

DIE CHEMISCHE STRUKTUR DER BIOSYNTHETISCHEN VORSTUFE DES SQUALENS

H. WASNER und F. LYNEN

Max-Planck-Institut für Zellchemie und Biochemisches Institut der Universität München, DBR

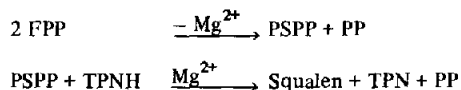
Received 26 October 1970

Presqualenyl-pyrophosphate (PSPP) was synthesized from farnesyl-pyrophosphate (FPP). The purified product could be transformed into squalene in 90% yield. The structure of PSPP was established by the following experiments:

- 1) PSPP displays a remarkably acid-labile phosphate-ester bond. Analogous to FPP it was possible to stabilize this bond by the addition of bromine. This indicates a structure of the allylester type.
- 2) On acid hydrolysis PSPP splits off not only the pyrophosphate but also water. This may be best explained by the presence of a tertiary hydroxyl group in PSPP.
- 3) The pyrophosphate group of PSPP could be split by prostatic phosphatase. In gas-liquid-chromatography the trimethyl-silylated product gave a single peak. From the mass spectra of this compound and of the corresponding alcohol the expected molecular weight of 426 could be verified for the latter.
- 4) Determining the $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio in $1\text{-}^3\text{H}_2\text{-}4\text{-}^{14}\text{C}$ -FPP and in PSPP and squalene, synthesized from it, only three ^3H -atoms could be detected in PSPP and in squalene.
- 5) Ozonisation of PSPP, synthesized from $1\text{-}^{14}\text{C}$ -FPP, gave radioactive malondialdehyde, which was characterised as azobenzene-malondialdehyde and 4-azobenzene-1-phenyl-pyrazole. The experimental results are in agreement with the following structure of 2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-*n*-tetracos-2, 6, 11, 14, 18, 22-hexaen-10-yl-pyrophosphate for PSPP.

1. Einleitung

Eine Vorstufe des Squalens wurde von Rilling [1,2] durch Inkubation von Farnesyl-pyrophosphat (FPP) mit Mg^{2+} und einer Partikelfraktion aus Hefe gewonnen und auf Grund der elementaren Zusammensetzung Präsqalenyl-pyrophosphat (PSPP) genannt.



Strukturformeln für PSPP wurden von Rilling I [1, 2] und von Popják II [3, 4] vorgeschlagen. Die chemischen Untersuchungen des von uns auf analoge Weise gewonnenen PSPP führten uns zu einer neuen, von den bisherigen Vorschlägen abweichenden Struktur III [5].

Abkürzungen:

PSPP: Präsqalenyl-pyrophosphat;
PS-OH: Präsqalenol;
FPP: Farnesyl-pyrophosphat.

2. Experimentelles

Radioaktiv markiertes ^{14}C -FPP, aus spezifisch markierter Mevalonsäure bereitet, reinigten wir durch Gegenstromverteilung [6]. Unmarkiertes FPP wurde durch Phosphorylierung von trans-trans-Farnesol nach Cramer und Böhm [6, 7] erhalten.

Zur Gewinnung der enzymatisch aktiven Partikelfraktion aus Hefe wurden die Zellen im Homogenisator nach Schlossmann [8] aufgeschlossen, zunächst 20 min bei 15 000 g zentrifugiert und aus dem Überstand die aktive Fraktion durch 60 min Zentrifugieren bei 105 000 g sedimentiert [9].

Nach Vorversuchen, in denen wir die Zeit- und Enzymabhängigkeit der Bildung von PSPP bestimmten, erwies sich folgende Zusammensetzung für die Präparation des PSPP als geeignet. In 200 ml Endvolumen waren enthalten: 30 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5; 1 mMol Mg^{2+} ; 0,2 mMol FPP und Enzymfraktion, entsprechend 1 g Protein. Nach 10 min Inkubation bei 37° wurde nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 20 ml 5M KOH das gebildete PSPP sofort

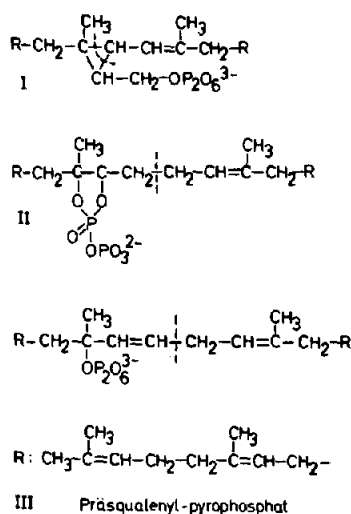


Fig. 1.

mit Collidin/Butanol (1:1) extrahiert und durch Gegenstromverteilung an Sephadex G25 gereinigt, wobei als stationäre Phase collidin-gesättigtes Wasser und als bewegliche Phase Collidin/Petroläther diente [6]. Wurde das auf diese Weise erhaltene PSPP mit TPNH, Mg^{2+} und der Partikelfraktion aus Hefe inkubiert, so entstand Squalen in 90%iger Ausbeute. Wurde PSPP jedoch nicht sofort extrahiert, so lagerte es sich zu einem säurestabileren Produkt um, das nicht mehr zu Squalen umgesetzt werden konnte.

Zur Spaltung von PSPP mit saurer Prostata-Phosphatase, bereitet nach G. Schmidt [10], wurden in 30 ml Tris/HCl-Puffer, pH 6,0 inkubiert: 30 μ Mol PSPP, bis zu 5 Einheiten Phosphatase und 15 mg Serumalbumin. In einem Kontrollversuch wurde ermittelt, dass ohne Enzym allein auf Grund des schwach sauren pH-Wertes die spontane Hydrolyse des PSPP weniger als 5% ausmachte. Zur Isolierung des Spaltproduktes wurde nach 20 min alkalischer Verseifung mit Petroläther extrahiert.

Zur Ozonisation [11] des PSPP (0,6 μ Ci in 20 μ Mol; aus 1- 14 C-FPP hergestellt) wurde durch eine Essigesterlösung (20 ml) bei -78° 90 sec lang Ozon durchgeleitet. Das Ozonid wurde mit Palladium calciumcarbonat-Katalysator in absolutem Methanol reduziert. Anschließend wurde zu der Lösung 6 mMol unmarkiertes Malondialdehyd-tetraäthylacetal, 15 ml Essigester sowie 10 ml Wasser und 4 ml 4n Salzsäure gegeben. Zur Hydrolyse des Acetals wurde 20 min geschüttelt. Der Malondialdehyd, der sich in der wässrigen Phase

befindet, wurde nach den Vorschriften von Claisen und Beyer [14, 15] zu Benzolazolmalondialdehyd und 4-Benzolazo-1-phenyl-pyrazol umgesetzt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Wesentliche Befunde für unsere Struktur waren:

1) Auffallend war bei allen Versuchen die grosse Säurelabilität der Pyrophosphatgruppierung des PSPP. Fünfminütige Inkubation in 1n Salzsäure bei 0° hatte eine Hydrolyse von mehr als 70% des PSPP zur Folge, wodurch der org. Rest petrolätherlöslich wurde. Wurde PSPP vor Einwirkung der Salzsäure bromiert (mit methanolischer Br_2 -Lösung bei 0°), so liessen sich nach der gleichen Behandlung nur mehr 2% des org. Restes mit Petroläther extrahieren. Dieses dem FPP analoge Verhalten spricht für eine allylständige Pyrophosphatgruppe im PSPP.

2) Hydrolyseexperimente bei 70° ergaben nicht nur eine Abspaltung von Pyrophosphat, sondern auch von Wasser. Durch gaschromatographische Analyse konnten im wesentlichen drei Substanzen nachgewiesen werden, deren massenspektroskopisch ermitteltes Molekulargewicht 408 war (Molekulargewicht von Squalen: 410). Wurden hingegen diese Versuche bei 0° ausgeführt, so erhielt man grösstenteils Präqualenol (PS-OH), das durch Verätherung stabilisiert werden konnte (s. Absatz 3). Die leicht erfolgende Eliminierung von Wasser bei erhöhter Temperatur lässt sich am besten erklären, wenn man dem PS-OH die Struktur eines tertiären Alkohols zuschreibt.

3) Für die Aufnahme eines Massenspektrums war es günstig, die Pyrophosphatgruppe des PSPP abzuspalten und das erhaltene Präqualenol (PS-OH) durch Verätherung mit Trimethylsilierungsagens [12] zu stabilisieren. Zur Abtrennung des Pyrophosphates wählten wir die schonende und selektive enzymatische Spaltung mit Phosphatase. Mit saurer Prostata-Phosphatase konnte eine vollständige Spaltung des PSPP erzielt werden. Injektion des trimethylsilierten Präparates in den Gaschromatographen ergab einen einzigen Gipfel. Von der am Ausgang des Gaschromatographen aufgefangenen trimethylsilierten Substanz wurde ein Massenspektrum angefertigt. Ausserdem wurden vom unveränderten Alkohol und dessen Methyläther, der durch Verätherung mit Bortrifluorid-Diazomethan [13] erhalten wurde, Massenspektren angefertigt. Die Massenspektren zeigten in allen Fällen das gleiche Spal-

Table 1

Umkristallisation der Derivate des Malondialdehyds. (Benzolazomalondialdehyd wurde aus Alkohol, 4-Benzolazo-1-phenylpyrazol aus Eisessig umkristallisiert).

Kristallisation	Benzolazo-malondialdehyd		4-Benzolazo-1-phenylpyrazol	
	IpM/mMol	Fp(°C)	IpM/mMol	Fp(°C)
4.	16 000	118	14 300	126
7.	15 800	118	14 400	126

tungsschema. Von den Massengipfeln konnte nur derjenige bei m/e 395 mit unserer Strukturvorstellung vorerst noch nicht in Einklang gebracht werden. Dieses Fragment, das durch Abspaltung des Radikals CH_2OR erklärt werden könnte, wäre mit dem Vorliegen eines primären Alkohols vereinbar. Andererseits sprechen die vorher erwähnten chemischen Befunde für einen tertiären Alkohol. Wir legten diesen Ergebnissen mehr Gewicht bei. Wichtig war für uns, dass in allen Spektren nur ein Molekülgipfel auftritt, aus dem sich für das PS-OH ein Molekulargewicht von 426 errechnet.

4) Im NMR-Spektrum (mit einem Varian HA 100 aufgenommen) des PS-OH konnte im Bereich von 9,4–10 π keine Signale beobachtet werden. Wir können somit den von Rilling postulierten Cyclopropanring, der sich durch besonders hohe, um 9,8 π liegende Protonensignale auszeichnet, nicht bestätigen.

5) Im PSPP, aus $1\text{-}^3\text{H}_2\text{-}1\text{-}^{14}\text{C}$ -FPP synthetisiert, konnte Rilling [1] nur mehr drei Tritiumatome nachweisen, Popják [3] hingegen vier. Bei entsprechenden Doppelmarkierungsversuchen, die auf einer Bestimmung des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses im $1\text{-}^3\text{H}_2\text{-}4\text{-}^{14}\text{C}$ -FPP und daraus gebildetem PSPP und Squalen beruhten, fanden wir in Bestätigung der Angaben Rillings nur drei Tritiumatome im PSPP.

6) Den unmittelbare Nachweis für die Richtigkeit unseres Strukturvorschlages erbrachte die Ozonisation des aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -FPP erhaltenen PSPP. Wie aus der Formel III hervorgeht, sollte man bei reduktiver Spaltung des Ozonids von PSPP radioaktiven Malondialdehyd erhalten. Malondialdehyd wurde als Benzolazomalondialdehyd und als 4-Benzolazo-1-phenylpyrazol charakterisiert [14, 15]. Beide Verbindungen liessen sich zur konstanten Radioaktivität umkristallisieren (Tab. 1). Die Ausbeute an radioaktivem Malondialdehyd, der durch Ozonisierung des PSPP entstanden war, betrug 10%.

Alle unsere Befunde sind mit der Struktur eines 2, 6, 10, 15, 19, 23-Hexamethyl-*n*-tetracos-2, 6, 11, 14, 18, 22-hexaen-10-yl-pyrophosphates (III) für PSPP vereinbar. Mit dieser Struktur des PSPP lässt sich auch die Vorstellung von Cornforth und Popják für den Mechanismus der Squalenbiosynthese [16] in Einklang bringen, wonach 1. ein FPP zu NPP isomerisiert wird, 2. NPP und FPP zu PSPP verknüpft werden und 3. PSPP unter Reduktion mit TPHN zu Squalen übergeht.

Anmerkung

Herrn Dr. W. Schäfer danken wir für die Aufnahme der Massenspektren, Fräulein G. Schild und Herrn Dr. J. Sonnenbichler für die Aufnahme der NMR-Spektren, Herrn H. Schulz für das quantitative Verbrennen der Substanzen.

Referenzen

- [1] H.C. Rilling, J. Biol. Chem. 241 (1966) 3233.
- [2] H.C. Rilling, J. Am. Chem. Soc. 91 (1969) 1041.
- [3] G. Popják, J. Edmond, K. Clifford, V. Williams, J. Biol. Chem. 244 (1969) 1897.
- [4] G. Popják, in: Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid (Biochem. Soc. Symp. No. 29, Liverpool, 1969) ed. T.W. Goodwin (Academic Press, New York, London, 1970).
- [5] H. Wasner und F. Lynen, Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 134.
- [6] H. Wasner, Dissertation Universität München (1970).
- [7] F. Cramer, W. Böhm, Angew. Chem. 71 (1959) 775.
- [8] M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z. 329 (1957) 332.
- [9] M.F. Utter, D.B. Keech, P.M. Nossal, Biochem. J. 68 (1958) 431.
- [10] G. Schmidt, in: Methods in Enzymology, Vol. II, eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Academic Press, New York, 1955) p. 523–530.
- [11] Eugen Müller, Methoden der organischen Chemie, Merang. Houben Weyl (Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1954) Bd. VII, Teil I, S. 333–345.
- [12] B. Hamprecht, Dissertation Universität München (1968).
- [13] E. Müller, W. Rundel, Angew. Chem. 70 (1958) 105.
- [14] L. Claisen, Chem. Berichte 36 (1903) 3668.
- [15] C. Beyer und L. Claisen, Chem. Berichte 21 (1888) 1697.
- [16] G. Popják and J.W. Cornforth, in: Advances in Enzymology, Vol. XXII, ed. F.F. Nord (Interscience, New York, 1960) p. 281.