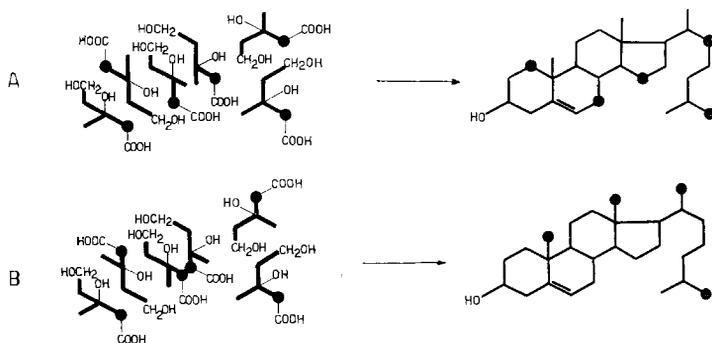


## 243. Zur Biosynthese des Cholesterins aus $\beta, \delta$ -Dihydroxy- $\beta$ -methyl-valeriansäure<sup>1)</sup>

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

(14. X. 57.)

$\beta, \delta$ -Dihydroxy- $\beta$ -methyl-valeriansäure (II) bzw. das  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton (I) ist, wie amerikanische Arbeiten<sup>2)</sup> gezeigt haben, mit dem „Isoprenbaustein“ identisch oder sehr nahe verwandt, da das richtige optische Isomere<sup>3)</sup> bei der Biosynthese rasch und praktisch vollständig in Cholesterin umgewandelt wird. Rein schematisch können 6 dieser Isoprenbausteine auf 2 Arten zu einem squalenähnlichen Zwischenprodukt und nachfolgend zu Cholesterin verknüpft werden:



• mit <sup>14</sup>C markierte Atome.

Abgesehen von der symmetrischen Verknüpfung der Isoprenbausteine in der Mitte der Squalenmolekel bzw. zwischen den Kohlenstoffatomen 11 und 12 des Cholesterins verbindet sich nach Schema A die Hydroxymethylgruppe der einen Molekel mit der zur Carboxylgruppe  $\alpha$ -ständigen Methylengruppe der nächsten Molekel. Nach Schema B reagiert die Hydroxymethylgruppe des ersten Bausteins mit der Methylgruppe des zweiten. In beiden Fällen entsteht formal nach Cyclisierung, Decarboxylierung, Wanderung von Methylgruppen und Entfernung von Hydroxylgruppen Cholesterin. Durch Verwendung des mit <sup>14</sup>C in 2-Stellung markierten „Isoprenbausteins“  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton-[2-<sup>14</sup>C] bzw. der freien Säure lässt sich nach

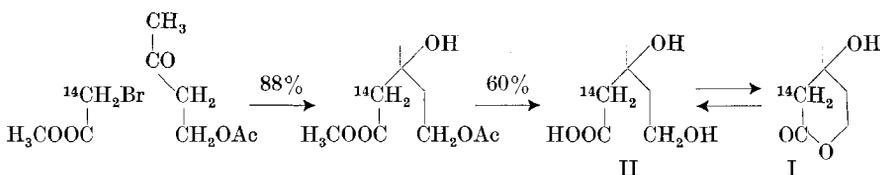
1) Vorläufige Mitteilung: O. Isler, R. Rüegg, J. Würsch, K. F. Gey & A. Pletscher, *Chimia* **11**, 167 (1957).

2) P. A. Tavormina, M. H. Gibbs & J. W. Huff, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4498 (1956); P. A. Tavormina, M. H. Gibbs, *ibid.* **78**, 6210 (1956).

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

Abbau des daraus biosynthetisch hergestellten Cholesterins und Prüfung der einzeln abgebauten C-Atome auf den Gehalt an Radioaktivität die Entscheidung darüber treffen, nach welchem der beiden Schemata der Aufbau erfolgt, weil je nach Reaktionsweg verschiedene C-Atome im Endprodukt Cholesterin markiert sein müssen.

$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton-[2- $^{14}\text{C}$ ] haben wir auf einem kürzlich auch von *Folkers et al.*<sup>4)</sup> beschriebenen Weg bereit. *Reformatsky*-Reaktion von Bromessigsäuremethylester-[2- $^{14}\text{C}$ ] mit 4-Acetoxybutanon-(2) lieferte den Methyl ester der *dl*- $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -acetoxy-valeriansäure-[2- $^{14}\text{C}$ ], der durch alkalische Verseifung in über 50% Ausbeute die gewünschte Säure II ergab. Bei der Destillation im Hochvakuum bildet sich das entsprechende Lacton I, das in wässrigem Milieu zum Teil wieder zur Säure hydrolysiert wird.



Aus dem markierten  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton (I) haben wir mittels Rattenleberhomogenat radioaktives Cholesterin gewonnen<sup>5)</sup>. Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung in der Seitenkette ist das Cholesterin nach *K. Bloch* und Mitarb.<sup>6)</sup> schrittweise über die 3 $\beta$ -Hydroxy-allocholansäure, die entsprechenden Nor- und Bisanthensäuren zu 3 $\beta$ -Hydroxy-allopregnanon-(20) und dieses zu Androstandioldi-(3 $\beta$ ,17 $\beta$ ) abgebaut worden. Dabei wurden die Kohlenstoffatome 25, 26 und 27 als Aceton, 22, 23 und 24 als Benzophenon und 20 und 21 als Essigsäure gefasst. Bei der Umwandlung von 3 $\beta$ -Hydroxy-allopregnanon-(20) in Androstandioldi-(3 $\beta$ ,17 $\beta$ ) konnte durch Verwendung von Trifluorperessigsäure nach *W. D. Emmons & G. B. Lucas*<sup>7)</sup> an Stelle von Perbenzoesäure eine wesentliche Verkürzung der Reaktionszeit und Verbesserung der Ausbeute an Essigsäure erzielt werden.

Das Kohlenstoffatom 7 haben wir durch einen ebenfalls schon von *K. Bloch*<sup>8)</sup> benutzten Abbau isoliert, indem das Cholesterin über 7-Ketocholesterylacetat und 7-Ketocholestanylacetat in die 3 $\beta$ ,8-Dihydroxy-7,8-seco-cholestansäure-(7) (III) umgewandelt wurde. Beim *Schmidt*'schen Abbau dieser Dihydroxysäure konnten wir das Kohlenstoffatom 7 nur in 16% Ausbeute als Kohlendioxyd erhalten. Wir haben daher durch Oxydation des Methyl esters der Dihydroxysäure

<sup>4)</sup> *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2316 (1957).

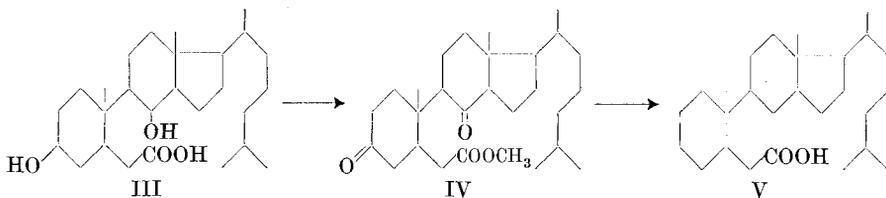
<sup>5)</sup> *N. L. R. Bucher & K. McGarrahan*, *J. biol. Chemistry* **222**, 1 (1956); *K. F. Gey*, *A. Pletscher*, *O. Isler*, *R. Rüegg & J. Würsch*, vorangehende Mitteilung.

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

<sup>7)</sup> *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 2287 (1955).

<sup>8)</sup> *Helv.* **36**, 1613 (1953).

zu Diketoester IV und *Wolff-Kishner*-Reduktion die beiden Hydroxylgruppen entfernt. Die so erhaltene 7,8-*seco*-Cholestansäure-(7) (V) ergab nun beim *Schmidt*'schen Abbau in guter Ausbeute das Kohlenstoffatom 7 in Form von Kohlendioxyd.



Die Radioaktivitätsbestimmungen zeigen, dass die Kohlenstoffatome 7, 22 und 26 bzw. 27 aktiv, die Kohlenstoffatome 20, 21, 23, 24, 25 und 26 bzw. 27 inaktiv sind.

Tabelle der Messergebnisse<sup>9)</sup>.

	Ber. ipm	Gef. ipm	
Cholesterin	—	100	<p>Leberhomogenat</p>
C <sub>7</sub>	540	491	
C <sub>20 + 21</sub>	0	0	
C <sub>22</sub>	540	520	
C <sub>23</sub>	0	0	
C <sub>24</sub>	0	0	
C <sub>25 + 26 + 27</sub>	180	215	
C <sub>26</sub> bzw. C <sub>27</sub>	270	340	
C <sub>25</sub>	0	0	
Allopregnanol-(3 $\beta$ )-on-(20)	77	78	
Androstandiol-(3 $\beta$ ,17 $\beta$ )	85	92	

Diese Verteilung markierter und nichtmarkierter C-Atome in den untersuchten Teilen der Cholesterinmolekel lässt eindeutig darauf schliessen, dass die Biosynthese aus  $\beta$ ,  $\delta$ -Dihydroxy- $\beta$ -methyl-valeriansäure, wie zu erwarten war, nach Schema A verläuft. In Übereinstimmung damit sind die Befunde von *Cornforth*<sup>10)</sup> und *Dituri*<sup>11)</sup> an Squalen: auf analoge Weise biosynthetisch hergestelltes Squalen weist nämlich den grössten Anteil an Radioaktivität in den endständigen Methylgruppen und in 4 Kohlenstoffatomen der Kette auf.

<sup>9)</sup> Die Messpräparate („infinite thickness“) wurden im *Tracerlab* Windowless Flow Counter oder unter einem dünnfenstrigen *Geiger*-Rohr auf einen statistischen Fehler von etwa 5% ausgezählt und die Impulszahlen wenn notwendig auf „infinite thickness“ korrigiert. Die theoretischen Werte für die einzelnen C-Atome und die beiden letzten Verbindungen der Tabelle sind auf Grund der Annahme berechnet, dass von den 27 C-Atomen des Cholesterins 5 C-Atome gleich stark markiert sind.

<sup>10)</sup> *J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, G. Popjak & Youhotsky-Gore*, *Biochem. J.* **66**, 10 P (1957).

<sup>11)</sup> *F. Dituri, S. Gurin & J. L. Rabinowitz*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2650 (1957).

### Experimenteller Teil.

A) *Herstellung von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton-[2- $^{14}$ C]<sup>4)</sup>*. 98 mg Bromessigsäure-[2- $^{14}$ C] (3,07 mc) wurden mit 319 mg inaktiver Bromessigsäure auf insgesamt 417 mg (3 mMol) verdünnt, in 15 ml abs. Äther gelöst, mit frisch destilliertem Diazomethan verestert und der Äther anschliessend über eine 15 cm lange, mit Glasringen gefüllte isolierte Kolonne abdestilliert. Der jeweilige Rückstand wurde viermal mit je 6 ml abs. Äther versetzt und der Äther wieder über die Kolonne abdestilliert. Zum Rückstand (etwa 2 ml) gab man 455 mg 4-Acetoxybutanon-(2) (3,5 mMol), 216 mg zerriebenes Zink (3,3 mMol) und eine Spur Sublimat, worauf die *Reformatsky*-Reaktion sofort einsetzte. Unter leichtem Erwärmen liess man 50 Min. reagieren, zersetzte die Reaktionsmischung mit Eis und 3 ml 3-n.  $H_2SO_4$  und extrahierte 90 Min. mit Äther im *Kutscher-Steudel*-Extrakter. Nach dem Abdampfen des Äthers blieben 573 mg eines Öls zurück, das mit 2 ml 3-n. NaOH und 2 ml Alkohol versetzt und durch 1stündiges Erhitzen zum Sieden unter Rückfluss verseift wurde. Das Verseifungsgemisch nahm man in 20 ml Wasser auf und extrahierte es zweimal mit Äther im Scheidetrichter. Es konnten dadurch 30 mg ätherlösliche Nebenprodukte abgetrennt werden. Zur wässrigen Schicht fügte man 3 ml 3-n. HCl und extrahierte 16 Std. mit Äther im *Kutscher-Steudel*-Apparat. Der Extrakt wog 294 mg und wurde mit Chloroform, in dem das Lacton gut löslich ist, in ein Kragenkölbchen gespült und nach Entfernen des Lösungsmittels fraktioniert. Es konnte ein Vorlauf von 18,6 mg (bei 86° Badtemperatur, 0,001 Torr) abgetrennt werden. Das Hauptprodukt ging bei 100° Badtemp. (0,001 Torr) über und wog 201 mg entspr. 51,5% d. Th. bez. auf Bromessigsäure; berechnete spez. Aktivität 7,85  $\mu$ c/mg.

B) *Biosynthese des Cholesterins*. Rattenleberhomogenate wurden etwas modifiziert nach *Bucher & McGarahan*<sup>5)</sup> hergestellt, 10 Min. bei 3000 g zentrifugiert, mit  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton-[2- $^{14}$ C] versetzt und 3 Std. unter Luft und Schütteln bei 37,5° inkubiert. Ein typischer Ansatz vom Totalvolumen 6 ml hatte folgende Konzentrationen (Mol/l):  $K_2HPO_4$  0,056;  $KH_2PO_4$  0,035; Nicotinamid 0,030;  $MgCl_2$  0,004; Glutathion 0,010; Diphosphopyridin-nucleotid 0,0005; Adenosinmonophosphat 0,0008, und  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton-[2- $^{14}$ C] 0,001 (1 mc); pH vor der Inkubation 6,9—7,0. Zur Beendigung der Inkubation säuerte man mit Schwefelsäure an und liess freigesetztes radioaktives  $CO_2$  in KOH absorbieren. Nach Zugabe von 4—25 mg inaktivem Cholesterin verseifte man unter Stickstoff in 55-proz. Methanol mit 8-proz. KOH etwa 15 Std. unter Rückfluss. Ansätze mit fünf- und zehnfachen Volumina waren noch verwendungsfähig. Nach Abdampfen des wässrigen Methanols konnte das Unverseifbare mit Petroläther extrahiert und daraus durch eine Digitoninfällung in 80-proz. Äthylalkohol das Cholesterin als Digitonid gewonnen werden.

C) *Abbau des biosynthetischen Cholesterins*. Die aus den einzelnen Ansätzen erhaltenen Digitonide wurden zusammengefasst und daraus durch die übliche Zersetzung in Pyridin/abs. Äther das freie Cholesterin gewonnen. Durch Acetylieren mit Acetanhydrid wurde es in Cholesterylacetat übergeführt, welches für die Abbaureaktionen im Falle des C-Atoms 7 mit inaktivem Cholesterylacetat, im Falle der Seitenkette nach Hydrierung zu Dihydro-cholesterylacetat mit inaktivem Material passend verdünnt wurde. Die Hydrierung zu Dihydro-cholesterylacetat (aktiv und inaktiv) erfolgte nach dem in „Organic Syntheses“<sup>12)</sup> beschriebenen Verfahren.

a) *Abbau des C-Atoms 7<sup>8)</sup>*. 600 mg 3 $\beta$ ,8-Dihydroxy-7,8-seco-cholestensäure-(7) wurden in ätherischer Lösung unter Zusatz von etwas Methanol mit Diazomethan verestert. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels zurückbleibende Ester wurde in 15 ml Eisessig gelöst und unter Kühlung mit einer Lösung von 210 mg  $CrO_3$  in 5 ml Eisessig und 1,5 ml  $H_2O$  versetzt; anschliessend liess man 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das Oxydationsprodukt wurde durch Ausschütteln mit Äther isoliert und in 20 ml Äthylenglycol mit 7,5 ml Hydrazinhydrat 1 Std. unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Dann steigerte man die Temperatur nach Entfernen des Kühlers und hielt sie während 2  $\frac{1}{2}$  Std.

<sup>12)</sup> Org. Synth., Coll. Vol. II, 191 (1943).

bei 190°. Zur Isolierung des Reaktionsproduktes verdünnte man mit Wasser und schüttelte mit Äther aus. Nach Ansäuern nahm man die Säure in Äther auf und erhielt nach Abdampfen des Äthers 289 mg nicht kristalliner 7,8-seco-Cholestansäure-(7) (V), welche ohne weitere Reinigung dem *Schmidt'schen* Abbau unterworfen wurde. Die Säure V wurde in 20 ml Chloroform (abs. phosgenfrei, frisch destilliert) gelöst und mit 90 mg Na-Azid (carbonatfrei) und 2 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Man erhielt nach 1 Std. Reaktionsdauer bei 45–50° 92 mg (65%) Bariumcarbonat, das vor der Aktivitätsbestimmung noch einmal umgefällt wurde.

b) *Abbau der Seitenkette*. Der schrittweise Abbau der Seitenkette erfolgte grossenteils nach dem von *J. Würsch, R. L. Huang & K. Bloch*<sup>6)</sup> für den Abbau von aus Acetat biosynthetisiertem, radioaktivem Cholesterin herangezogenen, auf früheren Arbeiten beruhenden Verfahren. Das bei dem beschriebenen Vorgehen jeweils erhaltene Benzophenon (enthaltend die C-Atome 22, 23 bzw. 24) wurde nach Überführung in das Benzophenonoxim direkt gezählt. Das bei der Oxydation des Dihydro-cholesterylacetats in Form des Mercuriacetonkomplexes gefasste Aceton mit den C-Atomen 25, 26 und 27 wurde einerseits gesamthaft in Bariumcarbonat, andererseits zuerst in Jodoform (C-Atom 26 bzw. 27) und dieses in BaCO<sub>3</sub> übergeführt. Aus den Messergebnissen für Gesamtaceton und C-Atom 26 bzw. 27 (aus Jodoform) kann der <sup>14</sup>C-Gehalt für das C-Atom 25 berechnet werden.

*Umlagerung von Allopregnanol-(3β)-on-(20)*<sup>7)</sup>. 225 mg Allopregnanol-(3β)-on-(20) wurden mit 5 ml 100-proz. Ameisensäure 4 ½ Std. unter Trockenverschluss auf 70° erwärmt. Der nach dem Abdampfen der überschüssigen Ameisensäure im Wasserstrahlvakuum bei 50° erhaltene kristallisierte Rückstand wurde in 3 ml Methylenchlorid gelöst und mit 0,8 g fein pulverisiertem sek. Na-Phosphat versetzt. Unter Kühlung mit Eiswasser und kräftigem Schütteln setzte man in 4 Portionen eine aus 60 µl 90-proz. Wasserstoffsperoxyd und 380 µl Trifluoressigsäureanhydrid in 0,5 ml Methylenchlorid bereitete eisgekühlte Lösung von Trifluorperessigsäure zu und erhitze anschliessend während 30 Min. zum Sieden unter Rückfluss. Das Reaktionsprodukt wurde durch Extraktion mit Äther isoliert (241 mg) und in 7,5 ml Methanol und 2 ml 3-n. NaOH während 1 Std. durch Erhitzen unter Rückfluss verseift. Nach Aufarbeitung erhielt man 196 mg Rohprodukt (Smp. 158–160° unkorrr.), das nach Umlösen aus Essigester-Petroläther 140 mg Androstandiol-(3β,17β) vom Smp. 160° unkorrr. gab.

Die methanolisch-alkalische Schicht aus der Aufarbeitung des Verseifungsgemisches wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit etwas KMnO<sub>4</sub>-Lösung zur Zerstörung der Ameisensäure versetzt und nach Ansäuern mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destilliert. Das mit NaOH neutralisierte Destillat wurde zur Trockne gebracht, der Rückstand in 2 ml Wasser aufgenommen und mit einem Überschuss an konz. AgNO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Das ausgefallene Silberacetat wurde aus Wasser umgelöst, getrocknet und direkt gezählt.

#### SUMMARY.

Labeled cholesterol was prepared by incubation of rat liver homogenate with β-hydroxy-β-methyl-δ-valerolactone-[2-<sup>14</sup>C]. The partial degradation of the biosynthetic cholesterol shows the presence of activity in the carbon atoms 7, 22 and either 26 or 27, and absence of activity in the carbon atoms 20, 21, 23, 24, 25 and either 26 or 27. From these results it can be concluded that the normal sequence of isoprene units (head to tail) is achieved by condensation of the hydroxymethyl group of one molecule of β,δ-dihydroxy-β-methylvaleric acid with the methylene group in α-position to the carboxyl group of the next molecule.

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