

## KASPER KIRSCHNER und FEODOR LYNEN

Zur Biosynthese der Terpene, XII<sup>1)</sup>Die Synthese der DL-5-Phospho-mevalonsäure<sup>2)</sup>

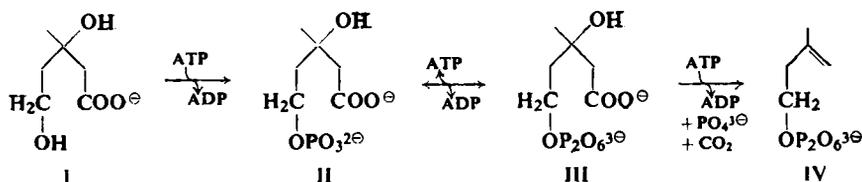
Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie,  
und dem Max-Planck-Institut für Zellchemie, München

(Eingegangen am 16. Februar 1961)

*Herrn Professor E. Wiberg zum 60. Geburtstag*

Triäthylammonium-mevalonat wird mit  $\text{POCl}_3$  in Pyridin phosphoryliert und das durch Austauschchromatographie gereinigte Reaktionsprodukt als Tris-cyclohexylammoniumsalz kristallisiert. Der synthetischen Verbindung wird auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften die Konstitution der DL-5-Phospho-mevalonsäure zugeordnet. Sie ist identisch mit dem ersten enzymatischen Reaktionsprodukt aus Mevalonsäure und ATP und wird als Substrat der Phospho-mevalonat-Kinase in Pyrophosphomevalonsäure umgewandelt, und zwar zur Hälfte, da sie racemisch ist.

Für die Untersuchung der biologischen Squalensynthese aus Essigsäure war die Entdeckung der Mevalonsäure (I)<sup>3,4)</sup> (3,5-Dihydroxy-3-methyl-valeriansäure) von entscheidender Bedeutung. Die Verbindung ist ein direkter Vorläufer der Terpene<sup>5)</sup>. Das Studium der biologischen Umwandlung der Mevalonsäure in Squalen in Hefe-



extrakten führte in BLOCHS Arbeitskreis<sup>6)</sup> und, unabhängig davon, im Münchener Laboratorium<sup>7,8)</sup> zur Entdeckung von  $\Delta^3$ -Isopentenyl-pyrophosphat (IV), dem  $\text{C}_5$ -Baustein der Terpene. Systematische Untersuchungen zeigten, daß die aktivierte

<sup>1)</sup> XI. Mittel.: U. HENNING, E. M. MÖSLEIN, B. ARREGUIN und F. LYNEN, *Biochem. Z.* **333**, 534 [1960].

<sup>2)</sup> Über die vorliegenden Versuche (K. KIRSCHNER, Diplomarb. Univ. München 1958) wurde beim Ciba Foundation Symposium „Biosynthesis of Terpenes and Sterols“ in London am 20. Mai 1958 berichtet.

<sup>3)</sup> L. D. WRIGHT, E. L. CRESSON, H. R. SKEGGS, G. D. E. MACRAE, C. H. HOFFMAN, D. E. WOLF und K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5273 [1956].

<sup>4)</sup> D. E. WOLF, C. H. HOFFMAN, P. E. ALDRICH, H. R. SKEGGS, L. D. WRIGHT und K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4499 [1956]; ebenda **79**, 1486 [1957].

<sup>5)</sup> P. A. TAVORMINA, M. H. GIBBS und J. W. HUFF, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4498 [1956].

<sup>6)</sup> S. CHAYKIN, J. LAW, A. H. PHILLIPS, T. T. TCHEN und K. BLOCH, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **44**, 998 [1958].

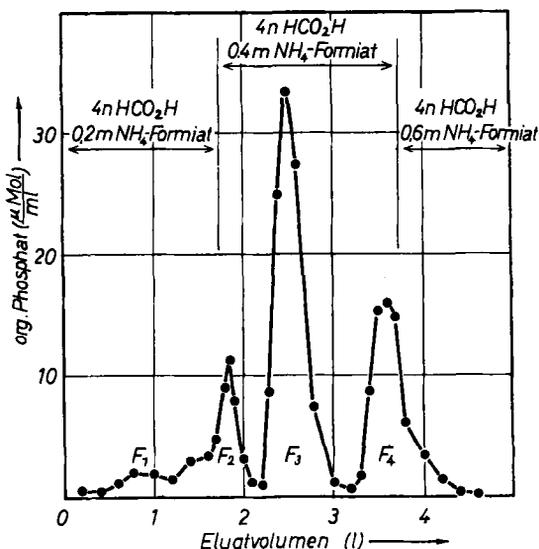
<sup>7)</sup> F. LYNEN, H. EGGERER, U. HENNING und I. KESSEL, *Angew. Chem.* **70**, 738 [1958].

<sup>8)</sup> H. EGGERER und F. LYNEN, *Liebigs Ann. Chem.* **630**, 58 [1960].

Verbindung unter Aufwand an ATP-Energie in einer Folge von drei Reaktionsschritten aus Mevalonsäure synthetisiert wird. Die Arbeiten aus dem Laboratorium von BLOCH<sup>9,10,11</sup>, LYNEN<sup>7,12</sup> und POPIÁK<sup>13</sup> führten zur Isolierung zweier phosphathaltiger Zwischenprodukte, die vorläufig als 5-Phospho- (II) und 5-Pyrophospho-mevalonsäure (III) formuliert wurden.

Um die auf analytischem Wege erschlossene Struktur der Phosphomevalonsäure zu beweisen, insbesondere die Stellung der Phosphorsäureester-Gruppe eindeutig zu lokalisieren, nahmen wir die chemische Synthese der Verbindung in Angriff. Unabhängig von uns hat auch FOLKERS<sup>14</sup> kurz über eine Synthese der Phosphomevalonsäure (II) berichtet.

Die Phosphorylierung von Hydroxycarbonsäuren gelingt im allgemeinen durch Umsetzung der freien Säuren oder der entsprechenden Ester in Pyridin mit  $\text{POCl}_3$  oder Diphenyl- bzw. Dibenzyl-chlorphosphat<sup>15-18</sup>. Bei der geplanten Übertragung dieser Verfahren auf die



Abbild. 1. Reinigung von 5-Phospho-mevalonsäure durch Säulenchromatographie an Dowex 1-Formiat.

Die Trennung erfolgte durch Gradientenelution mit Ameisensäure/Ammoniumformiat-Puffer steigender Konzentration

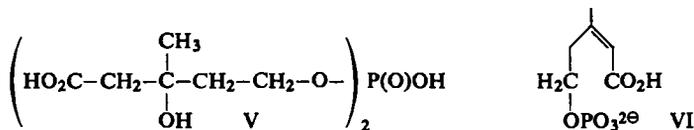
- 9) T. T. TCHEN, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6344 [1957]; J. biol. Chemistry **233**, 1100 [1958].
- 10) K. BLOCH, S. CHAYKIN, A. H. PHILLIPS und A. DE WAARD, J. biol. Chemistry **234**, 2595 [1959].
- 11) A. DE WAARD, A. H. PHILLIPS und K. BLOCH, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2913 [1959].
- 12) U. HENNING, E. M. MÖSLEIN und F. LYNEN, Arch. Biochem. Biophysics **83**, 259 [1959].
- 13) A. DE WAARD und G. POPIÁK, Biochem. J. **73**, 410 [1959].
- 14) K. FOLKERS, in G. E. W. WOLSTENHOLME und M. O'CONNOR, Ciba Foundation Symposium on „Biosynthesis of Terpene and Sterols“, S. 20ff., J. and A. Churchill Ltd., London 1959.
- 15) TH. WAGNER-JAUREGG, Ber. dtsh. chem. Ges. **68**, 670 [1935].
- 16) M. FRIEDKIN und A. H. LEHNINGER, J. biol. Chemistry **169**, 183 [1947].
- 17) C. NEUBERG und W. SCHUCHARDT, Enzymologia [Den Haag] **1**, 39 [1936].
- 18) F. LYNEN und H. BAYER, Chem. Ber. **85**, 905 [1952].

Phosphorylierung der Mevalonsäure (I) mußte deren Tendenz zur Bildung des  $\delta$ -Lactons Rechnung getragen werden, die zur Blockierung der prim. OH-Gruppe führt.

Orientierende Versuche, diese Schwierigkeit durch Veresterung der Carboxylgruppe von I zu umgehen, schlugen fehl: Die Umesterung des DL-5-Acetyl-mevalonsäure-äthylesters, der bei der Synthese der Mevalonsäure<sup>19</sup> als Zwischenstufe anfällt, ergab mit Na-Alkoholat in absol. Äthanol nur Mevalolacton. Behandlung mit äthanolischer Salzsäure führte dagegen unter Abspaltung der tert. Hydroxylgruppe von I zum  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Lacton. Weitere Versuche, Na-Mevalonat mit Dimethylsulfat oder das Silbersalz von I mit Methyljodid direkt zu verestern, lieferten kein präparativ brauchbares Ergebnis.

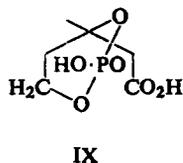
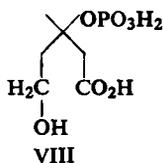
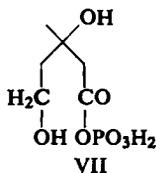
Auf Grund dieser Erfahrung wurde DL-Mevalonsäure (I)<sup>19</sup> schließlich als wasserfreies Triäthylammoniumsalz in Pyridin/Chloroform mit  $\text{POCl}_3$  umgesetzt. Nach Hydrolyse des anorg. Pyrophosphats und Abtrennung des anorg. Phosphats wurde ein kompliziertes Gemisch verschiedener Phosphorsäureester in einer Ausbeute von 11% erhalten. Das Gemisch wurde durch Austauscherchromatographie an Dowex 1 in seine Komponenten zerlegt (Abbild. 1).

Die papierelektrophoretische Analyse der verschiedenen Fraktionen zeigte, daß  $F_1$  neben Spuren von II noch 4 weitere, unbekannte Phosphorsäureester enthielt. In  $F_2$  befand sich neben anorg. Phosphat die gesuchte Phosphomevalonsäure (II).  $F_3$  enthielt den Phosphorsäure-diester V,  $F_4$  das durch Dehydratisierung aus II gebildete 5-Hydroxy-3-methyl- $\Delta^2$ -pentensäure-5-phosphat (VI).



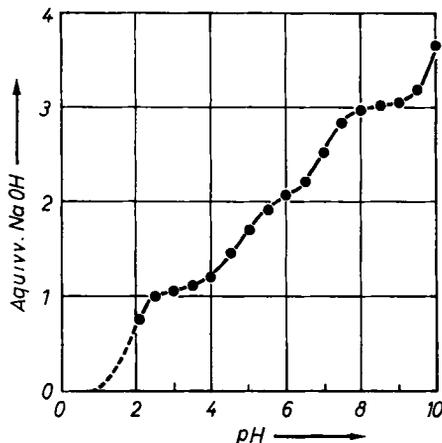
Die in  $F_2$  enthaltene Phosphomevalonsäure (II) fiel in einer Gesamtausbeute von 1% an. Die geringe Ausbeute an II und die hauptsächlichliche Bildung der unerwünschten Nebenprodukte läßt sich aus den unvermeidbaren Komplikationen erklären, die bei der Reaktion zweier trifunktioneller Reaktionspartner entstehen. Die Säurelabilität der tert. OH-Gruppe von I und II führt zu weiteren Nebenprodukten.

Der in  $F_2$  befindliche Phosphorsäureester wurde als Tris-cyclohexylammoniumsalz kristallisiert; dieses wurde durch Phospho-Monoesterase zu I und Orthophosphat im Verhältnis 1:1 gespalten. Der Ausschluß der möglichen Konstitutionsformeln eines Carboxylphosphats von I (VII), einer an der tert. OH-Gruppe von I phosphorylierten Verbindung (VIII) oder eines cyclischen Phosphorsäure-diesters (IX), und die Identifizierung der Verbindung mit II wurde durch folgende Befunde gesichert:



<sup>19</sup>) C. H. HOFFMAN, A. F. WAGNER, A. N. WILSON, E. WALTON, C. H. SHUNK, D. E. WOLF, F. W. HOLLY und K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 79, 2316 [1957].

Bei der potentiometrischen Titration verhielt sich die Verbindung wie eine 3-basige Säure:



Abbild. 2. Titrationskurve der 5-Phospho-mevalonsäure

Damit waren die Strukturen der beiden 2-basigen Säuren VII und IX ausgeschlossen. Die  $pK$ -Werte ( $pK_1 = 1.7$ ,  $pK_2 = 4.6$ ,  $pK_3 = 6.9$ ) stimmen gut mit den  $pK$ -Werten der ersten beiden Dissoziationsstufen der Phosphorsäure ( $pK_1 = 1.7$ ,  $pK_2 = 6.8$ ) und dem  $pK$ -Wert der Mevalonsäure<sup>4)</sup> ( $pK = 4.3$ ) überein. In Übereinstimmung mit dem Verhalten prim. Phosphorsäureester<sup>20)</sup> wurde die Verbindung durch Säuren nur langsam hydrolysiert: Nach 1 Stde. in 1 *n* HCl bei 100° waren erst 9.4% des Esters zu anorg. Phosphorsäure gespalten.

Die aus der Kinetik der Säurespaltung bestimmte monomolekulare Hydrolysenkonstante ( $k_1 = 1.6 \times 10^{-3} \text{ Min.}^{-1}$ ) liegt in der Größenordnung der für Phosphomilchsäure<sup>15)</sup>, Phosphoäpfelsäure<sup>16)</sup> und Phosphoweinsäure<sup>17,18)</sup> gemessenen Werte ( $k_1 = 2.6 \times 10^{-3}$ ,  $1.2 \times 10^{-3}$  und  $0.98 \times 10^{-3} \text{ Min.}^{-1}$ ). Noch stabiler ist die Verbindung gegenüber Laugen: in 1 *n* NaOH bei 100° waren nach 1 Stde. nur 4.4% der Verbindung hydrolysiert. Die Stabilität der Verbindung gegenüber Säuren und Laugen ist ein zweites Indiz gegen die Konstitutionen VII, VIII und IX. VII sollte als gemischtes Säureanhydrid rasch hydrolysiert werden, und die tertiäre Phosphorsäureesterbindung von VIII oder IX sollte durch die  $\beta$ -Stellung zur Carboxylgruppe ebenfalls labilisiert sein. Ferner wurde im Säurehydrolysat der Verbindung papierelektrophoretisch VI nachgewiesen, ein direkter Beweis dafür, daß es sich um den 5-Phosphorsäureester handeln muß.

Die Stellung der Phosphorsäure an der prim. OH-Gruppe von I wird durch zwei weitere Beobachtungen gestützt: Eine Blockierung der prim. Hydroxylgruppe sollte zu einem Verlust der Fähigkeit führen, ein  $\delta$ -Lacton zu bilden. Im Falle der 3-Phosphomevalonsäure (VIII) sollte dagegen die Lactonbildung unbehindert sein.

<sup>20)</sup> C. A. VERNON, in „Phosphoric acids and related compounds“, S. 24 ff., Spec. Publications Nr. 8, The Chemical Society, London, 1957.

Tatsächlich bildet unser Syntheseprodukt im Gegensatz zu I<sup>21)</sup> bei der Behandlung mit Hydroxylamin keine Hydroxamsäure. Dadurch wird eindeutig sowohl die Konstitution VIII als auch die Möglichkeit eines Phosphorsäure-mevalonsäure-anhydrids (VII) ausgeschlossen.

Der synthetische Phosphorsäureester ist ferner unempfindlich gegenüber neutraler KMnO<sub>4</sub>-Lösung. Da unter diesen Bedingungen die prim. OH-Gruppe der Mevalonsäure (I) unter Bildung von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutarsäure zur Carboxylgruppe oxydiert wird, muß bei dem synthetischen Ester die prim. OH-Gruppe durch Veresterung mit Phosphorsäure geschützt sein.

Aus der Summe dieser Befunde dürfte die Konstitution der Verbindung als DL-5-Phospho-mevalonsäure hinreichend gesichert sein. Die Identifizierung mit dem bei der enzymatischen Phosphorylierung der Mevalonsäure (I) erhaltenen Phosphorsäureester erfolgte auf folgende Weise:

Beide Verbindungen waren bei der Hochspannungs-Papierelktrophorese sowie bei der Papierchromatographie nicht voneinander zu trennen. Durch Zusatz der synthetischen Verbindung beim enzymatischen Einbau von markierter Mevalonsäure in Squalen wurde die Radioaktivität im Triterpen im Sinne eines Isotopenverdünnungseffektes herabgesetzt.

Squalensynthese aus Mevalonsäure-[2-<sup>14</sup>C]: Isotopenverdünnung mit synthet. 5-Phospho-mevalonsäure

DL-Mevalonsäure-[2- <sup>14</sup> C] $\mu$ Mol	DL-5-Phospho- mevalonsäure zugesetzt $\mu$ Mol	Radioaktivität im Squalen (Imp./Min.)
0.12 (785 Imp./Min.)	—	315
0.12 (785 Imp./Min.)	0.08	246
0.12 (785 Imp./Min.)	0.15	195
0.12 (785 Imp./Min.)	0.38	81

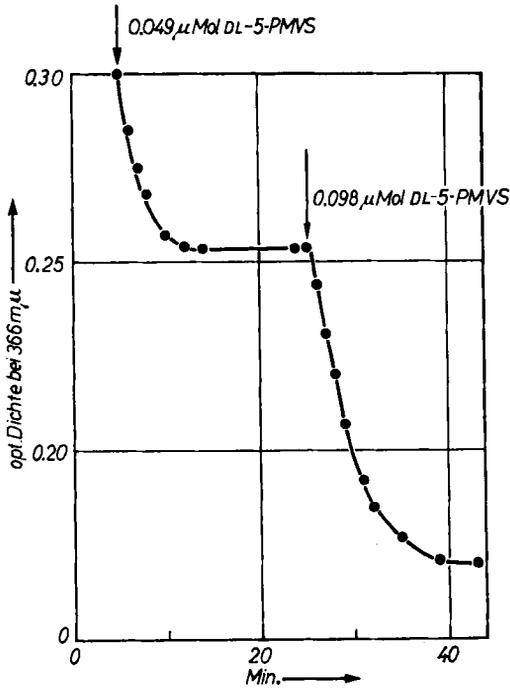
Um die biologische Aktivität der synthetischen Verbindung zu beweisen, wurde sie als Substrat für die Phosphomevalonat-Kinase<sup>12)</sup> eingesetzt. Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung von II zu III mit ATP in Gegenwart von Magnesiumionen. Mit Hilfe des spektrophotometrischen Tests für die Phosphomevalonat-Kinase wurde die Stöchiometrie der enzymatischen Reaktion mit synthet. DL-5-Phospho-mevalonsäure gemessen. Abbild. 3 gibt das Ergebnis wieder.

Die Kinetik der zu messenden Reaktion wird an der stöchiometrischen Bildung von ADP verfolgt. Durch Zusatz des Hilfssystems Phospho-enolpyruvat/Pyruvat-Kinase und DPNH/Milchsäure-Dehydrogenase wird die Bildung von ADP an den Verbrauch von DPNH gekoppelt, dessen Abnahme durch Messung der Extinktionsänderung bei 366 m $\mu$  quantitativ bestimmt werden kann (vgl. Formelschema S. 1600).

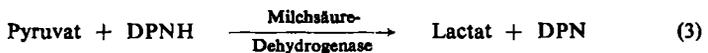
Wie man aus der Abbildung ersieht, wird die synthetische Verbindung tatsächlich phosphoryliert. Sie ist also identisch mit der enzymatisch gewonnenen Phosphomeva-

<sup>21)</sup> F. LYNEN und M. GRASSL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 313, 291 [1958].

lonsäure. Allerdings sind nur 50% der synthetischen, *racem.* 5-Phospho-mevalonsäure enzymatisch verwertbar. Die damit aufgezeigte Stereospezifität der Phospho-mevalonat-Kinase entspricht genau der Selektivität der Mevalonat-Kinase<sup>19,22</sup>. Auch

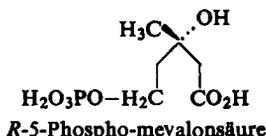
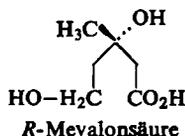


Abbild. 3. Stöchiometrie der enzymatischen Phosphorylierung von synthet. 5-Phospho-mevalonsäure. Aus der Extinktionsabnahme des DPNH berechnet sich für 0.049  $\mu$ Mol DL-5-Phospho-mevalonsäure ein Verbrauch von 0.024  $\mu$ Mol ATP, für 0.098  $\mu$ Mol entspr. 0.046  $\mu$ Mol ATP



dieses Enzym phosphoryliert nur *ein* Enantiomeres der synthetischen, *racem.* Mevalonsäure. Durch die bekannte, absolute Konfiguration der natürlichen Mevalonsäure<sup>23</sup> ist die Konfiguration der biologisch aktiven 5-Phospho-mevalonsäure (II) als die nach CAHN et al.<sup>24</sup> definierte *R*-Form festgelegt.

<sup>22</sup>) C. H. SHUNK, B. O. LINN, J. W. HUFF, J. L. GILFILLAN, H. R. SKEGGS und K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 79, 3294 [1957].



### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Mikroanalysen wurden von Herrn H. GEYER, Institut für Organische Chemie, Univ. München, ausgeführt. Zur quantitativen Phosphatbestimmung, die als hauptsächlich analytisches Werkzeug bei der Ausarbeitung der Synthese diente, wurde die Methode von MARTLAND<sup>25)</sup> verwendet.

#### Synthese der DL-5-Phospho-mevalonsäure

*DL-Mevalonsäure* (I) wurde nach der Methode von FOLKERS<sup>19)</sup> synthetisiert. Dibenzyl-äthylendiammoniumsalz: Schmp. 124–126° (Lit.<sup>19)</sup>: 125–126°). 20.6 g (0.15 Mol) der rohen Mevalonsäure (I) (ein 1:1-Gemisch von I und dem Lacton) wurden mit 344 ccm 0.46 *n* Ba(OH)<sub>2</sub> (8% Überschuß) zur vollständigen Hydrolyse des Lactons 20 Min. auf 50° erwärmt. Die abgekühlte Lösung des *Ba-Mevalonats* wurde mit 32.4 g (0.32 Mol) dest. Triäthylamin versetzt, und Barium durch Zugabe einer der Barytlauge äquiv. Menge 7 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Bariumsulfat gefällt. Die vom Niederschlag abzentrifugierte Lösung wurde i. Vak. konzentriert und durch Zusatz von Triäthylamin auf pH 9 (Phenolphthalein) gehalten. Nach 24 stdg. Trocknen über KOH i. Vak. wurden 25 g eines zähflüssigen, stark nach Triäthylamin riechenden Öls ausgewogen, in dem Mevalolacton nachzuweisen war (Hydroxamsäureprobe).

31 g „Triäthylammonium-mevalonat“ (entspr. einer Ausgangsmenge von 0.18 Mol I) ließ man, in 120 ccm absol. Pyridin gelöst, innerhalb von 20 Min. unter kräftigem Rühren und gleichzeitiger Kühlung auf –5° (Innentemp.) einer Lösung von 22.8 g (0.15 Mol) frisch dest. POCl<sub>3</sub> in 240 ccm absol. Pyridin und 150 ccm absol. Chloroform zutropfen. Dabei bildete sich ein feiner kristalliner Niederschlag von Pyridin-hydrochlorid. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stde. bei 0° und anschließend 30 Min. bei Raumtemperatur weitergerührt. Dann wurde das Gemisch auf 100 g Eis gegossen und mit 60 ccm 10 *n* NaOH alkalisch gemacht. Freigesetztes Pyridin wurde mit Chloroform ausgezogen, die Lösung mit Salzsäure zu 1 *n* HCl angesäuert und zur Hydrolyse von anorg. Pyrophosphat 7 Min. auf 100° erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung mit 190 ccm Magnesiummischung (16 g Mg-Acetat + 36 g Ammoniumacetat in 240 ccm Wasser gelöst) versetzt und zur Fällung des anorg. Phosphats mit konz. Ammoniak auf pH 8.2 (Glaselektrode) gebracht. Der Niederschlag von MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, der mitgefälltes org. Phosphat enthielt, wurde abgesaugt, umgefällt, und die vereinigten Filtrate über eine 2.5-cm-Kationenaustauschersäule (50 g Amberlite IR 120, H<sup>+</sup>-Form) geschickt. Das saure Eluat wurde i. Vak. eingeeengt und zuletzt i. Vak. über KOH von letzten Resten flüchtiger Säuren befreit.

Ausb. 16 g eines dunkel gefärbten Öls (20.3 mMol org. Phosphat, 11% d. Th., bez. auf Mevalonsäure; 0.95 μMol anorg. Phosphat). Das Phosphorsäureester-Gemisch wurde in 50 ccm Wasser aufgenommen, mit 11.5 ccm konz. NH<sub>3</sub> auf pH 8.0 gebracht und von unlöslichem abzentrifugiert.

Die Trennung des Gemisches wurde nach einer Modifikation der Methode von HURLBERT und Mitarbb.<sup>26)</sup> bei 2° durchgeführt: 300 g Dowex 1 (xIO, 200–400 mesh, Chlorid-Form)

<sup>23)</sup> M. EBERLE und D. ARIGONI, *Helv. chim. Acta* **43**, 1508 [1960].

<sup>24)</sup> R. S. CAHN, C. K. INGOLD und V. PRELOG, *Experientia* [Basel] **12**, 81 [1956].

<sup>25)</sup> M. MARTLAND und R. ROBINSON, *Biochem. J.* **20**, 848 [1926].

<sup>26)</sup> R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM und V. R. POTTER, *J. biol. Chemistry* **209**, 23 [1954].

wurden in mehreren Portionen in eine Säule (3.7 cm Ø) eingeschlämmt und unter schwachem Druck mit 1/3 m Na-Formiatlösung chloridfrei gewaschen, anschließend mit 500 ccm dest. 88-proz. Ameisensäure nachgewaschen und mit Wasser (3 l) säurefrei gespült (Säulenhöhe 29 cm). Unter schwachem Überdruck wurde die neutrale Lösung der Phosphorsäureester auf die Säule gebracht und hintereinander mit je 500 ccm Wasser bzw. 2 m Ameisensäure eingewaschen. Mit dem Wasser wurden dunkel gefärbte Verunreinigungen, und mit der Ameisensäure nicht umgesetzte Mevalonsäure entfernt. Die Phosphorsäureester eluierte man durch Gradientenelution mit Ameisensäure/Ammoniumformiat-Puffer steigender Konzentration: Ein 2-l-Reservoirgefäß und eine 1-l-Mischkammer wurden mit PVC-Schläuchen in Serie an die Säule angeschlossen. Im Mischgefäß wurde 1 l Wasser vorgelegt, und die Durchmischung des Eluens mit einem Magnetrührer besorgt. Durch Überdruck wurde der im Reservoir befindliche Puffer in die Mischkammer getrieben und von dort auf den mit 20 ccm 2 n Ameisensäure bedeckten Säulenkopf gebracht. Durch Wechsel des Reservoir-Puffers wurde ein gleichmäßig ansteigender Konzentrationsgradient erzeugt.

Eluatvol. l	Reservoir-Puffer
0 — 1.75	4 m HCO <sub>2</sub> H, 0.2 m NH <sub>4</sub> -Formiat
1.75 — 3.75	4 m HCO <sub>2</sub> H, 0.4 m NH <sub>4</sub> -Formiat
3.75 — 4.75	4 m HCO <sub>2</sub> H, 0.6 m NH <sub>4</sub> -Formiat

Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 4 cm/Min. wurden Fraktionen von 15 ccm aufgefangen und der Gehalt an org. Phosphat bestimmt. Die nach dem Elutionsdiagramm (Abbild. 1) geschnittenen Fraktionen wurden i. Vak. eingengt und zur Entfernung von Ammoniumformiat über 2 × 20 cm Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>-Form)-Säulen filtriert, wiederum eingengt, und die Rückstände i. Vak. über KOH getrocknet. Die einzelnen Fraktionen wurden papierelektrophoretisch untersucht.

*Hochspannungs-Papierelektrophorese:* Machery & Nagel-Papier 214, Pyridin/Eisessig/Wasser (10:1:89) pH 6.2, 35–40 V/cm, 2 Stdn., Perograph „Frankfurt“, L. Hormuth, W. E. Vetter, Heidelberg. Mit „RPO<sub>4</sub>“ werden die Wanderungsstrecken der Verbindungen in Einheiten der Wanderungsstrecke von Orthophosphat ausgedrückt.

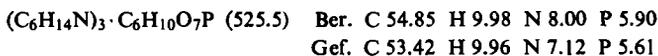
Fraktion	Papierelektrophorese RPO <sub>4</sub>	Papierchromatographie R <sub>F</sub>	Substanzen	Gesamtphosphat mMol	Ausb. (bez. auf I) %
F <sub>1</sub>	0.96, 0.76 0.60, 0.50	— —	unbekannte Phosphorsäureester	1.54	0.8
F <sub>2</sub>	1.14, 1.0	0.61, 0.46	II, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1.62	0.9
F <sub>3</sub>	1.24	0.73	V	9.30	5.1
F <sub>4</sub>	1.10	0.59	VI	6.28	3.4

*Papierchromatographie:* Schleicher & Schüll-Papier 2043 b (mit Salzsäure gewaschen), Methanol/konz. NH<sub>3</sub>/Wasser (6:1:3), bei 2° 12 Stdn. aufsteigend entwickelt. Die Sichtbarmachung der Phosphatflecken erfolgte durch Besprühen mit dem Molybdat/Perchlorsäure-Reagenz von HANES<sup>27)</sup>.

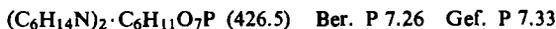
*Salze der 5-Phospho-mevalonsäure:* F<sub>2</sub> (520 mg, 1.62 mMol II) wurde in 13 ccm Wasser aufgenommen, mit 0.6 g (6.1 mMol) dest. Cyclohexylamin neutralisiert und gefriergetrocknet.

<sup>27)</sup> C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD, Nature [London] 164, 1107 [1947].

Der amorphe Rückstand wurde in Butanol/Wasser (1:15) gelöst und mit ca. 1 Vol. Äther bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 2 Stdn. wurde die voluminöse Kristallmasse von langen, feinen Nadeln abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet (Ausb. 470 mg, 0,90 mMol). Nach 2maliger Umkristallisation aus Wasser/Butanol/Äther unter Zusatz jeweils eines Tropfens Cyclohexylamin wurde das alkalisch reagierende *Tris-cyclohexylammoniumsalz der DL-5-Phospho-mevalonsäure* analysenrein erhalten. Schmp. 152–154°, Ausb. 154 mg (0,3 mMol).



Die niedrigen Analysenwerte sind wahrscheinlich auf den Verlust von Cyclohexylamin beim Trocknen i. Vak. (vgl. l. c.<sup>28)</sup> zurückzuführen. Auch bei wiederholter Umkristallisation aus Wasser/Butanol/Äther geht ein Mol. Base verloren: So wurde nach mehrmaliger Umkristallisation ohne Zusatz von Cyclohexylamin das in Nadeln kristallisierende, schwach sauer reagierende *Bis-cyclohexylammoniumsalz von II* mit dem Schmp. 145–147° erhalten.



### Eigenschaften der DL-5-Phospho-mevalonsäure

*Potentiometrische Titration:* 52.6 mg (0,1 mMol) des *Tris-cyclohexylammoniumsalzes* wurden in 28 ccm Wasser gelöst, mit 2 ccm 0,1 *n* NaOH versetzt und mit 0,1 *n* HCl zurücktitriert (pH-Messung mit einer Glaselektrode, Potentiometer Präzisionsmodell E 187, Metrohm AG, Herisau, Schweiz). In Anlehnung an die Methode von PARKE<sup>29)</sup> wurde eine Blindtitration von 2 ccm 0,1 *n* NaOH in 28 ccm Wasser durchgeführt. Abbild. 2 gibt die Differenz der beiden Kurven wieder. Statt der Äquivalente gebundener oder abgegebener Protonen wurden die Äquivalente Natronlauge aufgetragen, die die freie Säure II bei der Titration mit Lauge verbraucht hätte.

*Phosphatatische Spaltung:* 3.48 mg (6,6 µMol) des *Tris-cyclohexylammoniumsalzes von II* wurden in 0,5 ccm K-Acetat-Puffer, pH 5,6, gelöst und mit 0,9 mg *Prostataphosphatase*<sup>30)</sup> 3 Stdn. bei 37° inkubiert. Nach Zusatz von 0,05 ccm 3 *m* Trichloressigsäure wurde denaturiertes Protein abzentrifugiert und in Proben der Lösung anorg. Phosphat und I<sup>21)</sup> bestimmt: Anorg. Phosphat = 6,1 µMol, I = 6,2 µMol. Die papierelektrophoretische Untersuchung des Inkubationsansatzes zeigte eine vollständige Umwandlung von II ( $R_{PO_4}$  1,14) zu I ( $R_{PO_4}$  0,87) und anorg. Phosphat an.

*Kinetik der Säurehydrolyse:* 1-ccm-Proben einer 0,83 *m* Lösung von II in 1 *n* HCl wurden in Ampullen eingeschmolzen und in einem Heizbad von 100° erhitzt. Nach Abkühlen wurde anorg. Phosphat bestimmt.

<i>t</i> Min.	anorg. Phosphat µMol	Spaltung %	$k_1 \cdot 10^3$ Min. <sup>-1</sup>
0	0	0	—
5	0.007	0.7	1.14
15	0.023	2.6	1.74
30	0.042	4.8	1.63
60	0.081	9.4	1.64
Veraschung	0.853	100.0	—

<sup>28)</sup> R. W. MCGILVER, *J. biol. Chemistry* **200**, 835 [1953].

<sup>29)</sup> T. V. PARKE und W. W. DAVIS, *Analytic. Chem.* **26**, 642 [1954].

<sup>30)</sup> G. SCHMIDT, in „*Methods in Enzymology*“ (Red.: N. O. KAPLAN und S. P. COLOWICK), Academic Press Inc., New York, **2**, 523 [1955].

Die monomolekulare Hydrolysenkonstante wurde nach der Gleichung

$$k_1 = \frac{2.203}{t} \cdot \left( 2 - \log \frac{[P]_t \cdot 100}{[P]_0} \right)$$

berechnet.

( $[P]_t$ ) bzw.  $[P]_0$  = Konz. des org. Phosphats zur Zeit  $t$  bzw. 0).  $k_1 = 1.6 \cdot 10^{-3} \text{ Min.}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 431 \text{ Min.}$  Zur Untersuchung der Hydrolysenprodukte wurden Proben von je  $5 \mu\text{Mol II}$  in  $0.2 \text{ ccm } 2.5n \text{ HCl}$  verschieden lang auf  $100^\circ$  erhitzt, die Lösungen dann gefriergetrocknet und der Papierelektrophorese in Pyridin/Acetat-Puffer, pH 6.2, unterworfen. Nach 75 Min. langer Hydrolyse lagen etwa gleiche Mengen Orthophosphat, II und VI vor.

Die Hydrolyse in  $1n \text{ NaOH}$  erfolgte nach der für die Säurehydrolyse beschriebenen Methode: Die Ampullen enthielten  $1 \text{ ccm } 1.2 \cdot 10^{-3} m$  Lösungen von II in  $1n \text{ NaOH}$ :

$t$ Min.	anorg. Phosphat $\mu\text{Mol}$	Spaltung %
0	0	0
5	0.005	0.4
15	0.016	1.3
30	0.024	2.0
60	0.053	4.4
Veraschung	1.20	= 100

Versuch zur Lactonbildung von II: In einer Lösung, die  $3 \mu\text{Mol}$  der freien Säure II und  $2.12 \mu\text{Mol}$  Mevalolacton in einem Vol. von  $0.3 \text{ ccm}$  enthielt, wurde nach der kolorimetrischen Methode von LYNEN und GRASSL<sup>21</sup>) Mevalolacton als Eisen(III)-hydroxamat-Komplex bestimmt. Als Blindprobe wurde die Extinktion bei  $546 m\mu$  von  $2.12 \mu\text{Mol}$  Mevalolacton allein ermittelt. Der Zusatz von II bedingte keine Erhöhung der Extinktion.

II	eingesetzte $\mu\text{Mol}$ I-Lacton	Extinktion bei $546 m\mu$
—	2.12	0.468
3.0	2.12	0.468

Oxydationsversuch mit  $\text{KMnO}_4$ : Je  $5 \text{ mg}$  Dibenzyl-äthylendiammonium-mevalonat und Tris-cyclohexylammonium-5-phospho-mevalonat wurden in  $0.3 \text{ ccm}$  Wasser gelöst und bis zur bleibenden Violettfärbung tropfenweise mit 2-proz.  $\text{KMnO}_4$ -Lösung versetzt. Die vom ausgeschiedenen  $\text{MnO}_2$  abzentrifugierten Lösungen wurden papierelektrophoretisch untersucht (Pyridin/Acetat-Puffer, pH 6.2): Mevalonsäure ( $R_{\text{PO}_4}$  0.87) war quantitativ zu  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl-glutarsäure ( $R_{\text{PO}_4}$  1.11) oxydiert worden, II wanderte unverändert bei ( $R_{\text{PO}_4}$  1.14).

#### Enzymversuche mit DL-5-Phospho-mevalonsäure

Vergleich mit biosynthetischer Phosphomevalonsäure-[ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]: Die markierte Verbindung wurde nach der von HENNING und Mitarbb.<sup>12</sup>) beschriebenen Methode durch enzymatische Phosphorylierung von DL-Mevalonsäure-[ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ] mit ATP gewonnen. Bei der Hochspannungspapierelektrophorese und Papierchromatographie (Bedingungen wie unter Synthese der Phosphomevalonsäure) wanderte die radioaktive Verbindung wie II bei  $R_{\text{PO}_4}$  1.14 bzw.  $R_{\text{F}}$  0.61.

Isotopenverdünnungseffekt: Die Bereitung des squalensynthetisierenden Proteinextraktes aus Bäckerhefe erfolgte nach der Methode von LYNEN und Mitarbb.<sup>7</sup>). Je  $20 \mu\text{Mol}$  Tris/

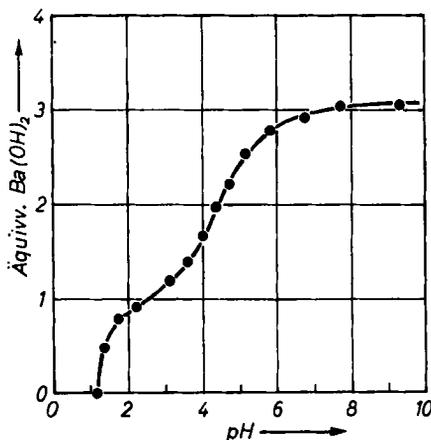
HCl-Puffer, pH 8.0, 6  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 30  $\mu\text{Mol}$  KF, 2  $\mu\text{Mol}$  ATP, 0.1  $\mu\text{Mol}$  TPN, 5  $\mu\text{Mol}$  Glucose-6-phosphat, 0.12  $\mu\text{Mol}$  *DL-K-Mevalonat*-[2- $^{14}\text{C}$ ] (785 Imp./Min.) und 0.03 ccm Hefeextrakt (1.5 mg Protein) wurden zusammen mit wechselnden Mengen *DL-Tris-cyclohexylammonium-5-phospho-mevalonat* (s. Tab. S. 1599) in einem Vol. von 0.4 ccm 1 Stde. bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde nach Zusatz von 0.2 mg Squalen als Träger mit 0.1 ccm 3 *m* Trichloressigsäure abgebrochen. Der das *Squalen* enthaltende Proteinniederschlag wurde mit 1 ccm Wasser gewaschen, dann 3mal mit je 1.5 ccm Äther/Äthanol (1:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 1 ccm Methanol, 1 ccm 10-proz. Kalilauge in 70-proz. Methanol versetzt, 3mal mit je 3 ccm Petroläther (50–70°) ausgeschüttelt, die vereinigten Petrolätherextrakte nach der Wäsche mit 2 ccm 0.1 *m* KOH eingeeengt, auf Cu-Plättchen aufgetragen und im Endfensterzähler (Superscaler SC/8A, Tracerlab, Inc.) ausgezählt.

*Die enzymatische Phosphorylierung der synthet. DL-5-Phospho-mevalonsäure; Stöchiometrie:* Die Anreicherung der Phosphomevalonat-Kinase aus Bäckerhefe und die spektrophotometrische Bestimmung von Phosphomevalonsäure mit Hilfe des Enzyms sind von HENNING und Mitarbb.<sup>12)</sup> beschrieben worden. 1.023 mg (1.95  $\mu\text{Mol}$ ) des Tris-cyclohexylammoniumsalzes von II wurden in 2 ccm Wasser gelöst und 0.05 ccm (0.049  $\mu\text{Mol}$ ) bzw. 0.1 ccm (0.098  $\mu\text{Mol}$ ) der Stammlösung im Versuch eingesetzt. Die erneute Extinktionsabnahme nach dem zweiten Zusatz von II beweist die Aktivität des Enzyms.

#### Identifizierung der Nebenprodukte

##### „5.5'-Dimevalonyl-phosphat“ (V)

0.54 mMol der in  $\text{F}_3$  befindlichen Säure wurden mit 0.42 *n*  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  titriert (pH-Messung mit einer Glaselektrode).



Abbild. 4. Titrationskurve von 5.5'-Dimevalonyl-phosphat

Aus der Titrationskurve ergeben sich folgende  $\text{pK}$ -Werte:  $\text{pK}_1=1.4$ ,  $\text{pK}_2=3.8$ ,  $\text{pK}_3=5.0$ . Der Mittelwert der zweiten und dritten Dissoziationsstufe ( $\frac{1}{2}(\text{pK}_2 + \text{pK}_3) = 4.4$ ) stimmt gut mit dem  $\text{pK}$ -Wert der Mevalonsäure ( $\text{pK} = 4.3^{41)$  überein.

*Spaltungsversuch mit Phospho-Monoesterase:* 9.45  $\mu\text{Mol}$  der Säure wurden in 1 ccm K-Acetat-Puffer, pH 5.6, gelöst und mit 0.9 ccm Prostataphosphatase<sup>30)</sup> bei 37° inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf anorg. Phosphat analysiert.

<i>t</i> Min.	anorg. Phosphat $\mu\text{Mol}$	Spaltung %
0	0	0
1	0.067	5.8
30	0.039	3.8
90	0.050	4.6
Veraschung	0.923	= 100

Die papierelektrophoretische Untersuchung der Inkubationslösung zeigte, daß die geringe Menge freigesetzten anorg. Phosphats auf Verunreinigung durch II zurückzuführen ist, während V unverändert bei  $R_{\text{PO}_4}$  1.24 wanderte.

*Säurehydrolyse:* Proben von je  $5 \mu\text{Mol}$  in  $0.2 \text{ ccm } 5n \text{ HCl}$  wurden verschiedene Zeiten auf  $100^\circ$  erhitzt und anschließend papierelektrophoretisch untersucht: Nach 75 Min. war V quantitativ zu einem Gemisch von II, VI und anorg. Phosphat hydrolysiert.

*Oxydationsversuch mit  $\text{KMnO}_4$ -Lösung:*  $10 \mu\text{Mol}$  der freien Säure V wurden tropfenweise mit 2-proz.  $\text{KMnO}_4$ -Lösung bis zur bleibenden Violettfärbung versetzt. Bei der Papierelektrophorese wanderte die Verbindung unverändert.

*5-Hydroxy-3-methyl- $\Delta^2$ -pentensäure-5-phosphat (VI)*

Die in  $F_4$  befindliche Säure wurde papierelektrophoretisch und papierchromatographisch (Bedingungen wie bei Synthese der 5-Phospho-mevalonsäure) mit einem authent. Präparat<sup>31)</sup> identifiziert. Wie jene entfärbt die Verbindung momentan  $\text{KMnO}_4$  oder Bromlösungen unter Bildung derselben Reaktionsprodukte, die papierelektrophoretisch getrennt wurden: Pyridin/Acetat-Puffer, pH 6.2; Reaktionsprodukte für  $\text{KMnO}_4$ :  $R_{\text{PO}_4}$  0.86, für Brom:  $R_{\text{PO}_4}$  0.71, 0.62.

<sup>31)</sup> B. HUBER, Diplomarb. Univ. München.

## FRANZ WILLE und RUDOLF STRASSER<sup>1)</sup>

### Zur Kenntnis des Diäthynylketons

Aus dem Institut für Anorganische Chemie der Universität München

(Eingegangen am 20. März 1961)

*Herrn Prof. Dr. ing. Dr. ing. e. h. E. Wiberg zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die Oxydation von Diäthynylcarbinol (II) zu Diäthynylketon (I) und dessen Reaktionen mit *N,N'*-Diphenyl-thioharnstoff und mit HSCN werden beschrieben. II wird durch Umsetzen von Propinal mit Äthynylmagnesiumbromid erhalten. Bei dieser Reaktion entstehen außerdem Octatriin-(1.4.7)-diol-(3.6) (VIII) und Undecatetra-(1.4.7.10)-triol-(3.6.9) (IX).

Acetylenketone, bei welchen die Carbonylgruppe von zwei substituierten Acetylengruppen flankiert ist, wurden von C. K. LIANG<sup>2)</sup> und von J. CHAUVELIER<sup>3)</sup> aus den

<sup>1)</sup> Dissertat. Univ. München 1959.

<sup>2)</sup> Bull. Soc. chim. France **53**, 41 [1933].

<sup>3)</sup> C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **212**, 793 [1941].