

Gerhard Habermehl und Arthur Haaf

Cholesterin als Vorstufe in der Biosynthese der Salamanderalkaloide¹⁾

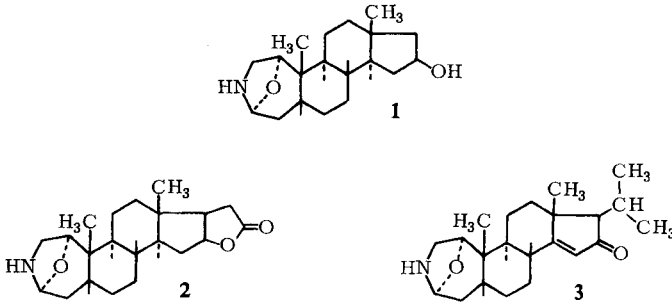
Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 2. Dezember 1965)

In-vitro-Versuche mit radioaktiv markiertem Cholesterin zeigen, daß Cholesterin durch das Sekret aus den Hautdrüsen von *Salamandra maculosa maculosa* in die darin vorkommenden Alkaloide umgewandelt wird.

Die Alkaloide aus dem Hautdrüsensekret von *Salamandra maculosa* besitzen ein Steroidgrundgerüst von 19 Kohlenstoffatomen, dessen Ring A durch eine sekundäre Aminogruppe zu einem Siebenring erweitert ist^{2,3)}.

Sie lassen sich je nach ihrer Substitution an C-17 in drei Gruppen einteilen: für die unsubstituierten stehe als Beispiel das Samandarin (1), für die an C-17 substituierten das Samandarinidin (2) und das Samandenon (3).



Das Vorliegen der $\text{CH}_2\text{—CO}_2\text{H}$ -Seitenkette an C-17 im Samandarinidin wie auch der Isopropylseitenkette im Samandenon ließ vermuten, daß im Verlaufe der Biosynthese ein an C-17 substituiertes Steroid die Vorstufe dieser und auch der an C-17 unsubstituierten Alkaloide ist. Wie bereits früher formuliert⁴⁾, könnten diese Alkaloide aus einer Steroidvorstufe, z. B. Cholesterin, einmal durch Abbau der Seitenkette, Reduktion der Δ^5 -Doppelbindung und weiter durch Einschubung eines Stickstoffatoms²⁾ zwischen die Kohlenstoffatome 2 und 3, sowie Einführung der Sauerstoffatome entstehen.

¹⁾ XVIII. Mitteil. der von C. Schöpf und Mitarbb. begonnenen Reihe „Über Samandarin und verwandte Alkaloide“; XVII. Mitteil.: G. Habermehl und G. Spieller, Liebigs Ann. Chem. 706, 213 (1967).

²⁾ C. Schöpf, Experientia [Basel] 17, 285 (1961).

³⁾ G. Habermehl, Naturwissenschaften 53, 123 (1966).

⁴⁾ G. Habermehl, Chem. Ber. 96, 143 (1963).

Die Annahme, daß das Cholesterin diese Vorstufe sein könnte, war insofern naheliegend, als heute bekannt ist, daß dieses eine zentrale Stellung im Steroidstoffwechsel der Tiere einnimmt. So werden die Steroidhormone wie auch die Gallensäuren⁵⁾ aus Cholesterin gebildet, wobei die Seitenkette ganz oder teilweise entfernt wird; beispielsweise entsteht das Pregnandiol⁶⁾ aus Cholesterin in der Weise, daß zunächst unter Abspaltung von Isocaproensäure Pregnenolon und aus diesem dann Pregnandiol gebildet wird⁷⁾. Auch die Bufadienolide aus den Hautdrüsen der Erdkröte *Bufo bufo* entstehen aus Cholesterin⁸⁾.

Um zu prüfen, ob Cholesterin — das im Drüsensekret des Feuersalamanders in erheblichen Mengen aufgefunden wurde⁹⁾ — die Vorstufe ist, haben wir in-vitro-Versuche durchgeführt, bei denen radioaktiv markiertes [4-¹⁴C]Cholesterin mit frischem Drüsensekret unter Zusatz von ATP als Energielieferant und TPNH als Reduktionsmittel in Phosphatpuffer vom pH 7.4 geschüttelt wurde; als Stickstoffdonator wurde Glutamin zugesetzt, als Sauerstoffquelle diente die Luft.

Bei einem erfolgreichen Verlauf des Versuches sollte sich nun durch Umwandlung des Cholesterins in die Salamanderalkaloide zumindest ein Teil der Aktivität in den Alkaloiden wiederfinden. Die Basen wurden daher in der üblichen Weise isoliert und von den Neutralkörpern abgetrennt. Dabei ergab sich, daß die Alkaloidfraktion 2.7% der eingesetzten Radioaktivität enthielt. Die Alkaloide wurden sodann chromatographisch aufgetrennt und von den Chromatogrammen auf Röntgenfilm Autoradiogramme angefertigt wie auch die Aktivitätsverteilung direkt bestimmt. Um die Alkaloide, deren R_F -Werte bekannt sind¹⁰⁾ sichtbar zu machen, besprühten wir die Chromatogramme anschließend mit Dragendorffs Reagenz und verglichen sie mit den Autoradiogrammen. Die Schwärzungen auf dem Film stimmten in ihrer Lage mit den Alkaloidflecken auf dem zugehörigen Chromatogramm überein. Das radioaktiv markierte Cholesterin war also tatsächlich in die Alkaloide umgewandelt worden. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, daß auch im in-vitro-Versuch Samandaron (50%) und *O*-Acetyl-samandarin (30%), die in *Salamandra maculosa maculosa* die Hauptalkaloide darstellen, entsprechend der größeren Menge eine höhere Aktivität als die Nebenalkaloide zeigen.

Durch diese Ergebnisse ist nachgewiesen, daß Cholesterin die Vorstufe für alle in *Salamandra maculosa maculosa* vorkommenden Alkaloide ist. Dabei bleibt hinsichtlich des Abbaus der Seitenkette noch offen, ob die Nebenalkaloide mit Seitenkette Zwischenprodukte auf dem Weg zu den Hauptalkaloiden sind, oder ob sie auf einem Seitenweg gebildet werden.

Herrn Prof. Dr. K. H. Lieser, Lehrstuhl für Kernchemie, danken wir für die Aktivitätsmessungen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

5) K. Bloch, B. N. Berg und D. Rittenberg, J. biol. Chemistry **149**, 511 (1943).

6) K. Bloch, J. biol. Chemistry **157**, 661 (1945).

7) E. Staple, W. S. Lynn jr. und S. Gurin, J. biol. Chemistry **219**, 845 (1956).

8) M. D. Siperstein, A. W. Murray und E. Titus, Arch. Biochem. Biophysics **67**, 154 (1957).

9) G. Habermehl, Liebigs Ann. Chem. **680**, 104 (1964).

10) G. Habermehl, Liebigs Ann. Chem. **679**, 164 (1964).

Beschreibung der Versuche

2.5 g frisches, durch Absaugen von 30 mit gasf. CO₂ narkotisierten Tieren gewonnenes *Drüsensekret* wurde zusammen mit 35 mg (0.24 mMol) *Glutamin*, 51 mg (0.25 mMol) *MgCl₂*, 302 mg (0.46 mMol) *ATP*, 20 mg (0.023 mMol) *TPNH* und 1.99 mg (0.005 mMol) [*4-¹⁴C*]-*Cholesterin* (Aktivität: 100 μ C) in 100 ccm Phosphatpuffer vom pH 7.4 (bereitet aus 80.8 ccm *m/15 Na₂HPO₄* + 19.2 ccm *m/15 KH₂PO₄*) drei Tage bei Raumtemp. geschüttelt¹¹). Danach alkalisierte man die Reaktionslösung mit 4 *n* NaOH und extrahierte die Alkaloide sowie die Neutralkörper mit Methylenchlorid. Aus diesem Extrakt wurden die Alkaloide (280 mg) durch Ausschütteln mit 2 *n* Essigsäure, erneutes Alkalisieren und Extraktion mit Methylenchlorid gewonnen. Die Gesamtaktivität der Alkaloidfraktion betrug 2.7 μ C. Getrennt wurden die Alkaloide auf den Papierchromatogrammen (SiO₂-Papier Schleicher & Schüll, Nr. 289) mit Cyclohexan/Diäthylamin (9 : 1) als Lösungsmittel. Die an sich für dieses System bekannten *R_F*-Werte wurden zusätzlich noch dadurch kontrolliert, daß auf den Chromatogrammen neben dem zu untersuchenden Basengemisch Samandaron als Bezugssubstanz mitlief.

Von den Papierchromatogrammen wurden auf Röntgenfilm (Kodak; Belichtungszeit 4 Tage) Autoradiogramme angefertigt. Die Aktivitätsverteilung auf den Papierchromatogrammen wurde zusätzlich mit einem Methan-Durchflußzähler gemessen.

Beide Bestimmungen ergaben, daß die Aktivität der einzelnen Alkaloidzonen auf den Chromatogrammen proportional den Mengen der im Gemisch enthaltenen Alkaloide war.

¹¹ Das früher beschriebene Erstarren des Drüsensekrets (*C. Schöpf* und *W. Braun*, *Liebigs Ann. Chem.* **514**, 73 (1934)) tritt in der Pufferlösung nicht ein.