

242. Zur Beeinflussung des Acetat-Einbaues in Cholesterin durch isoprenartige C₅- und C₆-Verbindungen¹⁾

von K. F. Gey, A. Pletscher, O. Isler, R. Rüegg und J. Würsch.

(14. X. 57.)

Die chemische Strukturaufklärung zahlreicher Terpene und verwandter Verbindungen führte zur Aufstellung der Isoprenregel durch *L. Ruzicka*²⁾. Biochemische Untersuchungen weisen immer mehr darauf hin, dass die Biosynthese solcher Naturstoffe tatsächlich nach dieser Regel verläuft, nämlich durch Polymerisation der sogenannten Isopreneinheit, einer monomeren niedermolekularen Verbindung mit verzweigter C-Kette. Die Biosynthese des Cholesterins erfolgt, nach Versuchen mit markierten Bausteinen, über Squalen (oder eine Verbindung mit gleichem Kohlenstoffgerüst) durch Kondensation von 6 Isopreneinheiten³⁻⁸⁾. Die Struktur der aus Acetat gebildeten Isopreneinheit ist zur Zeit noch unsicher.

Nach früheren Fütterungsversuchen kamen vor allem Isovaleriansäure (IVA)⁹⁾ und β , β -Dimethylacrylsäure (DMA)³⁾⁴⁾ als isoprenartige Cholesterinbausteine in Frage. *In vitro* hingegen zeigten ausser

¹⁾ In dieser Arbeit werden folgende (in der anglo-amerikanischen Literatur eingeführte) Abkürzungen benutzt:

IVA	Isovaleriansäure
DMA	β , β -Dimethylacrylsäure (β -Methylcrotonsäure)
HIV	β -Hydroxyisovaleriansäure
MG	β -Methylglutaconsäure (<i>cis</i> - und <i>trans</i> -)
HMG	β -Hydroxy- β -methylglutarsäure
MVA	β , δ -Dihydroxy- β -methylvaleriansäure [Mevalonic acid]
DPN	Diphosphopyridinnukleotid
AMP	Adenosin-5-monophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
CoA	Coenzym A

²⁾ Übersicht siehe *L. Ruzicka*, *Experientia* **9**, 357 (1953).

³⁾ *J. Würsch*, *R. L. Huang* & *K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **195**, 439 (1952). — *R. G. Langdon* & *K. Bloch*, *ibid.* **200**, 135 (1953). — *K. Bloch*, *Harvey Lectures* **48**, 68 (1952—1953).

⁴⁾ *K. Bloch*, *L. C. Clark* & *I. Harary*, *J. biol. Chemistry* **211**, 687 (1954).

⁵⁾ *E. Schwenk*, *G. J. Alexander*, *C. A. Fish* & *T. H. Stoult*, *Fed. Proc.* **14**, 752 (1955).

⁶⁾ *K. Bloch* in *S. Graff*, *Essays in Biochemistry*, *J. Wiley & Sons*, New York 1956, S. 22.

⁷⁾ *J. W. Cornforth*, *I. Youhotsky-Gore* & *G. Popják*, *Biochem. J.* **65**, 94 (1957). — *J. W. Cornforth*, *R. H. Cornforth*, *G. Popják* & *I. Youhotsky-Gore*, *ibid.* **66**, 10 P (1957). — *F. Ditari* & *S. Gurin*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2650 (1957).

⁸⁾ *O. Isler*, *R. Rüegg*, *J. Würsch*, *K. F. Gey* & *A. Pletscher*, *Helv.* **40**, 2369 (1957).

⁹⁾ *I. Zabin* & *K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **185**, 131 (1950); **192**, 261 (1951).

DMA⁴)¹⁰⁻¹⁶) noch eine Reihe anderer Verbindungen mit verzweigter C-Kette enge Beziehungen zur Cholesterinbiosynthese: β -Methylglutaconsäure (MG⁴)¹³), β -Hydroxy- β -methylglutarsäure (HMG⁴)¹⁰)¹¹)¹³)¹⁵)¹⁷⁻²¹) und β -Hydroxyisovaleriansäure (HIV⁴)¹⁰)¹¹)²⁰)²²). Nach neuesten Untersuchungen sind β , δ -Dihydroxy- β -methylvaleriansäure (MVA)²³⁻²⁶), bzw. ihr Lacton, und β -Hydroxy- β -methylglutaraldehydsäure²⁷) *in vitro* allen obengenannten Verbindungen als Cholesterinbaustein überlegen. Gleiches ist für *in-vivo*-Bedingungen zu vermuten²⁶). Diese Carbonsäuren mit Isoprenengerüst wurden bisher nur teilweise direkt verglichen. Dabei ergaben sich gegensätzliche Resultate, z. B. im Falle von HMG und DMA⁴)¹⁸)¹⁹), was sich teilweise dadurch erklären lässt, dass die Verbindungen je nach den Versuchsbedingungen *in vitro* ineinander übergehen können⁶). Diese Beziehungen wurden erst kürzlich systematisch untersucht, jedoch noch ohne Berücksichtigung von MVA²⁸).

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Anhaltspunkte über die Natur der zu Cholesterin führenden Isopreneinheit gewonnen werden. Hierzu wurden 7 physiologische Carbonsäuren, einschliesslich MVA, unter einheitlichen Bedingungen verglichen. Ferner wurden 8 weitere, bisher noch nicht untersuchte Verbindungen geprüft, die möglicherweise Beziehungen zu dieser Isopreneinheit besitzen. Die angewandte Methodik ist indirekt; sie beruht auf der Messung des Einbaues von [^{1-¹⁴C}]-Acetat in digitoninfällbare Substanzen und dessen Hemmung durch die erwähnten Verbindungen. Die Experimente wurden mit Leberhomogenaten und Leberschnitten von Ratten durchgeführt.

¹⁰) J. L. Rabinowitz, F. Dituri, F. Cobey & S. Gurin, Fed. Proc. **14**, 760 (1955).

¹¹) M. J. Coon, Fed. Proc. **14**, 762 (1955).

¹²) J. L. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3037 (1954).

¹³) J. L. Rabinowitz & S. Gurin, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5168 (1954).

¹⁴) H. Rudney, Fed. Proc. **13**, 287 (1954).

¹⁵) H. Rudney & T. G. Farkas, Fed. Proc. **14**, 757 (1955).

¹⁶) H. Rudney, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1698 (1954).

¹⁷) H. Rudney, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2595 (1954). — H. Rudney, Fed. Proc. **15**, 342 (1956). — J. J. Ferguson jr. & H. Rudney, *ibid.* **16**, 179 (1957). — H. Rudney & J. J. Ferguson jr., J. Amer. chem. Soc. **79**, 5580 (1957).

¹⁸) J. L. Rabinowitz & S. Gurin, J. biol. Chemistry **208**, 307 (1954).

¹⁹) F. Dituri, F. Cobey, J. V. B. Warms & S. Gurin, Fed. Proc. **14**, 203 (1954).

²⁰) J. L. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1295 (1955).

²¹) F. Dituri, F. A. Cobey, J. V. B. Warms & S. Gurin, J. biol. Chemistry **221**, 181 (1956).

²²) B. K. Bachhawat, W. G. Robinson & M. J. Coon, J. biol. Chemistry **219**, 539 (1956).

²³) P. A. Tavormina, M. H. Gibbs & J. W. Huff, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4498 (1956).

²⁴) P. A. Tavormina & M. H. Gibbs, J. Amer. chem. Soc. **78**, 6210 (1956).

²⁵) L. D. Wright, Fed. Proc. **16**, 274 (1957). — P. A. Tavormina & M. H. Gibbs, J. Amer. chem. Soc. **79**, 758 (1957).

²⁶) R. G. Gould & G. Popják, Biochem. J. **57**, 51 P (1957).

²⁷) C. H. Shunk, B. O. Linn, J. W. Huff, J. L. Gilfillan, H. R. Skeggs & K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. **79**, 3294 (1957).

²⁸) L. F. Adamson & D. M. Greenberg, Biochim. Biophys. Acta **23**, 472 (1957).

Die Grösse der Hemmung des Acetateinbaues liefert Anhaltspunkte dafür, in welchem Mass die verschiedenen physiologischen C_5 - und C_6 -Verbindungen an Stelle von Acetat für die Cholesterinbiosynthese verwendet werden: je mehr von der betr. Verbindung eingebaut wird, desto geringer wird der Acetatverbrauch und desto enger dürfte diese Verbindung mit der hypothetischen Isoprenreinheit verwandt sein. Da die digitoninfällbaren radioaktiven Substanzen aus Rattenleber neben Cholesterin vermutlich ausschliesslich Cholesterinvorläufer und -begleitstoffe enthalten⁵⁾, können sie im Rahmen dieser Arbeit als repräsentativ für Cholesterin gelten.

I. Homogenat-Versuche.

Da unbekannt ist, ob das Phosphat-Puffergemisch (Medium I) den Erfordernissen der lebenden Zelle genügt, wurde es durch folgende Zusätze modifiziert:

a) HCO_3^- und Adenosintriphosphat (ATP) (Medium II). Diese beiden Substanzen werden für die Carboxylierung von HIV zu HMG benötigt²²⁾.

b) $HCO_3^- + ATP + Biotin$ (Medium III). Biotin scheint ebenfalls ein Cofaktor für den Einbau von DMA bzw. von HIV in Cholesterin zu sein²³⁾.

c) $HCO_3^- + ATP + Biotin + Coenzym A$ (CoA) (Medium IV). Von DMA, HIV und HMG weiss man, dass sie durch Überführung in CoA-Derivate „aktiviert“ werden müssen¹¹⁾¹⁵⁾²²⁾. Das in Leberpräparaten vorhandene endogene CoA sollte hierfür ausreichen⁴⁾¹⁰⁾¹⁸⁾; es ist aber möglich, dass bei schwer „aktivierbaren“ Substanzen die Bildung von CoA-Derivaten gefördert werden muss, z. B. durch Erhöhung der CoA-Konzentration.

Tabelle 1.

Einbau von [$1-^{14}C$]-Acetat in digitoninfällbare Substanzen durch Rattenleberhomogenate bei Verwendung verschiedener Inkubationsmedien.

Prozentualer Vergleich der relativen totalen Aktivität der Digitonide.

In allen Ansätzen gleiche Konzentration der Zusätze.

1. Phosphatpuffer mit DPN und AMP (Medium I)	100 ± 2%
2. Phosphatpuffer mit DPN und AMP + ATP (Medium I + ATP)	60 ± 3%
3. HCO_3^- -haltiger Phosphatpuffer mit DPN und AMP + ATP (Medium II)	60 ± 1% 100 ± 2%
4. HCO_3^- -haltiger Phosphatpuffer mit DPN, AMP, ATP + Biotin (Medium III)	(48 ± 2%)* 80 ± 4%
5. HCO_3^- -haltiger Phosphatpuffer mit DPN, AMP, ATP + CoA (Medium II + CoA)	(37%)* 61
6. HCO_3^- -haltiger Phosphatpuffer mit DPN, AMP, ATP, Biotin und CoA (Medium IV)	(35 ± 1%)* 59 ± 2%
*) Auf Medium I zurückgerechnete Werte.	

²³⁾ G. M. Jacobsohn & R. C. Corley, Fed. Proc. **16**, 200 (1957). — M. R. Gram, *ibid.* **16**, 387 (1957).

Tab. 1 zeigt den Einfluss dieser Supplemente auf den Acetat-einbau in Cholesterin: ATP und CoA verminderten ihn erwartungsgemäss¹⁸⁾ erheblich, Biotin nur wenig, während HCO_3^- ohne Einfluss war.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse unserer Versuche über die Beeinflussung des Acetat-Einbaues durch die physiologischen C_5^- und C_6^- Carbonsäuren zusammengefasst.

In Phosphatpuffer (Medium I) bewirkten alle geprüften C_5^- Carbonsäuren eine relativ geringe Verminderung des Acetateinbaues in Cholesterin. Bei einem molaren Verhältnis [1- ^{14}C]-Acetat:Carbonsäure = 1:20 war die Verdrängung des Acetats bei IVA am stärksten, dann folgte DMA, bei HIV war sie gegenüber den Kontrollwerten nicht mehr signifikant. Konzentrationserhöhung der Carbonsäuren schien die Hemmung des Acetateinbaues zu verstärken; z. B. war bei zehnfacher DMA-Konzentration die Hemmung fünfmal grösser. Von den C_6^- -Säuren waren *cis*- und *trans*-MG ohne Einfluss, HMG hemmte sehr stark, *d,l*-MVA am stärksten. Der Unterschied zwischen HMG und MVA ist statistisch nicht gesichert; es ist jedoch zu berücksichtigen, dass von *d,l*-MVA nur das eine optische Isomere stoffwechsellaktiv ist³⁰⁾.

Der Zusatz von ATP + HCO_3^- (Medium II) steigerte die Hemmwirkung sowohl von DMA als auch HIV nur wenig; DMA blieb dabei HIV überlegen. Nach Zusatz von Biotin (Medium III) bewirkten IVA, DMA und HIV gleich grosse Verdrängung des Acetats. Dasselbe war zu beobachten, wenn dem ATP- und HCO_3^- -haltigen Puffer Coenzym A anstatt Biotin zugesetzt wurde. Supplementierung mit Coenzym A + Biotin (Medium IV) vergrösserte die Hemmwirkung der HIV derart, dass sie diejenige von DMA und IVA übertraf; die Verhältnisse zwischen IVA, DMA und HIV waren somit umgekehrt wie in Medium I, wo IVA am aktivsten war. Die Unterschiede zwischen Medium I und IV waren unabhängig von der totalen [1- ^{14}C]-Acetat-Menge, welche in die digitoninfällbaren Substanzen eingebaut wurde.

Unsere Ergebnisse bestätigen zunächst, dass MVA *in vitro* allen übrigen geprüften isoprenartigen Verbindungen bezüglich des Acetat-Einbaues überlegen und damit der hypothetischen Isopreneinheit sehr nahe verwandt ist²³⁾. Da bei unserem Vergleich neben MVA auch HMG eine ähnlich hohe Aktivität aufwies, darf geschlossen werden, dass die Biosynthese des Cholesterins – zumindest in Leberhomogenaten bei einem optimalen pH – die Reduktion einer Carboxylgruppe der HMG einschliesst und über den folgenden Hauptweg verläuft, der auf Grund einiger Publikationen⁶⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁵⁾²³⁾²⁸⁾³¹⁾³²⁾ zu vermuten war:

³⁰⁾ D. E. Wolf, C. H. Hoffman, P. E. Aldrich, H. R. Skeggs, L. D. Wright & K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4499 (1956); **79**, 1486 (1957).

³¹⁾ B. H. Amdur, H. Rilling & K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2646 (1957).

³²⁾ F. Lynen, Klin. Wochenschr. **35**, 213 (1957).

Tabelle 2.

Versuche mit Rattenleberhomogenaten: Hemmung des [$1-^{14}C$]-Acetat-Einbaues in digitoninjährlbare Substanzen durch bekannte physiologische isoprenartige C_5 - und C_6 -Carboxyl-Verbindungen.

Prozentualer Vergleich der relativen totalen Aktivität der Digitonide (Kontrollwerte = 100). Angabe der Durchschnittswerte \pm mittlerer Fehler m^* ; Zahl der Versuche in Klammer.

Medium I: Phosphatpuffer inkl. DPN und AMP

Medium II: Phosphatpuffer inkl. DPN und AMP + ATP + HCO_3^-

Medium III: Phosphatpuffer inkl. DPN, AMP, ATP und HCO_3^- + Biotin

Medium IV: Phosphatpuffer inkl. DPN, AMP, ATP und HCO_3^- + Biotin + Coenzym A

Zusatz	Mol. Verhältnis [$1-^{14}C$]- Acetat: Zusatz	Medium I	Medium II	Medium III	Medium IV	p
$CH_3-CH-CH_2-COOH$ CH_3	1:20	71 ± 3 (6)		81 (1)	74 ± 3 (5)	
$CH_3-C=CH-COOH$ CH_3	1:20	86 ± 3 (4)	76 ± 2 (11)	83 ± 4 (2)	75 ± 4 (5)	I:II < 0,05 I:IV
β , β -Dimethyl- acrylsäure (DMA)	1:200	30 ± 8 (4)				
β -Hydroxyiso- valeriansäure (HIV)	1:20	93 ± 5 (4)	85 ± 3 (10)	87 ± 3 (2)	64 ± 5 (6)	I:II > 0,05 I:IV II:IV < 0,01 III:IV
H $HOOC-CH_2-C=C-COOH$ CH_3	1:20	118 ± 8 (4)				

$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$ $\begin{array}{c} \\ \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p><i>cis</i>-β-methyl- glutaconsäure (<i>cis</i>-MG)</p>	1:20	106 ± 6 (2)	20 ± 2 (8)	DMA, HIV zu Kontr. $p < 0,01$	11 ± 2 (6)	IVA, HIV, DMA, HMG zu Kontr. $p < 0,01$	IVA: DMA > 0,05 IVA: HIV > 0,05 DMA: HIV > 0,05
$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ $\begin{array}{c} \\ \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>β-Hydroxy- β-methyl- glutarsäure (HMG)</p>	1:20	18 ± 4 (4)		DMA, HIV zu Kontr. $p < 0,01$			
$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ $\begin{array}{c} \\ \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p><i>dl</i>-β,δ-Dihydroxy- β-methyl- valeriansäure (MVA)</p>	1:10 1:20	12 ± 5 (4) 7 ± 1 (2)	17 ± 1 (4)	DMA, HIV, HMG, MVA zu Kontr. $p < 0,01$			DMA: HIV $p > 0,05$

$$*) m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{N(N-1)}}$$

Acetat \rightarrow Acetoacetat \rightarrow HMG \rightarrow MVA bzw. β -Methyl- β -hydroxy-glutaraldehydsäure \rightarrow . . . \rightarrow Cholesterin.

Der Befund einer relativ geringen Hemmwirkung von IVA, DMA und HIV bestätigt eine neuere *in-vitro*-Untersuchung, wonach diese C₅-Verbindungen nicht auf einem Hauptweg liegen²⁸). Nachdem DMA bei früheren Fütterungsversuchen⁴) besser als HIV und HMG eingebaut wurde und auch *in vitro* meist aktiver als HIV war¹⁰)²⁰), konnte angenommen werden, dass die Cholesterinbiosynthese aus Acetat über Acetoacetat, HMG, HIV und DMA verläuft⁶)¹⁵). Seit der Auffindung der MVA ist jedoch wahrscheinlicher, dass die Verhältnisse bezüglich IVA, DMA, HIV und HMG umgekehrt liegen, dass nämlich diese Carbonsäuren wie beim Leucinabbau durch Carboxylierung der HIV zu HMG¹¹)²²) Eingang in die Cholesterinsynthese finden. Unsere Befunde zeigen, dass diese Beziehungen unter ausgewählten Bedingungen *in vitro* (Medium II bis IV) tatsächlich demonstriert werden können. Je mehr nämlich die Versuchsbedingungen die „Aktivierung“ freier Carbonsäuren zu CoA-Derivaten sowie die Carboxylierung der HIV zu HMG zu begünstigen schienen (CoA + ATP + HCO₃⁻ + Biotin), desto deutlicher ergab sich die Reihenfolge IVA \equiv DMA < HIV. Da die Acetat-Verdrängung der HIV durch den Zusatz von CoA zum Medium III stärker zunahm als diejenige der DMA und HIV, liegt die Vermutung nahe, dass die „Aktivierung“ der HIV relativ schwer stattfindet.

Sowohl *cis*- wie *trans*-MG liessen in unserer Versuchsanordnung keinen Einfluss erkennen. Offenbar liegen diese Verbindungen *in vitro* nicht auf dem Hauptweg der Cholesterinsynthese, obwohl MG stets, vielleicht als Nebenprodukt, bei der Biosynthese des Cholesterins gebildet wird¹³)²⁰)²⁸).

MVA verliert im Verlauf der Polymerisation die Carboxylgruppe²⁴). Da unbekannt ist, ob diese Decarboxylierung vor oder nach der Kondensation stattfindet, muss mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass MVA in eine C₅-Verbindung übergehen kann. Aus MVA könnten z. B. 3-Methyl-butandiol-(1,3), β -Methyl-crotylalkohol und Isoamylalkohol entstehen, oder aus β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure könnte z. B. β -Hydroxy- β -methyl-butyraldehyd und β -Methylcrotylaldehyd gebildet werden. Tab. 3 zeigt den Einfluss der genannten C₅-Alkohole und -Aldehyde auf den Acetateinbau: β -Methylcrotylaldehyd und -alkohol hemmten annähernd gleich stark, aber weniger als Isoamylalkohol; 3-Methylbutandiol-(1,3) und 3-Hydroxy-3-methyl-butyraldehyd waren ohne Einfluss. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Hemmwirkungen der erstgenannten Verbindungen unspezifische Alkohol- oder Aldehydeffekte sind. Da β -Methylcrotylaldehyd u. U. durch Leberextrakte schnell in DMA und β -Methylcrotylalkohol dismutiert wird³²), ist ungewiss, ob die beobachteten Hemmungen der Alkohol- oder Aldehydgruppe zuzuschreiben sind.

Tabelle 3.*Versuche mit Rattenleberhomogenaten:**Hemmung des [1-¹⁴C]-Acetat-Einbaues in digitonin-fällbare Substanzen durch C₃-Alkohole und -Aldehyde.*

Prozentualer Vergleich der relativen totalen Aktivität der Digitonide (Kontrollwerte = 100). Angabe von Durchschnittswerten \pm mittlerer Fehler *m*; Anzahl der Versuche in Klammer.

Zusammensetzung der Medien wie in Tab. 3; molares Verhältnis [1-¹⁴C]-Acetat: Zusatz = 1:20.

Zusatz	Medium I	Medium IV	p
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isoamylalkohol 35 \pm 4 (4)	37 \pm 3 (3)	< 0,01
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	β -Methylcrotylalkohol (3-Methylbuten-(2)-ol-(1)) 61 \pm 3 (4)	63 \pm 12 (4)	< 0,01
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{CH}-\text{CHO} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	β -Methyl-crotylaldehyd (β -Dimethylacrolein) 59 \pm 3 (2)	47 \pm 5 (5)	< 0,01
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	3-Methylbutandiol-(1,3) (β -Methyl- α,γ -dihydroxy- butan) 101 \pm 2 (2)		
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CHO} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	β -Hydroxy- β -methyl- butyraldehyd 100 \pm 6 (2)		

Aus unserer Versuchsanordnung ist ausserdem nicht zu entscheiden, ob die Verminderung der Acetatverwertung auf einem Einbau der hemmenden Substanzen in die Cholesterinmolekel beruht, oder ob diese Verbindungen spezifische Inhibitoren der Cholesterinsynthese sind. Wenn man die erste Möglichkeit annimmt, so sind die wirksamen Verbindungen weniger gute Cholesterinbausteine als MVA. Sie kommen daher wahrscheinlich nicht als physiologische Decarboxylierungsprodukte der MVA, bzw. der β -Hydroxy- β -methyl-glutaraldehydsäure in Frage. Die Hemmwirkung der erwähnten Aldehyde und Alkohole ist grösser als diejenige der entsprechenden Carbonsäuren DMA und IVA. Deshalb kann vermutet werden, dass IVA und DMA auch auf einem anderen Wege Eingang in die Cholesterinsynthese finden können als dem oben skizzierten über HMG. Für diese Möglichkeit spricht die Beobachtung, dass β -Methylcrotylaldehyd in Hefe aus Acetat gebildet wird³²). Nach früheren *in-vivo*-Befunden mit IVA, DMA und

HIV⁶) kommt diesem Weg jedoch wahrscheinlich keine quantitative Bedeutung zu.

Tab. 4 zeigt die Ergebnisse mit drei weiteren unphysiologischen ungesättigten Verbindungen, die keine oder nur eine geringe Hemmung des Acetat-Einbaues bewirkten. Völlige Reduktion einer Carboxylgruppe der HMG sowie die Einführung von Doppelbindungen zwischen C₃ und C₄ oder zwischen C₄ und C₅ scheinen zu relativ Stoffwechsel-inerten Verbindungen zu führen.

Tabelle 4.

Versuche mit Rattenleberhomogenaten:

Hemmung des [1-¹⁴C]-Acetat-Einbaues in digitoninjälbbare Substanzen durch verschiedene ungesättigte Verbindungen mit struktureller Verwandtschaft zu bekannten physiologischen isoprenartigen Verbindungen.

Prozentualer Vergleich der relativen totalen Aktivität der Digitonide (Kontrollwerte = 100). Angabe von Durchschnittswerten ± mittlerer Fehler m; Anzahl der Versuche in Klammer.

Inkubationsmedium I; Verhältnis [1-¹⁴C]-Acetat: Zusatz = 1:20.

Zusatz	% der Kontrollwerte
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	3-Methyl-buten-(1)-ol(3) 94 ± 1 (2)
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	3-Hydroxy-3-methyl-penten-(4)-säure 84 ± 2 (2)
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	3-Methyl-penten-(3)-säure 80 ± 5 (5)

II. Fütterungsversuche.

Nach mehrtägiger Verfütterung von DMA, HIV, *trans*-MG und HMG war der Acetat-Einbau durch Leberschnitte meist in geringem, aber nicht signifikantem Masse vermindert; Verfütterung von MVA führte in 2 von 4 Versuchen zu einer statistisch schwach gesicherten Herabsetzung des Acetat-Einbaues (Tab. 5 und 6). Von den übrigen Verbindungen wurde nur 3-Methylcrotylalkohol in dieser Weise geprüft; der Acetat-Einbau zeigte dabei keine signifikante Verminderung gegenüber den Kontrollwerten. Verfütterung von annähernd äquivalenten Squalen- und Cholesterinmengen drängte die Cholesterinsynthese

Tabelle 5.

Versuche mit Rattenleberschnitten:

[1-¹⁴C]-Acetat-Einbau in digitonin-fällbare Substanzen nach Verfütterung verschiedener isoprenartiger C₃- und C₆-Carbonsäuren, Squalen und Cholesterin. Beeinflussung der relativen totalen Aktivität.

Verfütterte Verbindung (als K ⁺ -Salz)	Tägl. Dosis in g per kg Ratte	Ver- suchs- dauer in Tagen	Ver- suchs- gruppe Nr.	Mittelwert der tot. Aktivität ± mittlerer Fehler m (in epm/mg Cholesterin-C)		Prozentualer Vergleich		p	
				Kontrolltiere	Versuchstiere	Kontrolltiere	Versuchstiere		
β , β -Dimethylacrylsäure (DMA)	0,5	2	M	1397 ± 222	1032 ± 191	100 ± 16	74 ± 14	> 0,05	
		4	N	1092 ± 160	1792 ± 687	100 ± 15	164 ± 63		
β -Hydroxy-isovaleriansäure (HIV)	0,5	2	O	2126 ± 1219	1434 ± 330	100 ± 57	67 ± 16		
		4	P	5130 ± 1262	3702 ± 1729	100 ± 25	72 ± 34		
β -trans-Methylglutaconsäure (trans-MG)	0,5	2	Y	2399 ± 336	1602 ± 187	100 ± 14	67 ± 8		
		4	Z	2834 ± 249	2416 ± 744	100 ± 88	85 ± 26		
β -Hydroxy- β -methylglutar- säure (HMG)	0,5	2	Q	3768 ± 2352	2459 ± 625	100 ± 62	65 ± 17		
		4	R	6300 ± 2117	7653 ± 1597	100 ± 34	121 ± 25		
<i>d,l</i> - β , δ -Dihydroxy- β - methylvaleriansäure (MVA)	0,5	2	S	1626 ± 489	336 ± 54	100 ± 30	21 ± 3		< 0,05
		4	T	1143 ± 211	928 ± 418	100 ± 18	81 ± 37		> 0,05
Squalen	0,5	2	A'	2089 ± 685	1156 ± 369	100 ± 33	55 ± 18	> 0,05	
		4	B'	5408 ± 3674	972 ± 407	100 ± 68	18 ± 8	< 0,05	
Cholesterin	1,0	3	Sq1	2035 ± 25	272 ± 128	100 ± 1	13 ± 6	< 0,01	
		4	Sq2	256 ± 136	21 ± 11	100 ± 52	8 ± 4	< 0,05	
Cholesterin	1,0	2	Ch1	2187 ± 559	86 ± 57	100 ± 26	4 ± 3	< 0,01	
		8	Ch2	5460 ± 870	707 ± 131	100 ± 16	13 ± 2	< 0,01	

Tabelle 6.

Versuche mit Rattenleberschnitten:
 Versuche mit Verfüttierung verschiedener isoprenartiger C_5 - und C_6 -Carbonsäuren.
 Beeinflussung der relativen spezifischen Aktivität.

Substanz	Tägl. Dosis in g per kg Ratte	Verdauerdauer in Tagen	Versuchsgruppe Nr.	Mittelwert der spez. Aktivität \pm mittlerer Fehler (in cpm/mg Cholesterin-C)		Prozentualer Vergleich		P
				Kontrolltiere	Versuchstiere	Kontrolltiere	Versuchstiere	
β, β -Dimethylacrylsäure (DMA)	0,5	2	M	766 \pm 47	580 \pm 73	100 \pm 6	76 \pm 10	
		4	N	750 \pm 31	1706 \pm 313	100 \pm 4	228 \pm 42	
β -Hydroxy-isovaleriansäure (HIV)	0,5	2	O	1930 \pm 471	1159 \pm 191	100 \pm 24	60 \pm 10	> 0,05
		4	P	3049 \pm 563	2632 \pm 1117	100 \pm 19	86 \pm 37	
β -Hydroxy- β -methylglutarsäure (HMG)	0,5	2	Q	3339 \pm 1598	1731 \pm 448	100 \pm 48	52 \pm 13	
		4	R	5025 \pm 556	6525 \pm 1547	100 \pm 11	130 \pm 31	
<i>d, l</i> - β, δ -Dihydroxy- β -methylvaleriansäure (MVA)	0,5	2	S	1254 \pm 293	345 \pm 53	100 \pm 23	28 \pm 4	< 0,05
		4	T	992 \pm 97	788 \pm 388	100 \pm 10	79 \pm 39	

aus Acetat unter gleichen Bedingungen erwartungsgemäss³³⁾ signifikant zurück (Tab. 5 und 6).

Unser Befund, dass MVA von allen verfütterten Verbindungen die stärkste Tendenz zu Verminderung des Acetat-Einbaues besitzt, lässt annehmen, dass MVA auch *in vivo* von allen geprüften Verbindungen die engsten Beziehungen zur Isopreneinheit hat. Er bestätigt damit neueste Befunde über den *in-vivo*-Einbau von ¹⁴C-MVA in Leber- und Restkörper-Cholesterin der Maus²⁶⁾. Da MVA die „*in vivo*“-Synthese jedoch nicht in gleichem Ausmass wie der Cholesterinvorläufer Squalen zu verringern vermag, wird MVA *in vivo* vermutlich nur teilweise zur Cholesterinbiosynthese verwendet; der Rest geht wahrscheinlich durch Nebenreaktionen oder Abbau verloren. DMA, HIV, *trans*-MG und HMG werden wahrscheinlich in noch grösserem Masse in solchen Reaktionen verbraucht, die keine Beziehung zum Cholesterinaufbau haben. Diese Interpretation setzt voraus, dass zwischen den genannten Verbindungen und Squalen keine Unterschiede bei der Resorption im Darm, der Aufnahme durch innere Organe aus dem Blutplasma usw. bestehen.

Experimenteller Teil.

Nach Literaturangaben wurden folgende Verbindungen dargestellt:

- β , β -Dimethylacrylsäure (Smp. 70–71⁰)³⁴⁾,
cis- β -Methylglutaconsäure (Smp. 140–142⁰) und
trans- β -Methylglutaconsäure (Smp. 112–114⁰)³⁵⁾,
 β -Hydroxy- β -methylglutarsäure (Smp. 103–105⁰)³⁶⁾,
d,l- β -Hydroxy- β -methyl- δ -valerolacton⁸⁾,
 β -Hydroxyisovaleriansäure (Sdp. 76–78⁰/0,1 Torr)³⁷⁾,
 β -Methylcrotylaldehyd (Sdp. 132⁰; $n_D^{27} = 1,4494$)³⁸⁾,
 β -Hydroxy- β -methyl-butiraldehyd (Sdp. 69–74⁰/18 Torr; $n_D^{25} = 1,4395$)³⁸⁾,
3-Methyl-penten-(3)-säure (Sdp. 103–105⁰/14 Torr; $n_D^{24} = 1,4505$)³⁹⁾,
3-Methyl-butandiol-(1,3) (Sdp. 100⁰/12 Torr; $n_D^{24} = 1,4400$) wurde durch *Reformatsky*-Reaktion von Bromessigester mit Aceton und anschliessender Reduktion mit LiAlH₄ dargestellt,
3-Hydroxy-3-methyl-penten-(4)-säure (Sdp. 75⁰/0,03 Torr; $n_D^{24} = 1,4581$) durch *Reformatsky*-Reaktion von Bromessigester und Methylvinylketon und Verseifung.
3-Methyl-buten-(1)-ol-(3) (Sdp. 99⁰; $n_D^{25} = 1,4140$) wurde durch Acetylenanlagerung an Aceton und Partialhydrierung der Dreifachbindung bereitet,
3-Methyl-buten-(2)-ol-(1) (Sdp. 61–63⁰/24 Torr; $n_D^{22} = 1,4356$) wurde aus 3-Methyl-buten-(2)-säure-(1) mit LiAlH₄ hergestellt.
Isovaleriansäure war ein redestilliertes Handelsprodukt (*Fluka*) (Sdp. 176⁰), Isoamylalkohol käufliche p.a.-Ware (*Merck*).

³³⁾ R. G. Langdon & K. Bloch, J. biol. Chemistry **200**, 135 (1953). — G. M. Tomkins, *ibid.* **202**, 487 (1953). — R. G. Langdon & K. Bloch, *ibid.* **202**, 77 (1953). — G. M. Tomkins, H. Sheppard & I. L. Chaikoff, *ibid.* **203**, 781 (1953).

³⁴⁾ O. Süss, W. Schäfer & M. Grundkötter, Liebigs Ann. Chem. **571**, 201 (1951).

³⁵⁾ F. Feist, Liebigs Ann. Chem. **345**, 60 (1906).

³⁶⁾ R. Adams & B. L. van Duuren, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2377 (1953).

³⁷⁾ W. Patterson & J. Duckett, J. chem. Soc. **127**, 624 (1925).

³⁸⁾ F. G. Fischer, Ber. deutsch. chem. Ges. **76**, 734 (1943).

³⁹⁾ G. A. Kon & R. P. Linstad, J. chem. Soc. **127**, 616 (1925).

I. Versuche mit Leberhomogenaten:

Für alle Versuche wurden männliche *Wistar-Ratten* von 80—100 g aus einer Eigenzucht verwendet. Etwa 2—4 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme erfolgte Decapitation mit weitmöglichster Entblutung, Entnahme der Leber, vorsichtiges Ausdrücken des restlichen Blutes zwischen Filterpapier und Kühlung in eiskaltem Kaliumphosphatpuffer, $\text{pH} = 7,4$.

Das *Homogenisieren* der Lebern erfolgte einzeln in 2,5 Vol. Phosphatpuffer in einem extrem weiten *Potter-Elvehjem*-Homogenisator während 15—20 Sek.⁴⁰⁾ Die molaren Konzentrationen per Liter des letztgenannten *Puffers* betragen: K_2HPO_4 0,056; KH_2PO_4 0,035; Nicotinsäureamid 0,030; MgCl_2 0,004; Glutathion 0,010⁴¹⁾. Das Homogenat wurde 10 Min. bei ca. $3000 \times g$ zentrifugiert; 4,0 ml des Überstehenden wurden mit 3—3,5 ml des gleichen Puffers und folgenden *Zusätzen* versetzt: Natrium-[1- ^{14}C]-acetat (*Radiochemical Centre*, Amersham, England) bis zu einer molaren Endkonzentration von 1×10^{-4} (4 μC pro Ansatz); Diphosphopyridinnucleotid (*Schwarz*), 0,0005⁴¹⁾ und Adenosin-5-monophosphat (*Zellstoffwerke Waldhof*), 0,0008¹⁸⁾; Testsubstanzen als Kaliumsalze $1 \times$ bis 2×10^{-3} oder 2×10^{-2} . Dieses Inkubationsgemisch wird als *Medium I* bezeichnet. *Medium II*: KHCO_3 (statt Kaliumphosphat) bis zu einer molaren Endkonzentration von 8×10^{-3} und ATP (*Zellstoffwerke Waldhof*) bis zu 7×10^{-4} . *Medium III*: ausser KHCO_3 und ATP Biotin (*Roche*) bis zu $1,4 \times 10^{-4}$; *Medium IV*: weiterer Zusatz gegenüber *Medium III* Coenzym A (*Pabst*) bis zu $1,4 \times 10^{-5}$. pH des kompletten Inkubationsgemisches vor Versuchsbeginn: 6,9—7,0 entsprechend dem pH -Optimum¹⁸⁾⁴⁰⁾. Endvolumen der einzelnen Ansätze 7,0 oder 7,5 ml. Alle vorbereitenden Operationen erfolgten bei $+2^\circ$ bis $+4^\circ$.

Inkubation während 3 Std. in grossen *Warburg*-Gefässen mit einer Schüttelfrequenz von ca. 110/Min. bei $37,5^\circ$. Bei *Medium I* diente Luft als Gasphase, bei *Medium II* bis *IV* 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 . Bei Luft als Gasphase wurde 0,4 ml 30-proz. KOH mit einer kleinen Filterpapierrolle vor der Inkubation in den Zentralteil des *Warburg*-Gefässes gegeben. Abstoppen der Inkubation geschah durch 0,4 ml 5-n. H_2SO_4 aus dem Seitenarm. Bei Verwendung von O_2/CO_2 -Gemisch als Gasphase wurde die Kalilauge erst unmittelbar vor Einkippen der Schwefelsäure eingeführt: Zwischen Manometer und *Warburg*-Gefäss befand sich ein *Claisen*-Aufsatz; die Lauge wurde aus einer Recordspritze durch eine den *Claisen*-Aufsatz oben abschliessende Gummikappe direkt in den Zentralteil des *Warburg*-Gefässes gegeben. Freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ wurde unter 45minütiger Fortsetzung des Schüttelns bei $37,5^\circ$ in der KOH absorbiert.

Die *Verseifung* der Inkubationslösung erfolgte nach Zusatz von 25 mg inaktivem Cholesterin unter Rückfluss während 15—16 Std. unter N_2 in 55-proz. Methanol mit 8-proz. KOH. Das *Unverseifbare* wurde mit mehreren Portionen Petroläther (Sdp. 30—40°) extrahiert. Die vereinigten Petrolätherextrakte wurden wiederholt mit 1-proz. KOH sowie mit Wasser bis zum Neutralpunkt gewaschen und der Petroläther über Natriumsulfat getrocknet. Nach *Digitonin*-fällung der Steroide in 80-proz. Äthanol nutschte man die Digitonide ab und wusch mit Äther in einem *Tracerlab* Precipitation Apparatus. Die so entstandenen Plättchen unendlicher Schichtdicke (d. h. > 17 mg Cholesterindigitonid/ cm^2) wurden unter einer Infrarotlampe vorgetrocknet und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum über Paraffin und P_2O_5 gehalten. Die *Messung der relativen totalen Aktivität* (auf der glatten Unterseite der Plättchen) erfolgte in *Tracerlab* windowless flow counter bis mindestens 1000, meist bis zu 10000 Impulsen und mit Korrektur für den Nulleffekt.

Kontroll- und Versuchsansätze wurden im Doppel durchgeführt. Die Kontroll-Parallelwerte von 14 Versuchen wichen mit einem mittleren Fehler von $\pm 1,7\%$ voneinander ab. In jeder Versuchsserie wurden mehrere Verbindungen unter Verwendung der gleichen Homogenatlösung parallel geprüft. Das Ergebnis eines typischen Inkubationsversuches ist in Tab. 7 dargestellt. Da die Werte für die relative totale Aktivität der Kontrollansätze Tagesschwankungen⁴⁰⁾ und Unterschiede in den verschiedenen Medien I

⁴⁰⁾ I. D. Frantz jr. & N. L. R. Bucher, J. biol. Chemistry **206**, 471 (1954).

⁴¹⁾ N. L. R. Bucher & K. McGarrahan, J. biol. Chemistry **222**, 1 (1956).

bis IV aufwiesen, wurden die Versuchsergebnisse jeweils nur in % der Kontrollwerte des selben Tages ausgedrückt.

Tabelle 7.

Versuche mit Rattenleberhomogenaten:

Typisches Beispiel für die Hemmung des [1-¹⁴C]-Acetat-Einbaues in digitonin-fällbare Substanzen durch physiologische isoprenartige Carbonsäuren.

(Inkubationsmedium II, molares Verhältnis [1-¹⁴C]-Acetat zu Testsubstanz 1:20.)

Zusatz 2×10^{-3} -m.	Digitonid-Plättchen mg	Relative totale Aktivität der Digitonid-Plättchen	
		Impulse per Minute abzüglich Nulleffekt	Prozentualer Vergleich
—	73	2.285	100 ± 1
	75	2.236	
β, β -Dimethylacrylsäure (DMA)	73	1.800	80 } 82 ± 2
	73	1.875	
β -Hydroxy-isovaleriansäure (HIV)	80	2.056	91 } 94 ± 3
	80	2.200	
β -Hydroxy- β -methylglutar- säure (HMG)	76	485	21 } 20 ± 1
	83	439	

II. Versuche mit Leberschnitten (Fütterungsversuche).

Leberschnitte wurden mit freier Hand ca. 0,5 mm dick geschnitten. Etwa 500 mg Schnitte (Frischgewicht) wurden in 4 ml Phosphatpuffer während 3 Std. unter O₂ bei 37,5° und einer Schüttelfrequenz von ca. 110/Min. inkubiert. Da relativ K⁺- und Mg⁺⁺-reiche Puffer für die Cholesterinsynthese optimal sein sollen⁴²⁾, wurde ein *Puffer* folgender Zusammensetzung gewählt (Mol/Liter): NaCl 0,045; KCl 0,084; MgSO₄ 0,005; KH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 7,4) 0,011.

Nach der Inkubation sofortiges Homogenisieren der Leberschnitte in einem *Potter-Elvehjem*-Homogenisator in Methanol, erschöpfende *Extraktion* des Unlöslichen mit kochendem Methanol und Zusatz von Kaliummethylat zu den vereinigten Methanol-Extrakten. *Verseifung* während 2 Std. am Rückflusskühler unter N₂, dann für weitere 30 Min. nach Zugabe von 0,25 Vol. Wasser. Nach Abdampfen des Methanols im N₂-Strom Extraktion des Unverseifbaren mit mehreren Portionen Petroläther (Sdp. 30–40°). Bei ausschliesslicher Bestimmung der rel. totalen Aktivität wurden vor der Verseifung 5 mg inaktives Cholesterin/100 mg Leberschnitte zugegeben. Bei gleichzeitiger Bestimmung der spez. Aktivität erfolgte ein entsprechend geringerer Verdünnungszusatz nach Entnahme von $\frac{1}{10}$ des Unverseifbaren zur Cholesterinbestimmung⁴³⁾. Weiteres Vorgehen bei den Homogenatversuchen.

Bei den *Fütterungsversuchen* wurden täglich jeweils 0,5 g/kg Ratte der mit KOH neutralisierten C₅- und C₆-Carbonsäuren mit dem Futter vermisch. Natürliches Squalen (0,5 g/kg) wurde in Arachisöl (5 ml/kg) und das Cholesterin (1 g/kg) in Form einer 2-proz.

⁴²⁾ G. L. Curran, O. L. Clute, J. biol. Chemistry **204**, 215 (1953).

⁴³⁾ L. L. Abell, B. B. Levy, B. B. Brodie & F. E. Kendall, J. biol. Chemistry **195**, 357 (1952).

wässrigen Suspension dem Futter beigegeben. Die Gewichte der Versuchstiere entsprachen beim Versuchsende denjenigen der Kontrolltiere. Von jeder Leber wurden zwei Ansätze inkubiert. Für jeden Versuch mit C_5 - und C_6 -Verbindungen wurden je vier Kontroll- und Versuchstiere eingesetzt; die Wiederholung des Versuches mit MVA (Versuchsgruppe A' und B') erfolgte mit der doppelten Tierzahl. Die Squalen- und Cholesterin-Gruppen bestanden aus je 2—3 Tieren.

SUMMARY.

1. The influence of nearly all known physiological isoprene-like carboxylic acids with 5 and 6 carbon atoms on the incorporation of [1- ^{14}C]-acetate into substances precipitated by digitonine was investigated by means of liver homogenates in buffers with various supplements. β , δ -Dihydroxy- β -methylvaleric acid and β -hydroxy- β -methylglutaric acid appear to be the most closely related to the hypothetical isoprene unit; isovaleric acid, β , β -dimethylacrylic acid and β -hydroxyisovaleric acid appear to lie on a by-path leading probably *via* β -hydroxy- β -methylglutaric acid to cholesterol. *Trans*- and *cis*- β -methylglutaconic acid do not seem either to be necessary intermediates in cholesterol biosynthesis. β -Methyl-crotylaldehyde, β -methyl-crotyl-alcohol and isomylalcohol considerably inhibited the incorporation of acetate; however, it was uncertain whether this was due to a true inhibition or whether it indicates a metabolic pathway from isovaleric acid and β , β -dimethylacrylic acid to cholesterol which does not proceed *via* β -hydroxy- β -methylglutaric acid.

2. In rats fed β , β -dimethylacrylic acid, β -hydroxyisovaleric acid, *trans*- β -methylglutaconic acid, β -hydroxy- β -methylglutaric acid and β , δ -dihydroxy- β -methylvaleric acid, only β , δ -dihydroxy- β -methylvaleric acid showed a tendency to decrease the incorporation of [1- ^{14}C]-acetate in liver slices. It thus appears that β , δ -dihydroxy- β -methylvaleric acid is an important precursor of cholesterol also *in vivo*, although considerable amounts of it are probably metabolized through other pathways.

Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.*, Basel.
