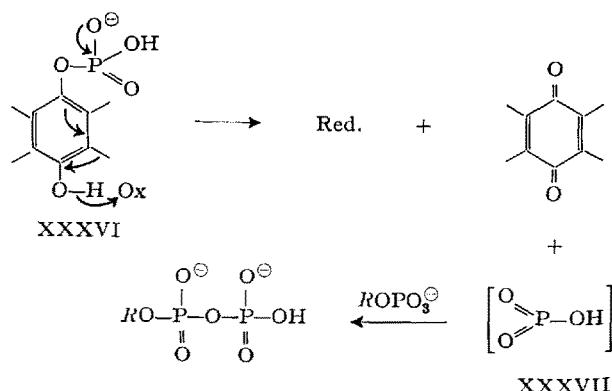
Die Struktur der Substanz B ist noch nicht aufgeklärt.

Im folgenden wollen wir nun zeigen, dass die beiden essentiellen Strukturmerkmale der Vitamin-K- und Ubichinongruppe, d.h. die 2-Methylgruppe und die eine β,γ -Doppelbindung, zusammenwirken und unter Ringschluss ein Methylenchinon-chroman (XXXV) ergeben, das anscheinend eine biologisch wichtige Rolle spielt.



Der Anreiz zum Studium dieser Verbindungen kommt von der möglichen Rolle von Chinolophosphaten in der oxydativen Phosphorylierung.

CLARK et al.⁸¹ haben zuerst gezeigt, dass die Oxydation *in vitro* von Chinolophosphaten (XXXVI) «aktives Metaphosphat» (XXXVII) erzeugen kann, das dann mit anorganischem Phosphat Pyrophosphat, mit AMP aber ADP gibt. (Siehe auch die neueren Arbeiten von LAPIDOT und SAMUEL⁸²; TOMASI und DALLAM⁸³.)



Da Chinone der Vitamin-K- und Ubichinongruppe als mögliche Zwischenprodukte in der oxydativen Phosphorylierung betrachtet worden sind⁸⁴ (und zwar die Ubichinone in tierischen Zellen, die K-Vitamine in Bakterien), muss die Frage studiert werden, wie solche Chinolophosphate *in vivo*, ohne Mitwirkung eines energiereichen Phosphates, entstehen.

Einfache Mechanismen, die eine 1,2-Addition von Phosphat an ein Carbonyl eines Chinons in Betracht ziehen, sind schon von WIELAND und PATTERMAN⁸⁵ und von CLARK und TODD⁸⁶ vorgeschlagen worden.

CHMIELEWSKA⁸⁷ hat ein anderes Schema ausgearbeitet, bei dem gleichzeitig eine Cyclisierung mit Hilfe der

⁸⁰ H. IMMER, E. LEDERER, J. POLONSKY und E. WENKERT, Intern. Symposium on the Chemistry of Natural Products (Kyoto 1964), Abstracts of Papers, p. 303.

⁸¹ V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON, G. W. KIRBY und Sir A. TODD, J. chem. Soc. 1961, 715.

⁸² A. LAPIDOT und D. SAMUEL, J. Am. chem. Soc. 86, 1886 (1964).

⁸³ G. E. TOMASI und R. D. DALLAM, J. biol. Chem. 239, 1604 (1964).

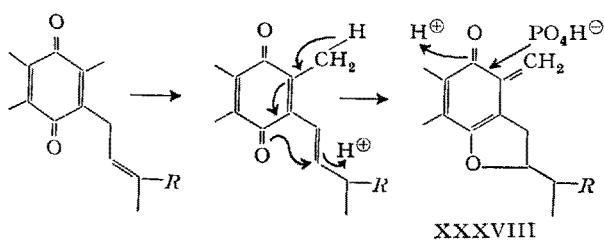
⁸⁴ A. F. BRODIE und J. BALLANTINE, J. biol. Chem. 235, 226, 232 (1960). — A. ASANO, A. F. BRODIE, A. F. WAGNER, P. E. WITTREICH und K. FOLKERS, Fed. Proc. 21, 54 (1962); J. biol. Chem. 237, PC 2411. — W. GRUBER, R. HÖHL und T. WIELAND, Biochem. biophys. Res. Commun. 12, 242 (1963).

⁸⁵ T. WIELAND und F. PATTERMAN, Chem. Ber. 92, 2917 (1959).

⁸⁶ V. M. CLARK und Sir A. TODD, Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport (Churchill, London 1961).

⁸⁷ I. CHMIELEWSKA, Biochim. biophys. Acta 39, 170 (1960).

β,γ -Doppelbindung der Seitenkette und Ausbildung eines Methylenchinons (XXXVIII) stattfindet.



Inzwischen hatten RUSSEL, BRODIE et al.^{88,89} gezeigt, dass ein 6-Chromanylphosphat des Vitamins K₂ (XLII) sich aus Vitamin K₂ in bakteriellen Systemen bilden kann und vielleicht ein Zwischenprodukt der oxydativen Phosphorylierung ist⁹⁰.

Vor etwa zwei Jahren haben wir zuerst mit VILKAS⁹¹ das Schema von CHMIELEWSKA⁸⁷ modifiziert, indem wir eine 1,4-Addition von Phosphat an das intermediäre Methylenchinon-chroman (XXXIX) vorschlugen.

Dieses Schema kann kurz folgendermassen zusammengefasst werden: (1) Vitamin K (XXIII) isomerisiert sich zunächst zum Methylenchinon-chroman (XXXIX). (2) Dieses addiert dann anorganisches Phosphat in 1,4, wodurch das Benzylphosphat (XL) entsteht; solche 1,4-Additionen an *o*- oder *p*-Methylenchinone sind in der Literatur schon bekannt gewesen⁹². (3) Eine intramolekulare Migration bringt das Phosphat auf das phenolische Hydroxyl. (4) Reduktion des dadurch entstandenen Benzylalkohols (XLI) gibt das schon von ASANO et al.⁸⁹ beschriebene Chromanylphosphat (XLII). (5) Dieses kann sich dann zum Hydrochinonphosphat (XLIII) isomerisieren, das nach Oxydation «aktives Metaphosphat» und das Ausgangs- chinon ergibt, wie schon CLARK et al.⁸¹ gezeigt haben.

Für weitere Details und einige Varianten dieses Schemas sei auf die Arbeit von VILKAS verwiesen⁹¹ (siehe auch CLARK⁹³).

Im letzten Jahr sind die ersten zwei Etappen dieses Schemas, d. h. die Bildung von Methylenchinon-chromanen und die 1,4-Addition an diese Verbindungen, experimentell erhärtet worden.

Zunächst haben WAGNER et al.^{94,95} gezeigt, dass Vitamin K₁₍₂₀₎ in schwefelsaurer Lösung in das Hydroxychinon (XLIII) übergeführt wird, welches dann eine ölige Substanz ergab, dem sie die Struktur eines Dimeren (XLIV) zuschrieben; die Bildung dieses Dimeren kann nur durch die vorhergehende Entstehung des Methylenchinons (XXXVI) erklärt werden.

Inzwischen hatten MAMONT et al.⁹⁶ auch die Dimerisierungsreaktion untersucht und ein kristallisiertes Di-

⁸⁸ P. J. RUSSEL und A. F. BRODIE, Biochim. biophys. Acta 50, 76 (1961).

⁸⁹ A. ASANO, A. F. BRODIE, A. F. WAGNER, P. E. WITTREICH und K. FOLKERS, Fed. Proc. 21, 54 (1962).

⁹⁰ P. H. GALE, B. H. ARISON, N. R. TRENNER, A. C. PAGE und K. FOLKERS [Biochemistry 2, 200 (1964)] haben gezeigt, dass das Vitamin K₂ von *M. phlei* eine C₄₆-Seitenkette hat, in der ein einziger Isoprenrest abgesättigt ist; aus NMR-Messungen schlossen sie, dass es weder der erste noch der letzte ist; in unserem Laboratorium haben R. AZERAD und Mme GUÉRIN aus *M. phlei* und *M. smegmatis* dieselbe Substanz isoliert und die von den amerikanischen Autoren vorgeschlagene Bruttoformel C₆₆H₈₂O₈ (Molgew. 786) durch Massenspektrometrie (mit einem MS9 in Manchester von Dr. M. BARBER ausgeführt) bestätigt.

⁹¹ M. VILKAS und E. LEDERER, Experientia 18, 546 (1962).

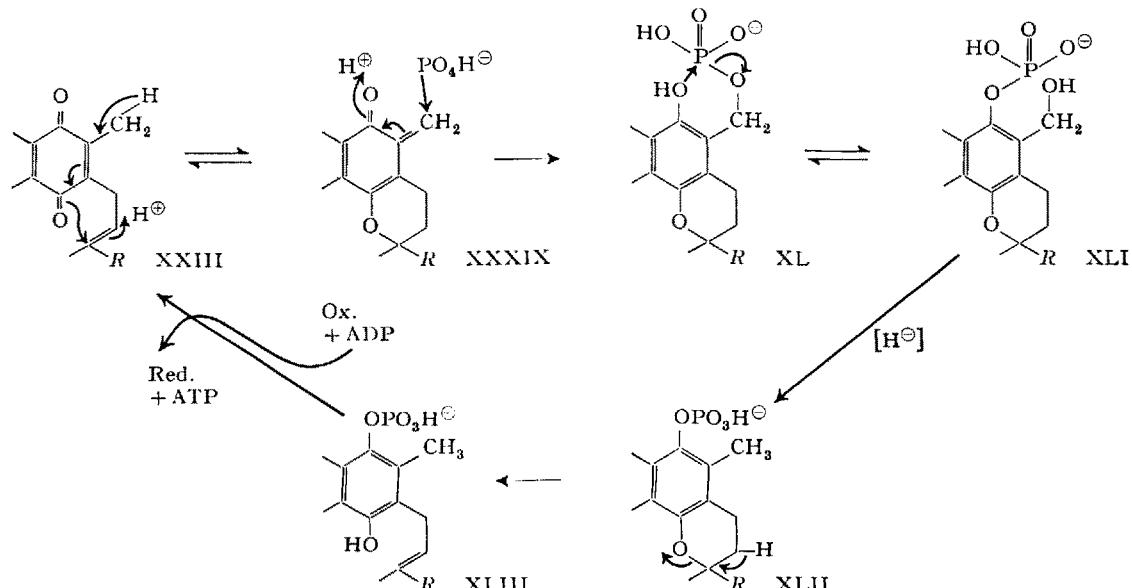
⁹² K. HULTZSCH, Angew. Chem. 60, 179 (1948). – R. W. MARTIN, *The Chemistry of Phenolic Resins* (John Wiley, New York 1956), p. 139.

⁹³ V. M. CLARK, in 14. Mosbacher Colloquium (Springer-Verlag 1963).

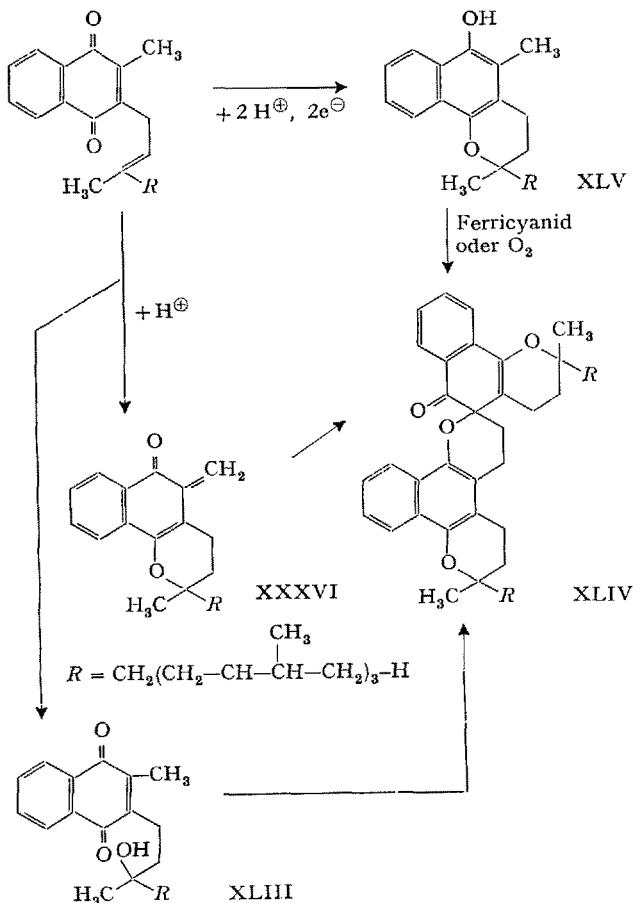
⁹⁴ A. F. WAGNER, A. LUSI, C. H. SHUNK, B. O. LINN, D. E. WOLF, C. H. HOFFMAN, R. E. ERICKSON, B. ARISON, R. N. TRENNER und K. FOLKERS, J. Am. chem. Soc. 85, 1534 (1963).

⁹⁵ R. E. ERICKSON, A. F. WAGNER und K. FOLKERS, J. Am. chem. Soc. 85, 1535 (1963).

⁹⁶ P. MAMONT, R. AZERAD, P. COHEN, M. VILKAS und E. LEDERER, C. R. Acad. Sci. 257, 706 (1963).

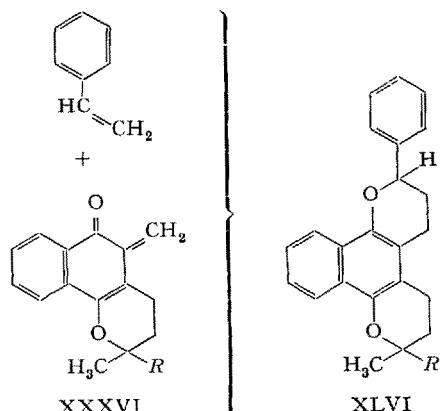


meres mit Smp. 77–79° erhalten. Dasselbe Dimere (XLIV) wird auch durch Oxydation des Naphthochromans (XLV) mit Ferricyanid erhalten.



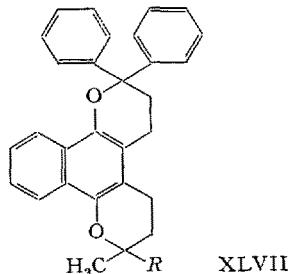
Vor kurzem konnten wir die Struktur des Dimeren (XLIV) durch Massenspektrometrie bestätigen (Molgew. ber. 900; gefunden 900; gleichzeitig ist auch ein Peak bei 450 entsprechend dem Monomeren zu beobachten (Messungen von Dr. M. BARBER am MS9 von A. E. I., Manchester, England).

Ein weiterer Beweis der intermediären Ausbildung des Methylenchinons (XXXVI) aus Vitamin K₁₍₂₀₎ in Perchlorsäure wurde durch Kondensation mit Styren erbracht. Das Kondensationsprodukt hat die Struktur



(XLVI), die auch durch Massenspektrometrie kontrolliert wurde (Peaks bei m/e 554 entsprechend dem Kondensationsprodukt (XLVI) und bei m/e 450 (Vitamin K₁₍₂₀₎) und m/e 104 (Styren); die beiden letzteren sind durch eine «Retro-Diels-Spaltung» zu erklären)⁹⁶.

Eine ähnliche Kondensation von Vitamin K₁₍₂₀₎ mit asym. Diphenyläthylen ergab ebenfalls das erwartete Produkt (XLVII) (R. AZERAD, P. MAMONT und M. VILKAS, unveröffentlichte Versuche).



Eine Bestätigung der Struktur dieser Additionsprodukte konnte vor kurzem von AZERAD und VILKAS (unveröffentlichte Versuche) durch Synthese erbracht werden: 1,4-Dihydroxy-naphthalin wurde mit Zinnamylbromid zur Verbindung (XLVIII) umgesetzt, diese wurde dann mit Dimethyl-allylbromid kondensiert und ergab (IL); durch Cyclisierung wurde eine Substanz (L) erhalten, die mit dem Kondensationsprodukt von Vitamin K₁₍₅₎ (LI) mit Styren identisch war.

Diese unabhängig von zwei verschiedenen Laboratorien beschriebenen Reaktionen scheinen keinen Zweifel zu lassen, dass Vitamin K sich in saurer Lösung zu dem entsprechenden Methylenchinon-chroman (XXXVI) isomerisiert⁹⁷.

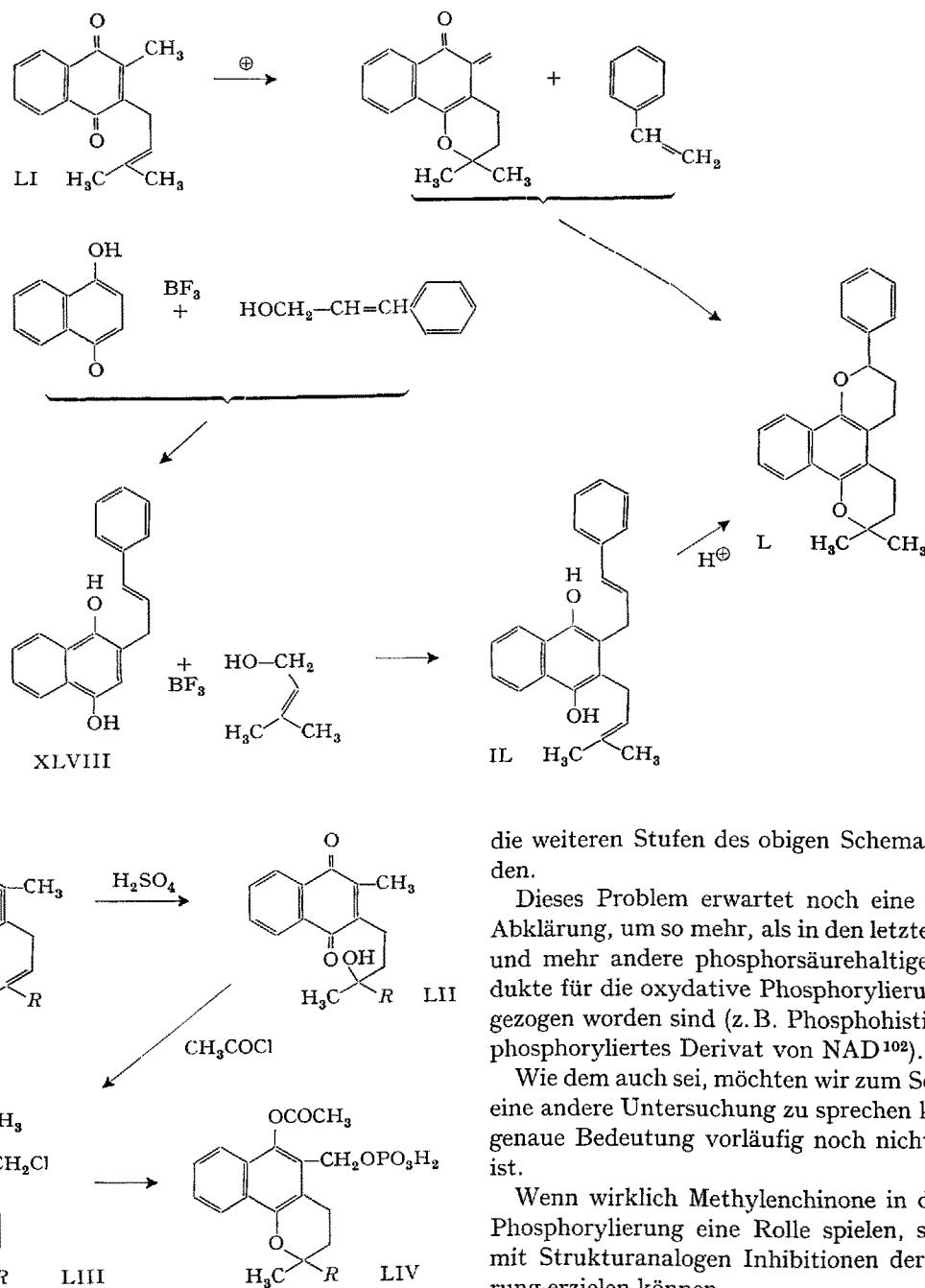
Es sei daran erinnert, dass die Dimerisierung der Tocopherole schon von SCHUDEL et al.⁹⁸ beschrieben worden ist; auch hier muss die Bildung eines Methylenchinons als Zwischenprodukt angenommen werden. CAMERON et al.⁹⁹ haben solche Isomerisierungen zu Methylenchinonen auch am Durochinon beschrieben.

WAGNER et al.¹⁰⁰ haben durch Behandlung des Hydroxychinons (LII) mit Acetylchlorid ein 5-Chloro-methyl-6-chromanylacetat (LIII) erhalten; diese Reaktion ist als 1,4-Addition an das intermediäre Methylen-chinon (XXXVI) zu erklären. In unserem Laboratorium wurde direkt aus Vitamin K₁₍₂₀₎ in Perchlora-

⁹⁷ Dass diese Isomerisierung in saurer Lösung auch reversibel ist, konnte kürzlich durch Markierung von Vitamin K₁₍₂₀₎ mit Tritium in tritiertem Wasser, in Gegenwart von Perchlorsäure, festgestellt werden (R. AZERAD, P. COHEN, P. MAMONT, M. VILKAS und E. LEDERER, IUPAC Symposium on Chemistry of Natural Compounds, Kyoto 1964).

⁹⁸ P. SCHUDEL, H. MAYER, J. METZGER, R. RÜEGG und O. ISLER, Helv. chim. Acta 46, 636 (1963).

⁹⁹ D. W. CAMERON, P. M. SCOTT und LORD TODD, J. chem. Soc. 1964, 42.



säure, mit Acetylchlorid, das Acetat (LIII) in 70prozentiger Ausbeute erhalten (R. AZERAD und P. MAMONT, unveröffentlichte Versuche).

Durch Behandlung des Chloromethyl-Acetates (LIII) mit Silber-dibenzyl-phosphat haben WAGNER et al.¹⁰⁰ nach Entbenzylierung das 5-Phosphomethyl-6-chromanyl-acetat (LIV) erhalten; sie schreiben, dass diese Verbindung «is more productive than previously reported hydroquinone monophosphates and 6-chromanyl phosphates for studies of biological oxidative phosphorylation».

Sie nehmen an, dass die Oxydation dieses Benzylphosphates «aktives Phosphat» ergeben könnte, so dass

die weiteren Stufen des obigen Schemas unnötig würden.

Dieses Problem erwartet noch eine experimentelle Abklärung, um so mehr, als in den letzten Jahren mehr und mehr andere phosphorsäurehaltige Zwischenprodukte für die oxydative Phosphorylierung in Betracht gezogen worden sind (z.B. Phosphohistidin¹⁰¹ oder ein phosphoryliertes Derivat von NAD¹⁰²).

Wie dem auch sei, möchten wir zum Schluss noch auf eine andere Untersuchung zu sprechen kommen, deren genaue Bedeutung vorläufig noch nicht zu übersehen ist.

Wenn wirklich Methylenchinone in der oxydativen Phosphorylierung eine Rolle spielen, so müsste man mit Strukturanalogen Inhibitionen der Phosphorylierung erzielen können.

HOWLAND¹⁰³ hat kürzlich die entkoppelnden und inhibierenden Eigenschaften von 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinonen studiert und gefunden, dass diejenigen Substanzen, die eine 2',3'-ungesättigte Seitenkette in 3-Stellung besitzen (d.h. Lapachol und Lomatiol), die oxydative Phosphorylierung entkoppeln, während die-

¹⁰⁰ A. F. WAGNER, A. LUSI, R. E. ERICKSON, B. ARISON, N. R. TRENNER und K. FOLKERS, J. Am. chem. Soc. 85, 3793 (1963).

¹⁰¹ P. D. BOYER, D. E. HULTQUIST, J. B. PETER, G. KREIL, R. A. MITCHELL, M. DELUCA, J. W. HINKSON, L. BUTLER und R. W. MOYER, Fed. Proc. 22, 1080 (1963).

¹⁰² D. E. GRIFFITHS, Fed. Proc. 22, 1064 (1963).

¹⁰³ J. L. HOWLAND, Biochim. biophys. Acta 77, 659 (1963).

jenigen, die eine gesättigte Seitenkette enthalten (Hydrolapachol usw.), die oxydative Phosphorylierung hemmen, so wie Oligomycin.

HOWLAND¹⁰³ schliesst aus diesen Versuchen, dass sie im Einklang mit einer Rolle von Chromanen in der oxydativen Phosphorylierung sind.

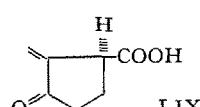
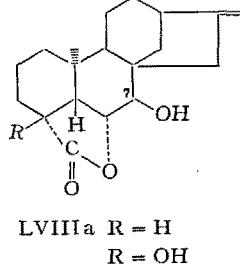
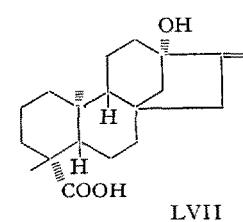
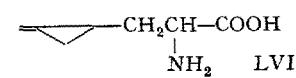
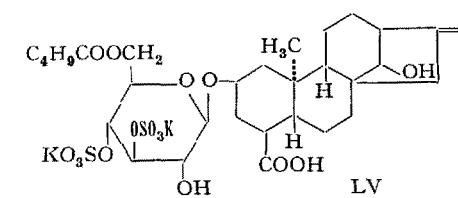
Einer der aktivsten Inhibitoren der oxydativen Phosphorylierung in mitochondrialen Systemen ist Atractylosid¹⁰⁴, eine hypoglykämische Substanz aus der nordafrikanischen Distel *Atractylis gummifera*, für die vor kurzem AJELLO et al.¹⁰⁵ die Struktur (LV) vorgeschlagen haben.

Hydrierung der Methylengruppe des Atractylosids hebt die inhibierende Wirkung auf, wodurch gezeigt wird, dass das Methylen anscheinend eine «aktive Gruppe» in dieser Substanz ist.

VIGNAIS und VIGNAIS¹⁰⁶ haben kürzlich geschlossen, dass Atractylosid durch Verbindung mit einem energiereichen phosphorylierten Zwischenprodukt wirkt.

Es ist vielleicht kein Zufall, dass eine andere hypoglykämische Substanz, Hypoglycin (LVI) aus *Blighia sapida*, ebenfalls eine Methylengruppe hat; VIGNAIS und VIGNAIS¹⁰⁷ haben Hypoglycin in ihrem System als inaktiv befunden, aber DE ROFF et al.¹⁰⁸ haben gefunden, dass die oxydative Phosphorylierung in mit Hypoglycin behandelten Tieren gehemmt ist; auch hier hebt die Absättigung der Doppelbindung die biologische Aktivität auf.

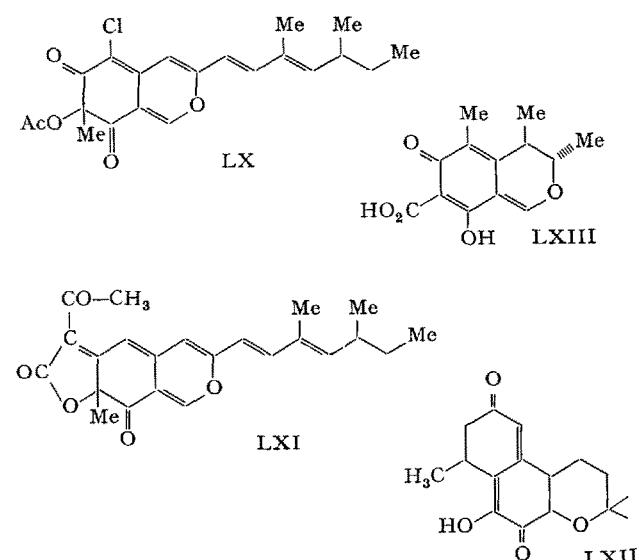
In neuester Zeit haben VIGNAIS und VIGNAIS¹⁰⁷ eine ganze Reihe anderer Substanzen auf unseren Vorschlag hin auf inhibierende Wirkung in mitochondrialen Systemen untersucht.



Da Atractylosid ein Glycosid eines Diterpens ist, wurden auch andere Diterpenderivate mit Methylengruppe untersucht. Als aktiv wurden gefunden: Steviol (LVII) und 7-Hydroxykaurenolid (LVIIIa); als inaktiv wurden gefunden: Steviosid (in dem das Hydroxyl und das Carboxyl von Steviol glykosidiert sind) und 7,18-Dihydroxykaurenolid (LVIIIb).

Das antitumorale Antibiotikum Sarcomycin (LIX) wirkt ebenfalls inhibierend, wenn auch schwach.

Von aromatischen Analogen von Methylenchinonen wurden inhibierend gefunden: Sklerotiorin sowie Episklerotiorin (LX), Rotiorin (LXI) sowie Fuscin (LXII), während Citrinin (LXIII) inaktiv war.



Es ist noch viel zu früh, um hier allgemeinere Schlüsse zu ziehen, aber wir wollen diese Arbeit fortsetzen und erweitern, um so mehr, als WHITEHOUSE¹⁰⁹ vor kurzem einen Zusammenhang von entkoppelnder und antiinflammatorischer Wirkung aufgezeigt hat.

Zum Schlusse sei noch darauf hingewiesen, dass auch, ganz abgesehen von einem eventuellen Zusammenhang mit oxydativer Phosphorylierung, Vitamin K und seine Derivate eine vollkommen sichergestellte, wenn auch

¹⁰⁴ A. L. BRUNI, A. R. CONTESSA und S. LUCIANI, Biochim. biophys. Acta 60, 301 (1962). — P. V. VIGNAIS, P. M. VIGNAIS und E. STANISLAS, Biochim. biophys. Acta 60, 284 (1962). — A. R. CONTESSA und G. FASSINA, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 39, 344 (1963).

¹⁰⁵ T. AJELLO, F. PIAZZI, A. QUILLICO und V. SPRIRO, Gazz. chim. Ital. 93, 867 (1963). Diese Arbeit betrifft die Struktur des Atractylogenins; die hier dargestellte Formel des Atractylosids verdanken wir einer persönlichen Mitteilung von Herrn Prof. A. Quillico.

¹⁰⁶ P. V. VIGNAIS und P. M. VIGNAIS, Biochem. biophys. Res. Commun. 14, 559 (1964).

¹⁰⁷ P. V. VIGNAIS und P. M. VIGNAIS, unveröffentlichte Versuche.

¹⁰⁸ R. S. DE ROFF, J. C. VAN METER, E. C. DE RENZO, K. W. MCKERN, C. PIDACKS, P. H. BELL, E. F. ULLMAN, S. R. SAFIR, W. J. FANSHAW und S. B. DAVIS, J. Am. chem. Soc. 80, 1004 (1958).

¹⁰⁹ M. W. WHITEHOUSE, Nature 201, 629 (1964).

noch in Einzelheiten unerklärte Wirkung in der Biosynthese des Prothrombins haben; da auch hier die 2-Methylgruppe und die 2'-3'-Doppelbindung unerlässlich sind⁷⁵, kann man auch in dieser Wirkung des Vitamins K die intermediaire Bildung eines sehr reaktiven Methylenchinons annehmen. Dieses könnte natürlich ebenso gut statt mit Phosphat mit -SH-Gruppen von Proteinen oder anderen Substanzen reagieren. Die oben besprochenen Inhibitoren könnten z.B. ihre hemmende Wirkung durch Abfangen von -SH-Gruppen entfalten^{110, 111}.

Summary. In the first part of this review the biogenesis of methyl-branched bacterial lipids through incorporation of the methyl group of methionin or of Propionic acid is studied; it is shown that in the biogenesis of tuberculostearic acid, only two hydrogen atoms are transferred with the carbon of methionin.

The same observation is made in the second part, concerning the origin of the 24-methyl group of ergosterol. Different mechanisms of C-methylation by methionin are discussed. It is also shown that the ethylidene group of fucosterol is formed by a double transfer of the methyl carbon of methionin.

In the third part the possible biological function of the 2-methyl group of vitamin K and the ubiquinones is studied; the acid catalysed isomerisation of these compounds to very reactive methylene-quinone-chromanes is discussed in detail.

¹¹⁰ Siehe den Artikel von E. LARSSON [Kungl. Fysiografiska Sällskapets I Lund Förhandlingar 32, 49 (1962)] betreffend die Reaktion von -SH-Gruppen mit Methylenverbindungen.

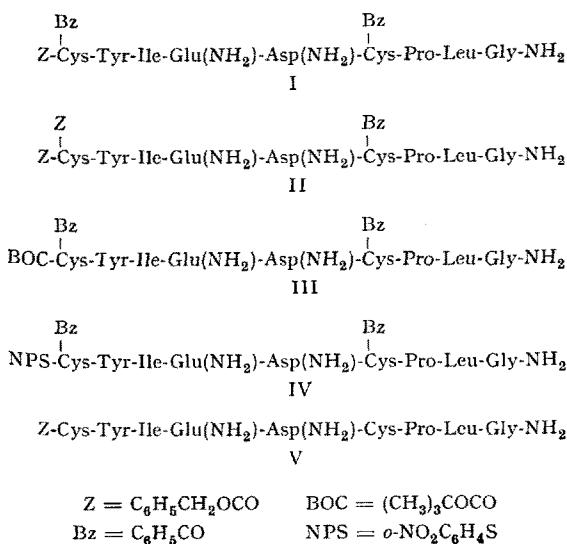
¹¹¹ Wir danken der Direktion der CIBA, Basel, und der Firma Firmenich & Cie., Genf, für ihr Interesse an unseren Arbeiten und Herrn Dr. O. ISLER (F. Hoffmann-La Roche, Basel) für die grosszügige Überlassung vieler Vitamin-K-Präparate.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Synthesis of N-Protected Oxytoceines

In the last few years, new N-protecting groups (e.g. the *o*-nitrophenylsulphenyl group, etc., ZERVAS et al.¹) as well as new S-protecting groups (e.g. acyl groups, etc., ZERVAS et al.²) have been introduced and applied in this laboratory for peptide synthesis. The removal of these protecting groups takes place under mild conditions to avoid undesired side reactions. We have applied this technique to synthesize some oxytocin-like peptides^{2b-d} and the compounds I–V.



By coupling *p*-nitrophenyl S-benzoyl-N-carbobenzoxy-L-cysteinate³ with the tripeptide L-prolyl-L-leucylglycinamide⁴, the protected tetrapeptide N-carbobenzoxy-S-benzoyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucylglycinamide was prepared (m.p. 160–161°, $[\alpha]_D$ –73°, c 2.5, DMF). When the carbobenzoxy group of this protected peptide was removed by means of HBr in acetic acid, the hydrobromide of the tetrapeptide was obtained. Coupling of the tetrapeptide with carbobenzoxy-L-asparagine by the mixed anhydride method (using pivaloyl chloride⁵) gave the protected pentapeptide, carbobenzoxy-L-asparaginyl-S-benzoyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucylglycinamide (m.p.

¹ L. ZERVAS, D. BOROVAS, and E. GAZIS, J. Am. chem. Soc. 85, 3660 (1963).

² (a) L. ZERVAS and I. PHOTAKI, J. Am. chem. Soc. 84, 3887 (1962). – (b) L. ZERVAS, I. PHOTAKI, and N. GHELIS, J. Am. chem. Soc. 85, 1337 (1963). – (c) L. ZERVAS, I. PHOTAKI, A. COSMATOS, and N. GHELIS, Peptides, Proceedings of the Fifth European Peptide Symposium, Oxford (September 1962), (Ed. G. T. YOUNG, Pergamon Press, Oxford 1963), p. 27. – (d) A. COSMATOS, I. PHOTAKI, and L. ZERVAS, Peptides, Proceedings of the Sixth European Peptide Symposium, Athens (September 1963), (Ed. L. ZERVAS, Pergamon Press, Oxford, in press). – A. BERGER, J. NIGUCHI, and E. KATCHALSKI, J. Am. chem. Soc. 78, 4483 (1956). – M. SOKOLOVSKY, M. WILCHEK, and A. PATCHORNÍK, J. Am. chem. Soc. 86, 1202 (1964).

³ m.p. 130°, $[\alpha]_D$ –55°, c 2, DMF (unpublished work of this laboratory).

⁴ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, and J.-P. WALLER, Helv. chim. Acta 38, 1491 (1955). – M. ZAORAL and J. RUDINGER, Coll. Czech. Chem. Commun. 20, 1183 (1955).

⁵ M. ZAORAL, Coll. Czech. Chem. Commun. 27, 1273 (1962).