

Mit Hilfe einer in vorangehenden Arbeiten entwickelten und auf Wägung beruhenden Rechenvorrichtung werden die Intensitäten (f-Werte) der Absorptionsbanden der betrachteten Farbstoffe ermittelt, und es wird eine gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment festgestellt. Ebenso wird die auf Grund der verwendeten Modellvorstellungen sich ergebende Dichte der  $\pi$ -Elektronen an den einzelnen Atomen und Bindungen angegeben.

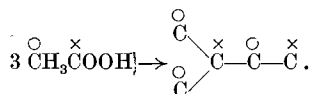
Physikalisch-Chemische Anstalt der Universität Basel und  
Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Marburg (Lahn).

## 199. Über die Herkunft des Kohlenstoff-Atoms 7 in Cholesterin. Ein Beitrag zur Kenntnis der Biosynthese der Steroide

von **K. Bloch.**

(27. VIII. 53.)

Für die von uns nachgewiesene biologische Umwandlung des Squalens in Cholesterin<sup>1)</sup> haben wir kürzlich das in A wiedergegebene Schema zum Vorschlag gebracht<sup>2)</sup>, zu dem vor allem die Sicherstellung der Konstitutionsformel des Lanosterins<sup>3)</sup> den Anlass gab. Bezüglich der Biosynthese des Squalens<sup>4)</sup> wurde dabei angenommen, dass die einzelnen Isoprenreste dieses Kohlenwasserstoffs aus je drei Molekeln Essigsäure wie folgt gebildet werden:



Die Frage, ob die Überführung des Squalens nach dem Schema A oder, wie schon vor vielen Jahren von *R. Robinson* intuitiv vorgeschlagen<sup>5)</sup>, nach C erfolgt, lässt sich auf Grund der Isotopenanalyse in biosynthetischem Cholesterin entscheiden. Wie ersichtlich, führen A und C zu einer Anordnung von Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoffatomen der Essigsäure im Steroid-Gerüst, welche nur für die Kohlenstoffatome 7, 8, 12 und 13 verschieden ist. Sowohl unsere früheren Ergebnisse über die Herkunft der Isooctyl-Seitenkette<sup>6)</sup> und der an-

<sup>1)</sup> *R. G. Langdon & K. Bloch*, Am. Soc. **74**, 1869 (1952).

<sup>2)</sup> *R. B. Woodward & K. Bloch*, Am. Soc. **75**, 2023 (1953).

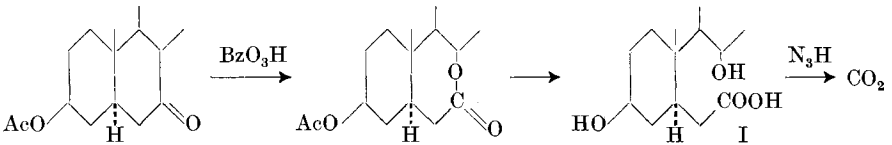
<sup>3)</sup> *W. Voser, M. V. Mijovic, H. Heusser, O. Jeger & L. Ruzicka*, Helv. **35**, 2414 (1952).

<sup>4)</sup> *R. G. Langdon & K. Bloch*, J. Biol. Chem. **200**, 129 (1953).

<sup>5)</sup> *R. Robinson*, Chem. & Ind. **1934**, 1062.

<sup>6)</sup> *J. Würsch, R. L. Huang & K. Bloch*, J. Biol. Chem. **195**, 439 (1952).

gulären Methyl-Gruppen<sup>1)</sup>, wie auch die kürzlichen Resultate von *Cornforth, Hunter & Popjak*<sup>2)</sup> über die Abstammung der C-Atome im Ring A und von C-Atom 6, erlaubten keine Entscheidung zwischen den Schemata A und C. Es konnte nun kürzlich gezeigt werden<sup>3)</sup>, dass C-Atom 13 des Cholesterins von einer Methylgruppe der Essigsäure stammt, ein Befund, der sich nur mehr mit dem Schema A vereinbaren lässt. Zur weiteren experimentellen Stützung haben wir nun die Herkunft von C-Atom 7, eines zweiten der eben erwähnten 4 kritischen C-Atome, bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde Cholesterin über 7-Ketocholestan-3 $\beta$ -ol in 3 $\beta$ ,8-Dioxy-7,8-*seco*-cholestansäure-(7) (I) nach den Angaben von *Heusser, Segre & Plattner*<sup>4)</sup> umgewandelt.



Diese Säure lässt sich unter den Bedingungen des *Schmidt's*chen Abbaus mit Stickstoffwasserstoffsäure decarboxylieren. Da die Konstitution von I sichergestellt ist, muss das gebildete Kohlendioxyd vom C-Atom 7 des Cholesterins stammen. Wurde biosynthetisches Cholesterin, das aus Carboxyl-signiertem Acetat stammte, dem obigen Abbau unterworfen, so erhielt man bei der Decarboxylierung nur normales  $CO_2$ . War hingegen Cholesterin, welches mit Hilfe von Methyl-signierter Essigsäure hergestellt war, das Ausgangsmaterial, so entstand  $CO_2$ , welches 75–80% der erwarteten Menge von  $^{14}C$  enthielt. Daraus geht eindeutig hervor, dass in der Biosynthese des Cholesterins das C-Atom 7, in Übereinstimmung mit Schema A, von einem Methyl-C-Atom der Essigsäure stammt.

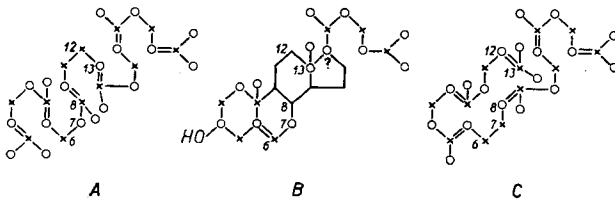


Fig. 1.

A: Zyklisierung des Squalens nach *Woodward & Bloch*.

C: Zyklisierung des Squalens nach *Robinson*.

B: Experimentell bestimmte Anordnung der Methyl-( $\circ$ ) und Carboxyl-( $\triangle$ )-C-Atome der Essigsäure im Cholesterin.

<sup>1)</sup> *H. N. Little & K. Bloch, J. Biol. Chem.* **183**, 33 (1950).

<sup>2)</sup> *J. W. Cornforth, G. D. Hunter & G. Popjak, Biochem. J.* **54**, 597 (1953).

<sup>3)</sup> *R. B. Woodward & K. Bloch, Am. Soc.* **75**, 2023 (1953).

<sup>4)</sup> *H. Heusser, A. Segre & Pl. A. Plattner, Helv.* **31**, 1183 (1948).

Da das Squalen zentrosymmetrisch ist<sup>1)</sup>, müssen seine beiden mittelständigen C-Atome, falls unsere Vorstellungen über die Biosynthese richtig sind, von Carboxyl-C-Atomen der Essigsäure stammen. Nach dem Schema C würde das Symmetriezentrum des Squalens zwischen die C-Atome 6 und 7 des Steroidgerüsts zu liegen kommen. Diese beiden C-Atome des Cholesterins müssten in diesem Falle gleicher Herkunft sein. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass C-Atom 7 nicht denselben Ursprung hat wie C-Atom 6, für welches *Cornforth* und Mitarbeiter<sup>2)</sup> die Abstammung aus einer Carboxyl-Gruppe der Essigsäure bewiesen haben. Unsere Befunde stehen demnach im Gegensatz zu Schema C, sind dagegen im Einklang mit dem von uns vorgeschlagenen Schema A.

Der *John Simon Guggenheim Memorial Foundation*, der *Swiss-American Foundation* und der *Rockefeller Foundation* sei für die Gewährung von Stipendien gedankt, die mir die Durchführung dieser Arbeit gestattet haben.

### Experimenteller Teil.

Radioaktives Cholesterin wurde, wie früher beschrieben<sup>3)</sup>, durch Inkubation von Ratten-Leberschnitten in Gegenwart von  $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$  bezw.  $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$  bereitet. Die spezifischen Aktivitäten der Präparate (gezählt unter standardisierten Bedingungen als Bariumcarbonat) sind in Tabelle I wiedergegeben.

Oxydation des Cholesterin-acetats zu 7-Keto-cholesterin-acetat mit tert. Butylchromat erfolgte nach der Vorschrift von *Heusler & Wettstein*<sup>4)</sup>. Die Ausbeute betrug 60% d. Th. Hydrierung zum Acetat des 7-Keto-cholestanols-(3 $\beta$ ), Oxydation mit Benzopersäure zum Ring-B-Lacton und Verseifung des Lactons zur 3 $\beta$ , 8-Dioxy-7,8-*seco*-cholestansäure-(7) wurde nach den Angaben von *Heusser, Segre & Plattner*<sup>5)</sup> ausgeführt. Die Ausbeute an I, ausgehend vom Acetat des 7-Keto-Cholestanols-(3 $\beta$ ), betrug 60–65% d. Th. Die verschiedenen Präparate wurden bis zum konstanten Smp. (162°, korr.) umkristallisiert. Mischproben mit authentischem Material zeigten keine Depression. Auf Elementaranalysen der Präparate I wurde verzichtet, da beim Trocknen im Hochvakuum Lactonisierung eintrat.

*Schmidt'scher* Abbau der 3 $\beta$ , 8-Dioxy-7,8-*seco*-cholestansäure-(7). In einem Dreihalskolben, welcher mit Einlassrohr für Stickstoff und Rückflusskühler versehen war, wurden 120 mg von I in 1 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure gelöst und mit 10 cm<sup>3</sup> Chloroform überschichtet. Der Kolben wurde auf dem Wasserbad auf 45° erwärmt und 30 mg Natriumazid zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Das sich entwickelnde Kohlendioxyd wurde mit Hilfe des Stickstoffstroms durch den Rückflusskühler in halbesättigte Baryt-Lösung geleitet. Die Reaktion war nach etwa 30 Min. beendet. In Vorversuchen wurde bemerkt, dass etwa das erste Fünftel des gebildeten Bariumcarbonats einen viel niedrigeren <sup>14</sup>C-Gehalt aufwies als der Rest. Das Kohlendioxyd wurde daher in 3 Fraktionen aufgefangen, von denen die 2 letzten einen konstanten <sup>14</sup>C-Gehalt aufwiesen. Die erste Fraktion, die möglicherweise z. T. aus einer Verunreinigung des Natriumazids mit Carbonat stammt, wurde verworfen. Die Aufarbeitung des gefällten Bariumcarbonats erfolgte wie üblich durch Waschen mit destilliertem Wasser und Methanol und Auszentrifugieren des Niederschlags auf Aluminiumplättchen. Zur <sup>14</sup>C-Analyse der Cholesterin-Präparate

1) *P. Karrer & A. Helfenstein*, *Helv.* **14**, 78 (1931).

2) *J. W. Cornforth, G. D. Hunter & G. Popjak*, *Biochem. J.* **54**, 597 (1953).

3) *H. N. Little & K. Bloch*, *J. Biol. Chem.* **183**, 33 (1950).

4) *K. Heusler & A. Wettstein*, *Helv.* **35**, 284 (1952).

5) *H. Heusser, A. Segre & Pl. A. Plattner*, *Helv.* **31**, 1183 (1948).

wurde nach *Van Slyke & Folch*<sup>1)</sup> nass verbrannt und das gebildete Kohlendioxyd ebenfalls als Bariumcarbonat gefällt. Aktivitätsbestimmungen wurden mit Hilfe eines Gasstromzählers (Tracerlab) ausgeführt. Die Fehlergrenze der in Tabelle I angegebenen Werte liegt bei  $\pm 5\%$ .

**Tabelle I.**

<sup>14</sup>C-Gehalt (spezifische Aktivität) von C-Atom 7 in biosynthetischem Cholesterin.

Radioaktive Vorstufe	CH <sub>3</sub> <sup>14</sup> COOH		<sup>14</sup> CH <sub>3</sub> COOH	
	gef.	Theorie <sup>2)</sup>	gef.	Theorie <sup>2)</sup>
Cholesterin . . . . .	37,0	—	32,5	—
C-Atom 7 . . . . .	a) 1,5; b) < 1	0	a) 43,0; b) 46,0	58,5

## SUMMARY.

Carbon atom 7 in biosynthetic cholesterol is shown to be derived from a methyl carbon of acetic acid. This result is discussed in relation to current hypotheses regarding the biological conversion of squalene to cholesterol.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 200. Synthèses d'esters phosphoriques d'intérêt biologique III<sup>3)</sup>.

### Synthèse des acides $\alpha$ -D-mannose-1-phosphorique, D-mannose-6-phosphorique et $\alpha$ -D-mannose-1,6-diphosphorique. Action de la phosphoglucomutase

par Th. Posternak et J. P. Rosselet.

(27 VIII 53)

Certains acides  $\alpha$ -aldose-1-phosphoriques présentent, comme on sait, un intérêt biochimique considérable.

C'est par l'intermédiaire de l'acide  $\alpha$ -glucose-1-phosphorique que s'effectuent la dégradation et la synthèse enzymatiques de l'amidon et du glycogène. L'acide  $\alpha$ -galactose-1-phosphorique intervient dans la transformation biologique réversible du galactose en glucose. L'acide  $\alpha$ -glucose-1,6-diphosphorique agit comme coferment de la phosphoglucomutase.

La synthèse d'acides  $\alpha$ -aldose-1-phosphoriques peut s'effectuer par deux méthodes.

<sup>1)</sup> *D. D. Van Slyke & J. Folch*, J. Biol. Chem. **136**, 509 (1940).

<sup>2)</sup> Berechnet auf Grund der Annahme, dass von den 27 C-Atomen des Cholesterins 15 von Methyl- und 12 von Carboxyl-C-Atomen der Essigsäure stammen (*H. N. Little & K. Bloch*, J. Biol. Chem. **183**, 33 (1950)).

<sup>3)</sup> Communication I: *Th. Posternak*, J. Biol. Chem. **180**, 1269 (1949); communication II: *Th. Posternak*, Am. Soc. **72**, 4824 (1950).