

## Zur Biogenese der Steroide

Von Doz. Dr. A. MONDON, Apotheker

Aus dem Chemischen Institut der Universität Kiel

Nach den bekannten theoretischen und experimentellen Arbeiten zur Biogenese der Steroide wird eine neue Anschauung entwickelt, die in dem Isosqualen die natürliche Vorstufe der pflanzlichen und tierischen Steroide sieht. Mit dieser Annahme ist es ohne Schwierigkeiten möglich, die Merkmale der Konstitution und Konfiguration und die mannigfaltigen Abwandlungen in der Erscheinungsform dieser Naturstoffe zu deuten.

Vor 50 Jahren hat *Adolf Windaus* die erste Mitteilung über das Cholesterin veröffentlicht<sup>1)</sup> und in der Folgezeit ein Arbeitsgebiet erschlossen, das bis heute nichts an Aktualität eingebüßt hat. Das Cholesterin gehört zu der großen Familie der Steroide, die im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet sind und deren Erforschung in den vergangenen Jahrzehnten in einer kaum überschaubaren Fülle von Veröffentlichungen niedergelegt ist.

Die analytische Bearbeitung des Gebietes ist seit Jahren im wesentlichen abgeschlossen, und man darf annehmen, daß auch im Hinblick auf das Vorkommen und die Verbreitung der Steroide keine prinzipiell neuen Ergebnisse mehr zu erwarten sind.

Die synthetischen Untersuchungen sind in den vergangenen 10 Jahren stark in den Vordergrund gerückt, und es sind nicht nur die mannigfaltigsten Partialsynthesen, sondern auch mehrere Totalsynthesen natürlicher Steroide geglückt. Die genialen Synthesen von *Woodward*<sup>2)</sup> und *Robinson*<sup>3)</sup>, über die schon ausführlich berichtet worden ist<sup>4)</sup>, werden durch die neue Totalsynthese von *Sarett*<sup>5)</sup> auf das beste ergänzt.

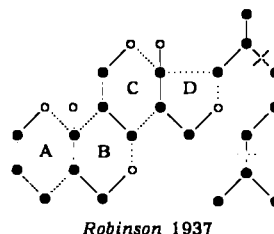
Auch auf biologischem Arbeitsgebiet wird eine intensive Forschung betrieben. Es werden vor allem Untersuchungen über die Entstehung und Umwandlung der Steroide im tierischen Organismus vorgenommen. Obwohl schon sehr wichtige Ergebnisse vorliegen, ist es bisher nicht gelungen, den wahren Ablauf der Steroidbiogenese zu ergründen.

Die reinen Hypothesen sind in dieser Hinsicht über recht vage Vorstellungen nicht hinausgekommen oder haben sich in gedanklichen Experimenten erschöpft.

Es soll hier versucht werden, einen Weg zur Biosynthese der Steroide zu entwickeln, der auf experimentellen Grundlagen aufbaut und darüber hinaus mit den biologischen Gegebenheiten in Einklang zu bringen ist.

### Alte und neue Hypothesen zur Biogenese der Steroide

Die Theorie von *Robinson*<sup>6)</sup> über die Biosynthese der Steroide aus dem Jahre 1937 geht von der Annahme aus, daß das Kohlenstoff-Gerüst aus Aceton- und Formaldehyd-Bausteinen oder deren biologischen Äquivalenten aufgebaut werde. Aus der Formulierung ist die Verteilung der Bausteine ohne weiteres abzulesen:



Robinson 1937

Durch Anlagerung von Formaldehyd an eine oder an beide Methylgruppen des Acetons entstehen Ketten von 4 oder 5 C-Atomen, aus denen durch Kondensation die Ringe A, B, C und ein Teil des Ringes D gebildet werden. Zur Ergänzung des Fünfrings und zum Aufbau der Seitenkette dient ein Bruchstück aus 3 Aceton-Bausteinen. *Robinson* hat schon darauf hingewiesen, daß die Bildung des Fünfrings nur durch eine zusätzliche Hypothese erklärt werden könne.

Aus dem Schema geht nicht hervor, warum die Kondensation der Ketten gerade in der angegebenen Weise erfolgen muß. Ein gerichteter Aufbau wäre nur denkbar, wenn von einem Fünfring-Keton aus die Angliederung der weiteren Ringe im Sinne des *Robinson-Ringschlusses* eintreten würde. Es ist aber unwahrscheinlich, daß dieses Prinzip, das sich für den künstlichen Aufbau der Steroide als außerordentlich fruchtbar erwiesen hat, den biologischen Reaktionsabläufen entspricht.

Im gleichen Jahre hat auch *Reichstein*<sup>7)</sup> auf Grund seiner Arbeiten über die Sauerstoff-reichen Steroide der Nebennierenrinde die Vermutung geäußert, daß die Biogenese über den Zuckerstoffwechsel unter Verwendung von C<sub>3</sub>-Bruchstücken wie Dioxyceton oder Glycerinaldehyd verlaufen könne.

<sup>1)</sup> A. Windaus, Ber. dtsch. chem. Ges. 36, 3752 [1903].

<sup>2)</sup> R. B. Woodward, F. Sondheimer, D. Taub, K. Heusler u. W. McLamore, J. Amer. Chem. Soc. 73, 2403 [1951]; 74, 4223 [1952].

<sup>3)</sup> H. M. E. Cardwell, J. W. Cornforth, S. R. Duff, H. Holtermann u. R. Robinson, Chem. & Ind. 1951, 389.

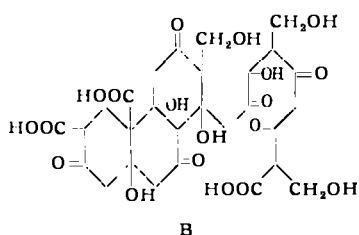
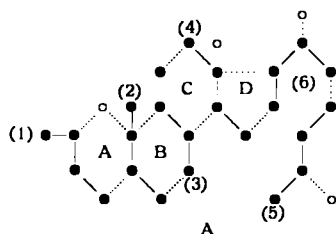
<sup>4)</sup> A. Mondon, diese Ztschr. 64, 121 [1952].

<sup>5)</sup> L. H. Sarett, G. E. Arth, R. M. Lukes, R. E. Beyler, G. I. Poos, W. F. Johns u. J. M. Constantin, J. Amer. Chem. Soc. 74, 4974 [1952].

<sup>6)</sup> E. C. duFeu, F. J. McQuillin u. R. Robinson, J. Chem. Soc. [London] 1937, 53.

<sup>7)</sup> T. Reichstein, Helv. Chim. Acta 20, 978 [1937].

1950 ist eine Arbeit von *Miescher*<sup>8)</sup> erschienen, in der neue Möglichkeiten der Biosynthese diskutiert werden. Das wesentliche Bauelement ist die Essigsäure, aus der durch Verdopplung Acetessigsäure als C<sub>4</sub>-Bruchstück gebildet wird. Diese Vorstellung ist begründet, da in biologischen Versuchen gezeigt werden konnte, daß zur Bildung des Cholesterins Acetat als Kohlenstoff-Quelle verwendet wird. Das Kohlenstoff-Gerüst würde sich schematisch aus 6 Viererketten aufbauen lassen, zu denen noch 4 C-Atome, aus Formaldehyd stammend, hinzutreten müßten. In der Formulierung (A) ist das Schema wiedergegeben, das von *Miescher* für seine weiteren Ableitungen benutzt wird. Die



Miescher 1950

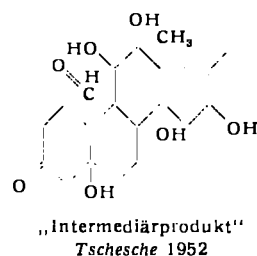
Acetessigsäure-Molekeln sind an den Carboxyl-Gruppen mit den Ziffern (1) bis (5) bezeichnet und die Formaldehyd-Molekeln sind durch Kreise hervorgehoben. Auch hier ist eine besondere Hypothese für die Bildung des Fünfrings notwendig, daher muß im Baustein (6) eine Molekel Oxal-essigsäure eingreifen. Aus diesen Molekeln soll unter Wasserabspaltungen und Aldolisierungen ein Zwischenprodukt der Formulierung (B) entstehen, aus dem durch weitere Hydrierungs- und Dehydratisierungsprozesse die natürlichen Steroide hervorgehen.

Auch das Schema von *Miescher* bringt nicht überzeugend zum Ausdruck, warum die Bausteine gerade in der angegebenen Weise reagieren sollen. Das Zwischenprodukt (B) ist mit Sauerstoffhaltigen Gruppen überladen und zweifellos eine äußerst reaktionsfähige Molekel, von der man erwarten muß, daß sie weitere Kondensationsreaktionen eingeht oder mannigfaltigen intramolekularen Umwandlungen ausgesetzt ist.

*Miescher* hat in Modellversuchen gezeigt, daß mono- und bicyclische Ringsysteme aus den entsprechenden Komponenten unter sehr milden Bedingungen gebildet werden. Die Übertragung der Versuchsergebnisse auf die Ringbildung der Steroide erscheint aber sehr gewagt, da schon zur Erklärung der äußeren Merkmale viele unkontrollierbare Annahmen notwendig sind, während die inneren Zusammenhänge, die ihren Ausdruck in den stereochemischen Gesetzmäßigkeiten finden, völlig unberücksichtigt bleiben.

Vor kurzem hat *Tschesche*<sup>9, 10)</sup> eine Arbeit veröffentlicht, in der neue Gedanken zu einem biochemischen Syntheseweg der Steroide entwickelt werden. Aus Struktureigentümlichkeiten in der Gruppe der Herz- und Krötengifte wird ein Sauerstoff-reiches „Intermediärprodukt“ mit einer cis-Verknüpfung der Ringe A/B und C/D abgeleitet,

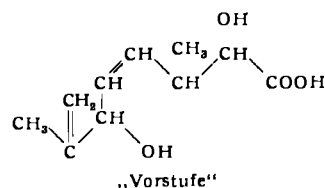
dessen Aufbau etwa der folgenden Formulierung entsprechen muß:



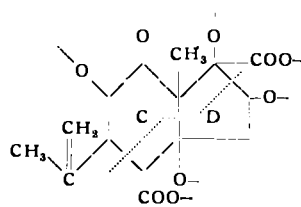
„Intermediärprodukt“  
Tschesche 1952

Aus einem derartigen Zwischenprodukt, dem eine Schlüsselstellung in dem gesamten Syntheseweg der Steroide, sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich zuerzählt wird, sollen durch strukturelle und sterische Umwandlungen des Ringsystems und durch nachträgliche Angliederung der verschiedenartig gebauten Seitenketten alle bekannten Steroide gebildet werden.

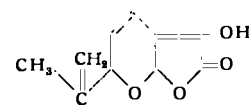
Der Aufbau des „Intermediärprodukts“ geht von einer „Vorstufe“ aus, die in naher Verwandtschaft zum Picrotoxinin von *Conroy*<sup>11)</sup> steht und große Ähnlichkeit mit dem Mesogentioenin von *Korte*<sup>12)</sup> zeigt. *Conroy* hat schon auf die Übereinstimmung des Picrotoxinins mit den Ringen C/D der Steroide hingewiesen und vermutete, daß in dem Bitterstoff ein Abbauprodukt des Steroid-Stoffwechsels vorliege. *Tschesche* glaubt dagegen, daß das Picrotoxinin von dem Syntheseweg der Steroide abgezweigt sei, und sieht in dem Mesogentioenin den unmittelbaren Beweis für die Existenz seiner „Vorstufe“. Er weist auch darauf hin, daß diese Vorstufe beim Abbau von Squalen gebildet werden könne, dessen Bedeutung für die Biosynthese der Steroide noch ausführlicher besprochen werden soll.



„Vorstufe“



Picrotoxinin



Mesogentioenin

Die Umwandlung der „Vorstufe“ bis zu dem „Intermediärprodukt“ ist in großen Linien aufgezeigt, doch ist der Weg in den einzelnen Reaktionsstufen noch so wenig entwickelt, daß von einer Formulierung abgesehen wird.

Die Hypothese von *Tschesche* ist für die Biogenese der Steroide im tierischen Organismus nicht sehr überzeugend. Wenn man bedenkt, daß im Cholesterin ein Primärprodukt der Synthese vorliegt, so erscheint ein so komplizierter Weg über Sauerstoff-reiche Intermediärstufen mit anderer Konfiguration sehr unwahrscheinlich. Auch sind aus tierischen Organen, insbesondere aus der Leber, niemals Verbindungen isoliert worden, aus denen Rückschlüsse auf einen derartigen Syntheseweg abgeleitet werden könnten.

## Ergebnisse der biologischen Forschung

Die biologische Forschung wurde durch die Entdeckung des schweren Wasserstoffs und der Isotopen des Kohlenstoffs um Arbeitsmethoden bereichert, mit deren Hilfe es erst möglich wurde, tiefere Einblicke in die Vorgänge des Stoffwechsels zu gewinnen.

<sup>8)</sup> K. Miescher u. P. Wieland, ebenda 33, 1847, 2215 [1950].

<sup>9)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, diese Ztschr. 64, 633 [1952].

<sup>10)</sup> R. Tschesche u. F. Korte, ebenda 65, 81 [1953].

<sup>11)</sup> H. Conroy, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3046 [1952].

<sup>12)</sup> F. Korte, diese Ztschr. 64, 624 [1952].

1937 führten *Sonderhoff* und *Thomas*<sup>13)</sup> einen Versuch durch, der für die weiteren Arbeiten zur Biosynthese der Steroide grundlegende Bedeutung erlangte. Sie ließen Hefe in Gegenwart von deuteriertem Natriumacetat wachsen und beobachteten in den gebildeten Steroiden einen hohen Gehalt an Deuterium. Da die gleichzeitig gebildeten Fette und Kohlenhydrate einen geringeren Gehalt an Deuterium aufwiesen, folgerten sie, daß Acetat zum Aufbau der Steroide verbraucht werden müsse. Später haben *Bloch* und *Rittenberg*<sup>14)</sup> diesen Versuch im Tierexperiment wiederholt und gefunden, daß das isolierte Cholesterin einen dreifach höheren Gehalt an Deuterium besaß als die Körperflüssigkeit. Da aus diesem Ergebnis aber nur der Schluß gezogen werden konnte, daß die Methyl-Gruppe des Acetats am Aufbau des Cholesterins beteiligt ist, wurden weitere Versuche mit einem deuterierten Natriumacetat vorgenommen, dessen Carboxyl-Gruppe mit C<sup>13</sup> markiert war<sup>15)</sup>. Das isolierte Cholesterin zeigte jetzt neben Deuterium auch isotopen Kohlenstoff an, damit war nachgewiesen, daß die gesamte Molekel des Acetats als Kohlenstoff-Quelle verwendet wird.

Sorgfältige Untersuchungen von *Little* und *Bloch*<sup>16)</sup> haben diese Befunde noch erweitert, und wir wissen heute, daß unter entsprechenden Bedingungen das gesamte Gerüst des Cholesterins aus Acetat-Kohlenstoff hervorgeht<sup>17)</sup>. Die gleichen Autoren haben darüber hinaus genaue Angaben machen können, in welcher Weise die Essigsäure in die Cholesterin-Molekel eingebaut wird. Durch Verwendung von 1-C<sup>14</sup>- und 2-C<sup>14</sup>-Acetat und einem Acetat, das gleichzeitig mit C<sup>13</sup> und C<sup>14</sup> markiert war, wurden radioaktive Cholesterin-Präparate gewonnen und analysiert. Die Ergebnisse zeigten, daß der Kohlenstoff aus der Methyl-Gruppe der Essigsäure in den C-Atomen 18; 19, 26, 27 und wahrscheinlich 17 des Cholesterins eingebaut wird, während die C-Atome 25 und sehr wahrscheinlich 10 aus der Carboxyl-Gruppe der Essigsäure stammen. Das Verhältnis von Methyl- zu Carboxyl-Kohlenstoff beträgt für die Gesamtmolekel des Cholesterins 1,27, der entsprechende Wert für das Ringsystem allein 1,1 und für die Seitenkette 1,67. *Brady* und *Gurin*<sup>18)</sup> bestimmten für das Verhältnis von Methyl- zu Carboxyl-Kohlenstoff in der Gesamtmolekel die Zahl 1,3. Nach der gleichen Methode ist es *Wüers*, *Huang* und *Bloch*<sup>19)</sup> vor kurzem gelungen, die Herkunft aller Kohlenstoff-Atome in der Seitenkette des Cholesterins aufzuklären; danach entstammen die C-Atome 21, 22, 24, 26 und 27 der Methyl-Gruppe, die C-Atome 20, 23 und 25 der Carboxyl-Gruppe der Essigsäure.

Äthylalkohol und Acetaldehyd können ebenso wie Essigsäure bei der Synthese des Cholesterins verwendet werden. Von den C<sub>3</sub>-Verbindungen ist besonders Aceton untersucht worden<sup>18, 20, 21)</sup>, das nicht unmittelbar eingebaut werden kann, sondern nur auf dem Weg über ein C<sub>2</sub>-Bruchstück, welches beim oxydativen Abbau neben CO<sub>2</sub> entsteht; die Aufnahme von CO<sub>2</sub> unter Bildung eines C<sub>4</sub>-Bausteins findet nur in ganz geringem Umfang statt<sup>22)</sup>. Auf dem gleichen Wege sind auch die Brenztraubensäure und einige nie-

dere Fettsäuren wirksam. Andere Verhältnisse wurden aber bei gewissen verzweigten Fettsäuren gefunden. So stellten *Zabin* und *Bloch*<sup>20, 23)</sup> beim Arbeiten mit markierter Isovaleriansäure fest, daß sie besonders leicht in die Molekel des Cholesterins eingebaut wird. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch *Kritchevsky* und *Gray*<sup>24)</sup> bei der Verwendung von Isobuttersäure. Der biologische Weg führt bei diesen Verbindungen nicht über Essigsäure sondern über ein C<sub>3</sub>-Bruchstück, das aus der Isopropyl-Gruppe stammt und das besonders zur Aufnahme von CO<sub>2</sub> befähigt ist<sup>25)</sup>. Dabei muß ein C<sub>4</sub>-Baustein entstehen, der sich durch seinen Aktivierungsgrad von Acetessigsäure unterscheidet und dadurch zur Herstellung neuer C-C-Verknüpfungen besonders geeignet ist. Markierte Acetessigsäure wird zwar in gewissem Umfang zur Bildung des Cholesterins verwendet<sup>26)</sup>, doch erfolgt nach *Brady* und *Gurin*<sup>18)</sup> der Einbau von Acetat wesentlich schneller, so daß der biologische Weg nicht ausschließlich über Acetessigsäure verlaufen kann.

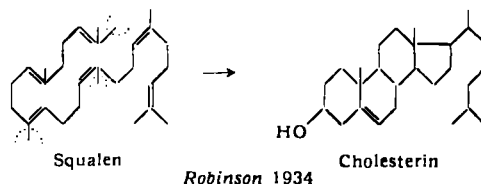
Nach neueren Untersuchungen von *Tatum*, *Zabin* und *Bloch*<sup>27)</sup> ist die Biosynthese des Ergosterins durch *Neurospora*-Mutanten an die gleichen Gesetzmäßigkeiten geknüpft, wie sie für den Aufbau des Cholesterins im tierischen Organismus bestimmend sind<sup>28)</sup>. *Hanahan* und *Wakil*<sup>29)</sup> haben jetzt auch für das C<sup>14</sup>-Ergosterin nachgewiesen, daß die C-Atome 23 und 25, ebenso wie die des Cholesterins, aus der Carboxyl-Gruppe der Essigsäure hervorgehen.

Der weiteren Erkenntnis sind im Augenblick offenbar Grenzen gesetzt, die erst überschritten werden können, wenn es gelingt, die Zwischenstufen der Biosynthese zu isolieren.

Aus einem bemerkenswerten Versuch, den *Channon*<sup>30)</sup> 1926 ausgeführt hat, können aber Folgerungen gezogen werden, die für die weitere Entwicklung bedeutsam sind. Auf Grund des gemeinsamen Vorkommens von Squalen und Cholesterin in Fischleberölen glaubte er, daß eine genetische Beziehung zwischen den beiden Stoffen bestehen müsse. Er verfütterte daher Squalen an Ratten und fand in der Leber der Versuchstiere die doppelte Menge an Cholesterin, wie sie normalerweise beobachtet wird.

*André* und *Canal*<sup>31)</sup> kamen zu dem Ergebnis, daß im Squalen eine biologische Vorstufe des Cholesterins vorliegen müsse, da sie im Leberöl eines jungen Hais neben wenig Cholesterin große Mengen Squalen fanden, während bei älteren Tieren dies Verhältnis gerade umgekehrt ist.

Die Versuche einer theoretischen Deutung dieser Beobachtungen sind wenig überzeugend. In der Formulierung, die *Robinson*<sup>32)</sup> 1934 vorgeschlagen hat, ist die Umwandlung des Squalens in Cholesterin nur unter der Voraussetzung einer ganzen Folge undurchsichtiger Reaktionen möglich.



<sup>13)</sup> R. Sonderhoff u. H. Thomas, Liebigs Ann. Chem. 530, 195 [1937].

<sup>14)</sup> D. Rittenberg u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 121, 235 [1937]; K. Bloch u. D. Rittenberg, ebenda 143, 297 u. 145, 625 [1942].

<sup>15)</sup> K. Bloch u. D. Rittenberg, ebenda 159, 45 u. 160, 417 [1945].

<sup>16)</sup> H. N. Little u. K. Bloch, ebenda 183, 33 [1950].

<sup>17)</sup> K. Bloch, E. Borek u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 162, 441 [1946]; P. Srere, I. L. Chaikoff u. W. G. Dauben, ebenda 176, 829 [1948]; A. Pihl, K. Bloch u. H. S. Anker, ebenda 183, 441 [1950]; R. O. Brady u. S. Gurin, ebenda 186, 461 [1950]; E. Schwenk, Vortrag 120. Kongreß Amer. Chem. Soc. 1951, New York, vgl. diese Ztschr. 64, 339 [1952].

<sup>18)</sup> R. O. Brady u. S. Gurin, J. biol. Chemistry 189, 371 [1951].

<sup>19)</sup> J. Wüers, R. L. Huang u. K. Bloch, ebenda 195, 439 [1952].

<sup>20)</sup> I. Zabin u. K. Bloch, ebenda 185, 131 [1950].

<sup>21)</sup> T. D. Price u. D. Rittenberg, ebenda 185, 449 [1950].

<sup>22)</sup> M. C. Coon, J. biol. Chemistry 187, 71 [1950].

<sup>23)</sup> I. Zabin u. K. Bloch, ebenda 192, 267 [1951].

<sup>24)</sup> D. Kritchevsky u. I. Gray, Experientia 7, 183 [1951].

<sup>25)</sup> G. W. E. Plaut u. H. A. Lardy, J. biol. Chemistry 192, 435 [1951].

<sup>26)</sup> G. L. Curran, ebenda 191, 775 [1951].

<sup>27)</sup> E. L. Tatum, I. Zabin u. K. Bloch, Federation Proc. 9, 212 [1950]; R. C. Otte, E. L. Tatum, I. Zabin u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 189, 429 [1951].

<sup>28)</sup> D. J. Hanahan u. S. J. Wakil, Arch. Biochem. Biophys. 37, 167 [1952].

<sup>29)</sup> D. J. Hanahan u. S. J. Wakil, J. Amer. Chem. Soc. 75, 273 [1953].

<sup>30)</sup> H. J. Channon, Biochem. J. 20, 400 [1926]; vgl. I. M. Heilbron, E. D. Kamm u. W. M. Owens, J. Chem. Soc. [London] 1926, 1630.

<sup>31)</sup> E. André u. H. Canal, Bull. Soc. Chim. France [4] 45, 498 [1928].

<sup>32)</sup> R. Robinson, J. Chem. Soc. Ind. 53, 1062 [1934].

Bryant<sup>33)</sup> hat der Theorie von Robinson eine neue Hypothese entgegengestellt, nach der das Carotin der Vorläufer des Cholesterins sein sollte. Diese Annahme, der zweifellos eine richtige Vorstellung zugrunde liegt, war aber unhaltbar, da der tierische Organismus nicht zum Aufbau von Carotinoiden befähigt ist. Sie geriet daher ebenso wie die älteren Arbeiten in Vergessenheit.

Erst in neuester Zeit haben Langdon und Bloch<sup>34)</sup> den Versuch von Channon<sup>30, 35)</sup> wieder aufgegriffen. Sie arbeiteten mit einem markierten Squalen, welches auf biologischem Wege aus radioaktivem Acetat gewonnen wurde, und beobachteten, daß es tatsächlich in Cholesterin umgewandelt wird. Die Wirksamkeit des Squalens bei der Cholesterin-Bildung ist gegenüber Acetat um das 10- bis 20fache gesteigert. Da in den anwesenden Fettsäuren nur äußerst geringe Mengen radioaktiven Kohlenstoffs festgestellt wurden, ist ein intermediärer Abbau des Squalens zu C<sub>2</sub>-Bruchstücken ausgeschlossen.

Nach dem Verfahren von Schmitt<sup>36)</sup> haben Dauben und Bradlow<sup>37)</sup> radioaktives Squalen aufgebaut, bei dem die C-Atome 10 und 15 mit <sup>14</sup>C markiert wurden. Überraschenderweise ist dieses synthetische Squalen im biologischen Versuch inaktiv und wird nicht in Cholesterin umgewandelt<sup>38)</sup>. Bei dem Vergleich der Ultrarot-Spektren des synthetischen und natürlichen Squalens ist zu erkennen, daß die beiden Stoffe nicht identisch sind. Das synthetische Squalen besteht aus zwei isomeren Kohlenwasserstoffen, die sich durch die Lage der Doppelbindungen unterscheiden. Das gleiche Gemisch entsteht auch aus dem natürlichen Squalen bei der Regeneration aus dem Hydrochlorid.

Wenn das Squalen durch einen Cyclisierungsvorgang im Sinne der Formulierung von Robinson umgewandelt würde, dann sollte im tierischen Organismus eine Verschiebung der Doppelbindungen unter Bildung der biologisch aktiven Form eintreten<sup>39)</sup>. Da das synthetische Squalen völlig inaktiv ist, muß eine andere Ursache vorhanden sein, durch die eine Umwandlung verhindert wird.

## Neue Vorstellungen zur Biogenese der Steroide

### Die Vorstufe des Cholesterins

Die Fähigkeit des Organismus, natürliches Squalen in Cholesterin umzuwandeln, zwingt zu der Annahme, daß die bisher unbekannten Zwischenstufen auf dem biologischen Weg zum Cholesterin aus Isopren-Einheiten aufgebaut sind. Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, daß nicht das symmetrische Squalen der Vorläufer des Cholesterins ist, sondern ein isomerer Kohlenwasserstoff, bei dem die anomale Verknüpfung in der Isopren-Kette um eine Einheit aus der Mitte der Molekel verschoben ist. Ich vermute, daß in diesem hypothetischen Kohlenwasserstoff, der Isosqualen benannt werden soll, die wahre

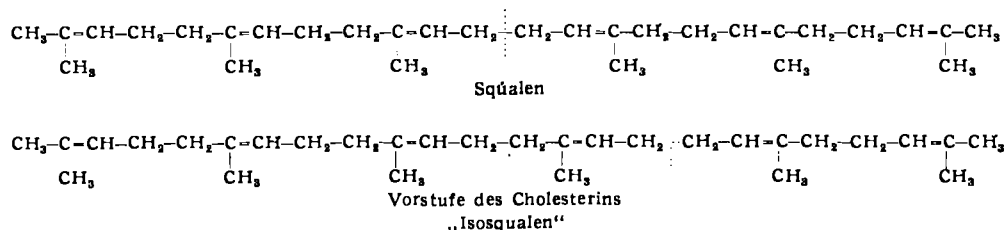
Vorstufe der normalen tierischen und pflanzlichen Steroide vorliegt. Die in neuester Zeit vor allem von Bloch und seinem Arbeitskreis<sup>10, 34)</sup> experimentell begründete Anschauung, daß die Steroide aus Isopren-artig gebauten Molekeln hervorgehen, findet in dieser Annahme eine glänzende Bestätigung, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, nicht nur die konstitutionellen, sondern auch die konfigurativen Merkmale der natürlichen Steroide in einfacher Weise abzuleiten.

Das Squalen besteht aus 6 Isopren-Bausteinen, die in der Weise zusammengefügt sind, daß in der Mitte der Kohlenstoff-Kette eine anomale Verknüpfung der Isopren-Reste vorliegt; dadurch entsteht eine Symmetrie, die der gesamten Molekel eine besondere Stabilität verleiht.

In der hypothetischen Vorstufe des Cholesterins ist die anomale Verknüpfung aus der Mitte der Kohlenstoff-Kette verschoben, dadurch wird die Stabilität der Molekel erheblich vermindert. Aus Untersuchungen von Channon<sup>40)</sup> geht hervor, daß in den Leberölen des Menschen und zahlreicher Haustiere ein stark ungesättigter Kohlenwasserstoff vorkommt, der dem Squalen sehr ähnlich ist. Wegen seiner großen Empfindlichkeit hat ihn Channon nicht rein erhalten können.

Die Umwandlung des Squalens in Cholesterin muß über Zwischenstufen geschehen, die auch im normalen Stoffwechsel beim Aufbau des Cholesterins durchlaufen werden. Sehr wahrscheinlich wird die C—C-Bindung in der Mitte der Molekel getrennt, da sie durch die beiden benachbarten Doppelbindungen am stärksten gelockert ist. So entstehen zwei gleiche Bruchstücke aus je drei Isopren-Einheiten, die für den Organismus ein günstiges Ausgangsmaterial zum Aufbau der Vorstufe sind. Wenn diese Annahme richtig ist, müßte eine Verbindung aus drei Isopren-Bausteinen, z. B. das Farnesol, im biologischen Versuch die gleiche Wirksamkeit zeigen wie Squalen. Es ist auffallend, daß Langdon und Bloch<sup>34)</sup> bei der Biosynthese des Cholesterins aus Squalen einen Wirkungsfaktor beobachtet haben, der nur dreimal größer ist als der von Isovalerat; bei einer direkten Umwandlung sollte ein höherer Wert gefunden werden.

Die Fähigkeit der Leber, <sup>14</sup>C-Acetat in Cholesterin umzuwandeln, ist nach Beobachtungen von Srere<sup>41)</sup> bei Tieren, die längere Zeit eine Squalen-Diät erhalten haben, herabgesetzt. Dieser Befund ist verständlich, wenn Bruchstücke der Squalen-Molekel bevorzugt zum Aufbau verwendet werden. Bei dem synthetischen <sup>14</sup>C-Squalen von Dauben und Bradlow<sup>36)</sup> ist die Spaltung der Kohlenstoff-Kette in der Mitte der Molekel durch Verschiebung von Doppelbindungen wahrscheinlich nicht mehr möglich, eine Umwandlung in Cholesterin daher ausgeschlossen.



<sup>33)</sup> W. M. D. Bryant, ebenda 54, 907, 1082 [1935].

<sup>34)</sup> R. G. Langdon u. K. Bloch, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1869 [1952]; R. G. Langdon, Federation Proc. 11, 245 [1952]; R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 129, 135 [1953].

<sup>35)</sup> H. J. Channon u. B. R. Tristram, Biochemic. J. 31, 738 [1937].

<sup>36)</sup> W. G. Dauben u. H. L. Bradlow, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5204 [1952].

<sup>37)</sup> J. Schmitt, Liebigs Ann. Chem. 547, 115 [1941].

<sup>38)</sup> G. M. Tomkins, I. L. Chaikoff, W. G. Dauben, H. L. Bradlow u. P. A. Srere, J. Amer. Chem. Soc. 74, 6145 [1952]; vergl. R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 135 [1953].

<sup>39)</sup> R. Hubbard u. G. Wald, Science [New York] 115, 60 [1952].

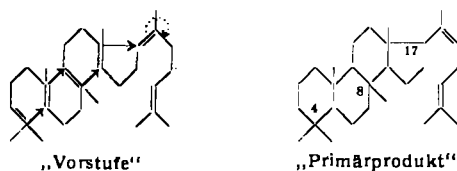
Der Aufbau des Isosqualens aus Acetat wird im Organismus in ähnlicher Weise ablaufen wie der des Squalens. Vielleicht hat dieses als stabilere Verbindung die Funktion eines Reservestoffes, während das Isosqualen als biologisch aktive Zwischenform sehr schnell verändert wird, so daß es schwer zu erfassen ist.

<sup>40)</sup> H. J. Channon u. G. F. Marrian, Biochemic. J. 20, 409 [1926].

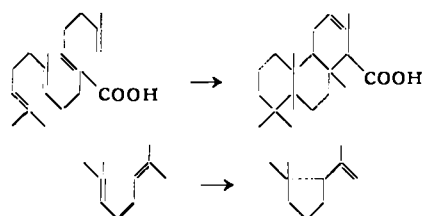
<sup>41)</sup> P. Srere, Dissertat. Univ. of California, 1951.

## Die Cyclisierung der „Vorstufe“

Das Ringsystem der Steroide entsteht aus der „Vorstufe“ durch Cyclisierung. Aus der nachstehenden Formulierung des Isoqualens läßt sich ohne weiteres ablesen, wie bei einer fortlaufenden Cyclisierung in Richtung der Pfeile ein tetracyclisches Ringsystem gebildet wird, das in seinem Aufbau mit den Ringen A, B, C und D der Steroide identisch ist. Die Ausbildung des Ringes D als Fünfring, die bei den früheren Hypothesen stets problematisch war, ergibt sich hier aus den Gesetzmäßigkeiten der Cyclisierung. Bei der Ringbildung bleibt die Seitenkette aus 8 C-Atomen zwangsläufig erhalten, da sie durch Cyclisierung nicht mehr verändert werden kann. Sie greift am C-Atom 17<sup>42)</sup> des Fünfringes ein und entspricht in ihrer Stellung und in ihrer Struktur der typischen Seitenkette vieler Steroide. Ein Unterschied besteht nur in den drei überzähligen Methyl-Gruppen, die an den C-Atomen 4 und 8 stehen. Die cyclisierte Vorstufe soll als „Primärprodukt“ bezeichnet werden.



Die Cyclisierung ist in ihrem Ablauf durch die Arbeiten von Schinz<sup>43)</sup>, Stoll<sup>44)</sup> und Naves<sup>45)</sup> einerseits und Stevens und Spalding<sup>46)</sup> andererseits auf das beste begründet. An einem Beispiel aus der Diterpen-Reihe haben Caliezi und Schinz<sup>47)</sup> vor kurzem gezeigt, daß man in einer Operation zu einer tricyclischen Verbindung gelangen kann, während Stevens und Spalding nachgewiesen haben, daß bei der Cyclisierung ein Fünfring entsteht, wenn zwei Isopren-Reste in der anomalen Verknüpfung vorliegen.



Man braucht die Ergebnisse dieser beiden Versuche nur zu kombinieren, um das Ringsystem des „Primärproduktes“ zu erhalten.

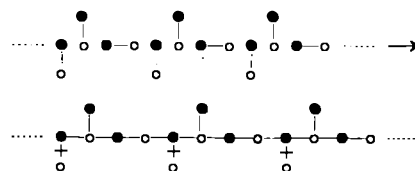
Natürlich lassen sich die äußeren Bedingungen der säurekatalysierten Cyclisierung nicht auf biologische Verhältnisse übertragen, da die Biosynthese in der Leber unter außerordentlich milden Bedingungen nahe  $p_H$  7 geschehen muß. Es erscheint aber berechtigt, ihren Mechanismus, wie ihn Bloomfield<sup>48)</sup>, Stevens und Spalding<sup>46)</sup> und vor allem Schinz<sup>49)</sup> aufgeklärt haben, auch auf biochemische Synthesen anzuwenden, da die Bildung zahlreicher Naturstoffe, die sich aus Isopren-Verbindungen ableiten lassen, auf diesem Wege vorzüglich erklärt werden kann. Wahrscheinlich werden Cyclisierungen im pflanzlichen und tierischen Organismus nicht nur durch Anlagerung von Protonen, sondern auch durch Anlagerung von Hydroxyl-Gruppen ausgelöst. Diese Annahme stützt sich auf Beobachtungen,

<sup>42)</sup> Bezifferung nach dem Ringsystem der Steroide.  
<sup>43)</sup> F. Zobrist u. H. Schinz, *Helv. Chim. Acta* 32, 1192 [1949] u. spät. Arb.  
<sup>44)</sup> M. Stoll u. A. Commarmond, ebenda 32, 1836 [1949].  
<sup>45)</sup> Y. R. Naves, ebenda 32, 1802 [1949].  
<sup>46)</sup> P. G. Stevens u. S. C. Spalding, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 1687 [1949].  
<sup>47)</sup> A. Caliezi u. H. Schinz, *Helv. Chim. Acta* 35, 1650 [1952].  
<sup>48)</sup> G. F. Bloomfield, *J. Chem. Soc. [London]* 1943, 289.  
<sup>49)</sup> A. Eschenmoser u. H. Schinz, *Helv. Chim. Acta* 33, 171 [1950].

die in anderem Zusammenhang noch näher betrachtet werden.

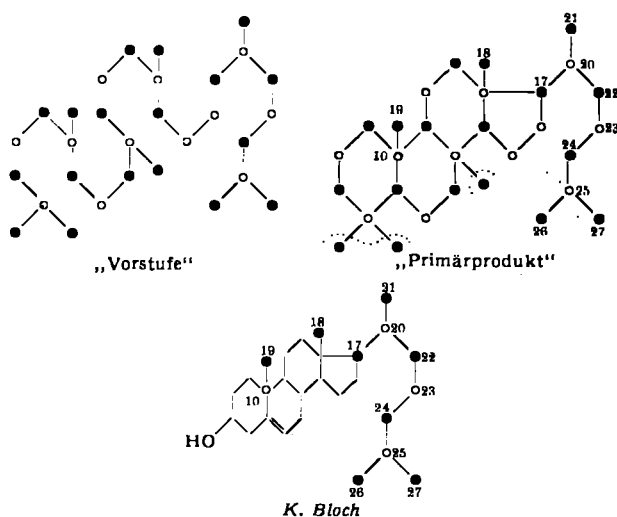
Wenn das Isosqualen und sein Cycloprodukt natürliche Zwischenstufen der Steroid-Biogenese sind, dann ist zu erwarten, daß sie in ihrem Aufbau den experimentellen Befunden von Bloch entsprechen.

Bei dem biologischen Aufbau der Cholesterin-Vorstufe aus Acetat müssen zur Bildung der Kohlenstoff-Kette für jede Isopren-Einheit drei Molekeln Acetat unter Verlust von einer Molekel  $CO_2$  zusammentreten. Diese Vorstellung vom Aufbau der Isopren-Kette ist von Bonner und Arreguin<sup>50)</sup> für die Biogenese des Kautschuks diskutiert worden. Experimentell begründet wurde sie durch Langdon und Bloch<sup>51)</sup> für die Synthese des Squalens und von Schopfer und Grob<sup>51)</sup> für den Aufbau von Carotinoiden. Formuliert man den Ablauf schematisch in der Weise, daß der Methyl-Kohlenstoff durch Punkte, der Carboxyl-Kohlenstoff durch Kreise bezeichnet wird, so erhält man das folgende Bild vom Aufbau der Isopren-Kette:



Bei der normalen Verknüpfung der Isopren-Bausteine resultiert in der fortlaufenden Kette ein dauernder Wechsel zwischen Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoff, während die Methyl-Verzweigungen alle aus Methyl-Kohlenstoff gebildet werden.

Schreibt man die „Vorstufe“ und das „Primärprodukt“ in der gleichen Weise, so ergibt sich die nachstehende Formulierung, aus der die Verteilung des Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoffs abgelesen werden kann:



Die Herkunft der C-Atome, die aus dem Schema zwangsläufig hervorgeht, stimmt in allen Punkten mit den experimentell gefundenen Daten überein. Zum Vergleich ist dem „Primärprodukt“ das Verteilungsschema von Bloch<sup>16, 19)</sup> gegenübergestellt.

Eine besondere Stütze wird in der Tatsache gesehen, daß die experimentell gefundenen Werte für die Verhältniszahlen von Methyl- zu Carboxyl-Kohlenstoff mit den berechneten ausgezeichnet übereinstimmen:

Gesamtmolekel	ber. 1,25	gef. 1,27
Ringsystem	ber. 1,11	gef. 1,1
Seitenkette	ber. 1,67	gef. 1,67

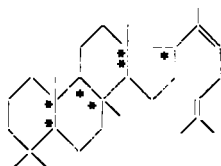
<sup>50)</sup> J. Bonner u. B. Arreguin, *Arch. Biochem.* 20, 109 [1949].  
<sup>51)</sup> W. H. Schopfer u. E. C. Grob, *Experientia* 8, 140 [1952].

Vor kurzem haben *Tschesche* und *Korle*<sup>50</sup>) auf Grund der experimentellen Ergebnisse von *Bloch* ein anderes Verteilungsschema für das Kohlenstoff-Gerüst der Steroide angegeben, das in seiner unsymmetrischen Anordnung nicht sehr überzeugend ist: im Ring A werden drei benachbarte C-Atome aus Carboxyl-Kohlenstoff gebildet, im Ring C treten zwei derartige Bindungen zwischen C-Atomen gleicher Herkunft auf.

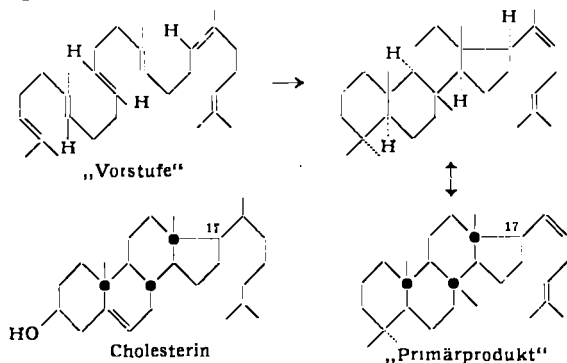
Bei der hier abgeleiteten Formulierung erfolgt ein dauernder Wechsel zwischen C-Atomen aus Methyl- und Carboxyl-Kohlenstoff, mit Ausnahme der beiden C-Atome im Fünfring, die aus der anomalen Isopren-Verknüpfung hervorgehen. Es scheint mir, daß die symmetrische Anordnung den einfachen Aufbauprinzipien, die bei Naturstoffen immer wieder beobachtet werden, besser entspricht.

### Der sterische Aufbau des „Primärproduktes“

Bei der Cyclisierung der „Vorstufe“ zum „Primärprodukt“ entsteht ein völlig gesättigtes tetracyclisches Ringsystem mit 7 asymmetrischen Kohlenstoff-Atomen; die Zahl der möglichen Isomeren ist daher 128. Offenbar wird aber nur eine Form gebildet, deren sterischer Aufbau aus Analogieschlüssen abgeleitet werden kann.



Für die natürlichen bicyclischen Terpene haben *Ruzicka*<sup>52</sup>), *Campbell*<sup>53</sup>) und *Barton*<sup>54</sup>) nachgewiesen, daß sie eine trans-Dekalin-Struktur haben. Dieses Verknüpfungsprinzip ist auch in der Reihe der polycyclischen Triterpene immer wieder bestätigt worden<sup>55</sup>). Folgt man daraus, daß der Anbau der Ringe stets unter trans-Verknüpfung vor sich geht — eine Annahme, die zweifellos berechtigt ist, da der Reaktionsmechanismus beim Aufbau des gesamten Ringsystems immer der gleiche ist —, so müssen alle Wasserstoffatome der Vorstufe, die in der Formulierung hervorgehoben sind, im Cyclisierungsprodukt auf der gleichen Seite der Molekel stehen. Diese Beziehung ist dadurch zum Ausdruck gebracht, daß die C—H-Bindungen des Cyclo-Produkts punktiert geschrieben sind, d. h. hinter der Zeichenebene liegend gedacht werden müssen. Umgekehrt liegen die C—C-Bindungen der drei angulären Methyl-Gruppen und die der Seitenkette vor der Papier-ebene. In Ringsystemen werden die sterischen Verhältnisse nach einem Vorschlag von *Ruzicka* in einfacher Weise wiedergegeben, indem die C-Atome der Ringverknüpfungen, die eine aus der Zeichenebene hervorstehende Bindung haben, durch einen Punkt markiert werden.



<sup>52</sup>) L. Ruzicka, M. W. Goldberg, H. W. Huyser u. C. F. Seidel, *Helv. Chim. Acta* 14, 545 [1931]; L. Ruzicka u. L. Sternbach, *ebenda* 21, 565 [1938].

<sup>53</sup>) W. P. Campbell u. D. Todd, *J. Amer. Chem. Soc.* 64, 928 [1942].

<sup>54</sup>) D. H. R. Barton u. G. A. Schmeidler, *J. Chem. Soc. [London]* 1948, 1197.

<sup>55</sup>) L. Ruzicka, H. Gutmann, O. Jeger u. L. Lederer, *Helv. Chim. Acta* 31, 1746 [1948]; H. Gutmann, O. Jeger u. L. Ruzicka, *ebenda* 34, 1158 [1951]; D. H. R. Barton, *Quart. Rev.* 3, 36 [1949]; T. R. Ames u. E. R. H. Jones, *Nature [London]* 164, 1090 [1949]; W. Klyne, *J. Chem. Soc. [London]* 1952, 2916.

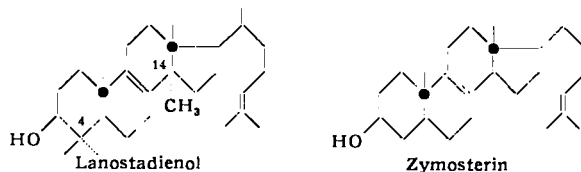
Die Gesetzmäßigkeit der trans-Cyclisierung läßt nur ein „Primärprodukt“ entstehen, das in der Art der Ringverknüpfung den gleichen sterischen Aufbau zeigt, wie er beim Cholesterin und vielen anderen Steroiden vorliegt. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, daß die Konfiguration am Kohlenstoffatom 17 ebenfalls für alle natürlichen Steroide charakteristisch ist.

Mit der Ringbildung ist die Entstehung der optischen Aktivität auf das engste verknüpft, der Cyclisierungsvorgang muß gleichzeitig asymmetrisch ablaufen. Im tierischen Organismus ist die asymmetrische Synthese offenbar nicht an die Zellstruktur gebunden, da nach neuen Arbeiten von *Nancy Bucher*<sup>56</sup>) zellfreies Leberhomogenat bei der Biosynthese des Cholesterins aus <sup>14</sup>C-Acetat ebenso wirksam ist wie ein Organschnitt.

### Die genetische Beziehung zu den Triterpenen

Ein weiterer Beweis für die Annahme, daß die Zwischenstufen der Steroid-Biogenese Triterpene sind, wird darin erblickt, daß Naturstoffe bekannt sind, die die Merkmale beider Verbindungsklassen aufweisen.

Aus dem Wollfett der Schafe ist eine Substanz isoliert worden, die in der älteren Literatur als „Isocholesterin“ bezeichnet wird und aus der bei näherer Untersuchung vier verschiedene Stoffe abgetrennt werden konnten. Der am besten untersuchte Bestandteil ist das Lanostadienol, früher auch Lanosterin genannt, eine Verbindung, die mit dem Kryptosterin der Hefe identisch ist<sup>57</sup>) und deren Konstitution vor allem durch den Arbeitskreis um *Ruzicka* völlig aufgeklärt wurde<sup>58, 59</sup>). Die Verbindung läßt eine nahe Verwandtschaft mit dem Zymosterin erkennen, eine Beziehung, auf die *Ruzicka*<sup>60</sup>) zuerst hingewiesen hat.



Das Lanostadienol hat wie das „Primärprodukt“ zwei gem.-Methyl-Gruppen am C-Atom 4. Auffallend ist dagegen der Unterschied in der dritten überzähligen Methylgruppe, die beim Lanostadienol am C-Atom 14 steht.

Da das Kohlenstoff-Gerüst nicht mehr völlig in Isopren-Reste aufgeteilt werden kann, hat *Ruzicka*<sup>60</sup>) das Lanostadienol in die Familie der Steroide eingereiht. Diese Begründung für die Zuordnung läßt sich bei einer genetischen Verwandtschaft der Steroide und Triterpene nicht mehr beibehalten. Sehr wahrscheinlich ist das Isosqualen auch die Vorstufe des Lanostadienols, doch scheint hier die Ringbildung mit der Anlagerung der Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 verknüpft zu sein.

Die Auffassung, daß bei der Biosynthese des Lanostadienols ein noch unbekanntes Prinzip der Terpen-cyclisierung eingreift, beruht auf der Beobachtung, daß viele cyclische Terpen-Verbindungen in Nachbarstellung zur gem.-Dimethyl-Gruppe eine Hydroxyl-Gruppe tragen. Als Alternative bleibt für die Entstehung dieser Hydroxyl-Gruppe nur der Weg einer Bio-Oxydation nach dem Ring-schluß. Solange experimentelle Grundlagen fehlen, kann zwischen den beiden Möglichkeiten nicht entschieden werden.

<sup>56</sup>) N. L. R. Bucher, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 498 [1953].

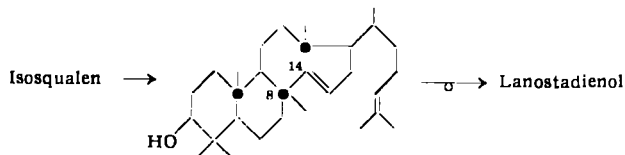
<sup>57</sup>) L. Ruzicka, R. Denys u. O. Jeger, *Helv. Chim. Acta* 28, 759 [1945].

<sup>58</sup>) W. Voser, Hs. H. Günthard, H. Heusser, O. Jeger u. L. Ruzicka, *ebenda* 35, 2065 [1952].

<sup>59</sup>) W. Voser, M. V. Mijović, H. Heusser, O. Jeger u. L. Ruzicka, *ebenda* 35, 2414 [1952].

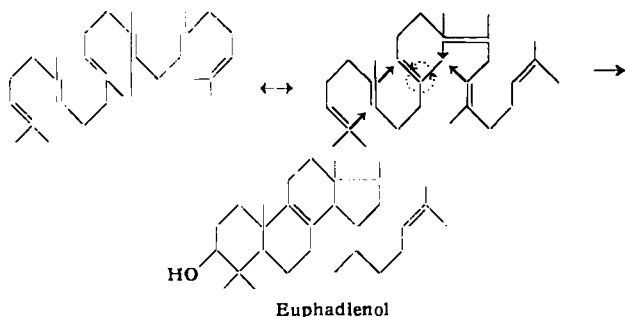
<sup>60</sup>) W. Voser, D. E. White, H. Heusser, O. Jeger u. L. Ruzicka, *ebenda* 35, 830 [1952].

Der Übergang des Cycloproduktes in das Lanostadienol ist unter der Annahme verständlich, daß die Doppelbindung, die bei der normalen Cyclisierung vom C-Atom 20 ausgeht, in den Fünfring bis zum C-Atom 14 verschoben wird. Nach intermediärer Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung wandert die Methyl-Gruppe durch Retro-pinakolin-Umlagerung vom C-Atom 8 zum C-Atom 14; gleichzeitig wird die ditertiäre Doppelbindung zwischen den Ringen B und C gebildet.



In dem Milchsaft der Euphorbiaceen ist ein Triterpenalkohol enthalten, der Euphol oder Euphadienol genannt wird<sup>61)</sup>. Er ist mit dem Lanostadienol isomer, weicht aber im Aufbau seines Kohlenstoff-Gerüsts von dieser Verbindung ab. Seine Konstitution ist vor allem durch den Arbeitskreis um O. Jeger<sup>62)</sup> aufgeklärt worden. Für die Vorstufe des Euphadienols muß eine andere Art der anomalen Isopren-Verknüpfung angenommen werden als für das Isosqualen. Ein entsprechender Aufbau liegt z. B. auch in der Isopren-Kette des Santonins oder im Ring E der pentacyclischen Triterpene vom Typ des  $\alpha$ -Amyrins vor.

Bei der Anordnung der Kohlenstoff-Kette nach der ersten Formulierung ist die Bildung eines tetracyclischen Ringsystems durch die Nachbarstellung der tertiären Cyclisierungszentren unmöglich. Bei der folgenden Anordnung führt der Cyclisierungsablauf in Richtung der Pfeile unter gleichzeitiger Anlagerung der Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 unmittelbar zum Euphadienol.



Im Zusammenhang mit der Biogenese der Steroide ist das Euphadienol von besonderer Bedeutung, weil es die erste Verbindung ist, bei der die Methyl-Gruppe des dritten Isopren-Bausteins („Methyl-Gruppe am C-Atom 8“), die im Lanostadienol ihren Platz gewechselt haben muß, in der ursprünglichen Stellung bleibt – wenn sie auch durch den Einbau in das Ringsystem nicht mehr unmittelbar zu erkennen ist.

Durch Anwendung der asymmetrischen Synthese nach McKenzie<sup>63)</sup> haben Dauben, Dickel, Jeger und Prelog<sup>64)</sup> Konfigurationsbestimmungen an Triterpenen und Steroiden ausgeführt. Bei dem Vergleich des Dihydro-lanosterins, Euphadienols und  $\alpha$ -Amyrins mit dem Dihydro-

cholesterin wurde für den Ring A dieser Verbindungen eine Übereinstimmung in der Konfiguration und Konstellation nachgewiesen.

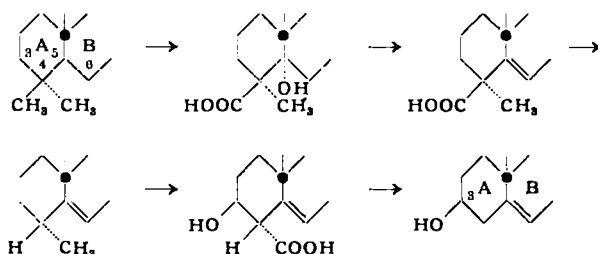
### Die Umwandlung des „Primärproduktes“ in Cholesterin

Der Ring A des „Primärproduktes“ hat am Kohlenstoffatom 4 zwei gem.-Methyl-Gruppen, die im Ringsystem des Cholesterins fehlen. Ihre Entfernung ist nur durch oxydativen Abbau möglich.

Die Fähigkeit des tierischen Organismus, Methyl-Gruppen zu oxydieren, ist experimentell bewiesen. Es seien hier nur die Arbeiten von R. Kuhn<sup>65)</sup> über den Abbau des Geraniols zu den Hildebrandsäuren, die  $\omega$ -Oxydation der Fettsäuren nach Verkade<sup>66)</sup> und die Untersuchungen von Fieser<sup>67)</sup> über den Abbau von aliphatischen Seitenketten bei Oxy-naphthochinonen genannt. Daß auch im pflanzlichen Organismus Methyl-Oxydationen weit verbreitet sind, ist in der Reihe der Triterpen-Verbindungen durch die Isolierung der verschiedensten Oxydationsprodukte, z. B. des Hederagenins, des Gypsogenins, der Boswellinsäuren und vieler anderer, hinreichend bewiesen. Aus der Reihe der natürlichen Steroide können Verbindungen wie das Quabagenin und Strophanthidin genannt werden.

Bei dem oxydativen Abbau des „Primärproduktes“ muß außer der Umwandlung der Methyl-Gruppen in Carboxyl-Gruppen noch ein zweites Oxydationsprinzip eingreifen, und zwar nach Art einer  $\beta$ -Oxydation. Der Mechanismus ist nicht der klassischen  $\beta$ -Oxydation im Sinne von Knoop gleichzusetzen, da dieser nur für geradkettige Fettsäuren Gültigkeit besitzt. Es lassen sich aber Analogien anführen, aus denen hervorgeht, daß dem Organismus auch  $\beta$ -Oxydationen möglich sind, wenn Kettenverzweigungen wie im „Primärprodukt“ vorliegen. Ein sehr schönes Beispiel aus der Reihe der Gallensäuren ist die Tetraoxy-norsterchoholsäure, die in der Seitenkette bei einer  $\alpha$ -Methyl-Verzweigung eine Hydroxyl-Gruppe in  $\beta$ -Stellung trägt. Auch bei Schimmelpilzen sind derartige Oxydationen von Thaler<sup>68)</sup> beobachtet worden, da  $\alpha$ -Methyl-verzweigte Fettsäuren von *Penicillium glaucum* in Äthylketone übergeführt werden. Andererseits werden nach Untersuchungen von Carter und Mitarb.<sup>69)</sup> sowie Kuhn und Livada<sup>70)</sup>  $\beta$ -Methyl-verzweigte Fettsäuren in  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Säuren umgewandelt. Sehr wahrscheinlich, schreibt Breusch<sup>71)</sup>, entstehen die ungesättigten Säuren über eine primär gebildete  $\beta$ -Oxysäure durch Wasserabspaltung.

Der oxydative Abbau des „Primärproduktes“ kann im Bezug auf den Ring A in der folgenden Weise formuliert werden:



<sup>61)</sup> K. H. Bauer u. P. Schenkel, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 266, 633 [1928]; G. T. Newbold u. F. S. Spring, J. Chem. Soc. [London] 1944, 249.

<sup>62)</sup> O. Jeger u. Hs. K. Krüsi, Helv. Chim. Acta 30, 2045 [1947]; C. B. Roth u. O. Jeger, ebenda 32, 1620 [1949]; K. Christen, M. Dünnenberger, C. B. Roth, H. Heusser u. O. Jeger, ebenda 35, 1756 [1952]; vgl. auch A. D. McDonald, F. L. Warren u. J. M. Williams, J. Chem. Soc. [London] 1949, 155.

<sup>63)</sup> Vgl. V. Prelog, Helv. Chim. Acta 36, 308 [1953] u. V. Prelog H. L. Meier, ebenda 36, 320 [1953].

<sup>64)</sup> W. G. Dauben, D. F. Dickel, O. Jeger u. V. Prelog, Helv. Chim. Acta 36, 325 [1953].

<sup>65)</sup> R. Kuhn, F. Köhler u. L. Köhler, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 242, 171 [1936].

<sup>66)</sup> P. E. Verkade, J. van der Lee u. A. J. S. Alphen, ebenda 252, 163 [1938].

<sup>67)</sup> L. F. Fieser, F. C. Chang, W. G. Dauben, C. Heidelberger, H. Heymann u. A. M. Seligman, J. Pharmacol. exper. Therap. 91, 331 [1947].

<sup>68)</sup> H. Thaler u. G. Geist, Biochem. Z. 302, 369 [1939]; H. Thaler u. W. Eisenlohr, ebenda 308, 88 [1941].

<sup>69)</sup> Carter, Osman, Levine u. Gamm, J. Biol. Chemistry 128, XIII [1939].

<sup>70)</sup> R. Kuhn u. K. Livada, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 220, 235 [1933].

<sup>71)</sup> F. L. Breusch, diese Ztschr. 62, 66 [1950].

Die ( $\beta$ )-ständige Methyl-Gruppe<sup>72)</sup> am C-Atom 4 wird zuerst zur Carboxyl-Gruppe oxydiert und gleichzeitig am C-Atom 5 in der  $\beta$ -Stellung eine Hydroxyl-Gruppe eingeführt. Bei der Wasserabspaltung kann die Doppelbindung nur in den Ring B verlaufen, durch diese Lage wird die Bindung der Carboxyl-Gruppe so gelockert, daß eine Abspaltung unter Verlust von  $\text{CO}_2$  leicht eintritt<sup>73)</sup>. Der gleiche Vorgang wiederholt sich an der ( $\alpha$ )-ständigen Methyl-Gruppe. Hier ist die Abspaltung von Wasser unter Bildung einer  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Säure dadurch erschwert, daß die Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 und der Wasserstoff am C-Atom 4 in cis-Stellung zueinander stehen. Die Abspaltung der zweiten Carboxyl-Gruppe geschieht aus dem gleichen Grund wie die der ersten.

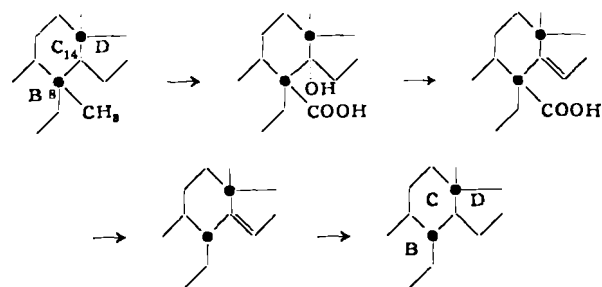
Damit ist auf einem durchsichtigen Weg nicht nur die Struktur der Ringe A und B, sondern auch die natürliche Konfiguration der Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 entstanden, wie sie beim Cholesterin vorliegt.

Durch weitere Oxydation der Hydroxyl-Gruppe im Ring A entstehen unter Umlagerung der Doppelbindung  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Ketone, eine Anordnung, die bei vielen Steroiden angetroffen wird.

Es ist aus Analogiegründen sehr wahrscheinlich, daß der Abbau der Methyl-Gruppen im Ring A nur auf dem angegebenen Weg verläuft und die 3-Ketosteroider erst durch Dehydrierung des  $\beta, \gamma$ -ungesättigten, sekundären Alkohols gebildet werden.

Die Formulierung für den Abbau im Ring A des „Primärproduktes“ ist auch gültig, wenn die Cyclisierung der „Vorstufe“ unter Anlagerung einer Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3 oder durch nachfolgende Bio-Oxydation verläuft, wie es analog zur Biogenese des Lanostadienols oder Euphadienols angenommen werden kann. Für beide Verbindungen ist die ( $\beta$ )-Stellung der Hydroxyl-Gruppe gleichfalls bewiesen.

Das „Primärprodukt“ hat eine weitere überzählige Methyl-Gruppe am C-Atom 8, die auch oxydativ abgebaut werden muß. Auch hier können aus der Reihe der pentacyclischen Triterpene Beispiele wie die Oleanolsäure, die Chinovasäure und viele andere genannt werden, bei denen anguläre Methyl-Gruppen zu Carboxyl-Gruppen oxydiert sind. Die Abspaltung der Carboxyl-Gruppe am C-Atom 8 des „Primärproduktes“ ist formal auf verschiedene Weise möglich, da zwei Wege der  $\beta$ -Oxydation vorhanden sind. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß nur das folgende Schema dem natürlichen Ablauf entspricht:

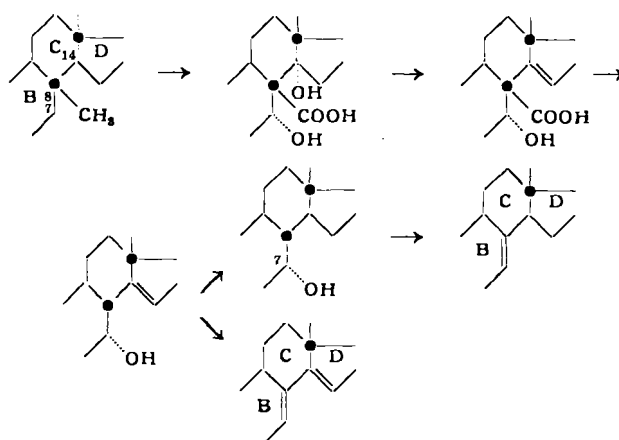


Auf die  $\beta$ -Oxydation am C-Atom 14 folgt eine Wasserabspaltung unter Bildung einer  $\beta, \gamma$ -ungesättigten Carbonsäure, die leicht decarboxyliert wird. Die Doppelbindung im Ring D wird dann unter Beibehaltung der ursprünglichen Konfiguration hydriert. Diese Annahme entspricht

der Regel von Barton und Rosenfelder<sup>74)</sup>, nach der eine Doppelbindung, die in einer Ringverknüpfung endet, immer unter Ausbildung der stabileren trans-Konfiguration hydriert wird. Einen überzeugenden Beweis kann man darin erblicken, daß das Cholesterin im Organismus stets von einer kleinen Menge Dihydrocholesterin begleitet wird, in dem die Doppelbindung zwischen den C-Atomen 5 und 6 im gleichen Sinne hydriert worden ist.

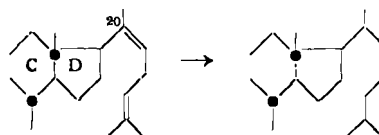
Die andere Möglichkeit zur Entfernung der Methyl-Gruppe am C-Atom 8 schließt eine  $\beta$ -Oxydation am C-Atom 7 ein, bei der eine sekundäre Hydroxyl-Gruppe gebildet wird, die weiter zu einer Carbonyl-Gruppe dehydriert werden kann. Durch Decarboxylierung der  $\beta$ -Ketosäure würde ein Keton als Zwischenprodukt auftreten, das über seine Enolform eine Umkehrung der Konfiguration am C-Atom 8 bewirken könnte. Da ein Konfigurationswechsel am C-Atom 8 bei natürlichen Steroiden niemals beobachtet wurde, muß dieser Weg des Abbaus ausgeschlossen werden.

Die Vereinigung der beiden Reaktionswege ist aber biologisch von Bedeutung. Das Ergosterin, 14-Dehydro-ergosterin und andere natürliche Steroide werden nach dem folgenden Schema entstehen:



Bei dem „Prinzip der  $\beta$ -Oxydation in Ringverbindungen“ besteht offenbar die Regel, daß nur solche Wasserstoff-Atome oxydiert werden, die in der trans-Stellung zur Carboxyl-Gruppe stehen. Es ist möglich, daß von einer angulären Carboxyl-Gruppe aus in die beiden benachbarten trans-Stellungen Hydroxyl-Gruppen eingeführt werden.

Die Umwandlung des „Primärproduktes“ in das Cholesterin wird durch die Hydrierung der beiden Doppelbindungen in der Seitenkette beendet. Bei diesem Vorgang wird ein neues Asymmetriezentrum am C-Atom 20 gebildet. Durch den asymmetrischen Verlauf der Äthylen-Hydrierung, wie er von F. G. Fischer<sup>75)</sup> und R. Kuhn<sup>68)</sup> bei der biochemischen Hydrierung durch Hefe oder im Tierkörper nachgewiesen wurde, entsteht auch hier wiederum nur ein optisch aktives Hydrierungsprodukt.



Die Biosynthese des Cholesterins wird gerade auf dem umgekehrten Wege verlaufen, wie sie hier aus formalen Gründen abgeleitet wurde. Aus dem Isosqualen entsteht durch asymmetrische Cyclisierung und Hydrierung eine optisch aktive Molekel, darauf folgt die Entfernung der Methyl-Gruppe am C-Atom 8, und zuletzt wird die charakteristische Gruppierung in den Ringen A und B ausgebildet.

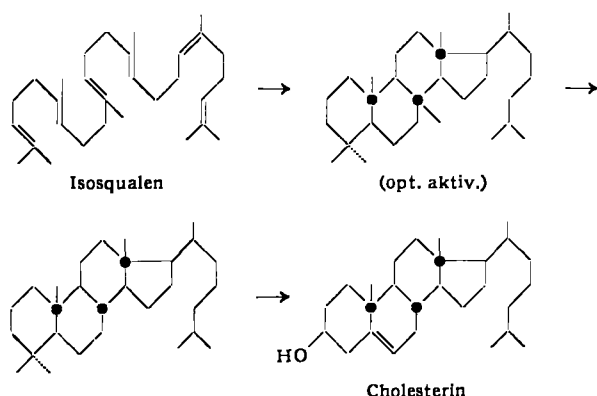
<sup>72)</sup> Nach einem Vorschlag von Fieser werden die Substituenten, die vor der Zeichenebene liegen, durch eine voll ausgezogene Bindung und das Praefix ( $\beta$ ), die dahinter liegenden durch eine punktierte Bindung und das Praefix ( $\alpha$ ) gekennzeichnet.

<sup>73)</sup> H. Diener, O. Jeger u. L. Ruzicka, *Helv. Chim. Acta* 33, 897 [1950].

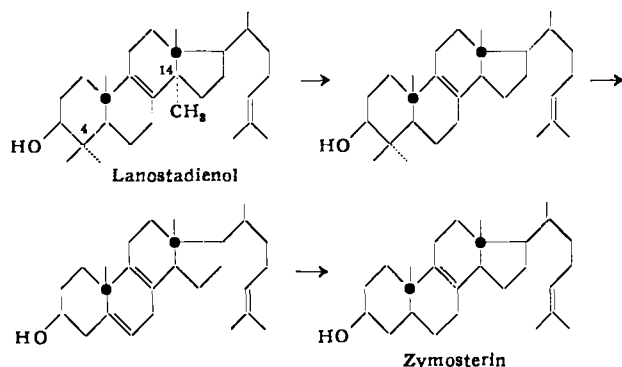
<sup>74)</sup> D. H. R. Barton u. W. I. Rosenfelder, *J. Chem. Soc. [London]* 1951, 1048.



In dieser Reihenfolge ist jede Überschneidung von Oxydations- und Reduktionsstufen ausgeschlossen.



Entsprechend ist auch die Biosynthese des Zymosterins abzuleiten. Sie hat für die hier vorgetragene Hypothese der Steroid-Bildung eine besondere Beweiskraft, da in dem Kryptosterin bzw. Lanostadienol ein natürliches Zwischenprodukt gefunden wurde, dessen Entstehung aus dem Isosqualen schon formuliert worden ist. Der weitere Abbau vollzieht sich in zwei Stufen, indem zuerst die Methyl-Gruppe am C-Atom 14 durch Oxydation und Decarboxylierung abgespalten wird und dann die beiden Methyl-Gruppen am C-Atom 4 wie bei dem „Primärprodukt“ des Cholesterins entfernt werden. Die Doppelbindung zwischen den C-Atomen 5 und 6 wird unter Ausbildung der trans-Verknüpfung der Ringe A/B partiell hydriert.

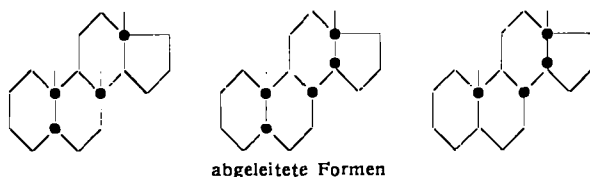
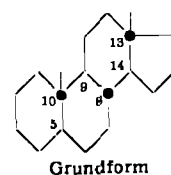


Aus der in allen Einzelheiten aufgeklärten Konfiguration des Zymosterins ist ein sicherer Rückschluß auf die sterische Anordnung im Lanostadienol möglich, die mit der von Ruzicka<sup>75)</sup> abgeleiteten Konfiguration übereinstimmt.

### Die Umkehrung der Konfiguration an den C-Atomen 5 und 14

Betrachtet man das Ringsystem des „Primärproduktes“ unter Fortlassung der Seitenkette und der drei überzähligen Methyl-Gruppen an den C-Atomen 4 und 8, so bleibt ein Kohlenwasserstoff, in dem die Grundform aller natürlichen Steroide vorliegt. Sein sterischer Aufbau ist dadurch gekennzeichnet, daß die Methyl-Gruppen an den C-Atomen 10 und 13 und das Wasserstoff-Atom am C-Atom 8 in cis-Stellung zueinander stehen. Nach der neuen Nomenklatur der Steroide<sup>76)</sup> hat dieser Kohlenwasserstoff den Namen „Androstan“ erhalten; er gehört der 5( $\alpha$ )-Reihe an. Von ihm leiten sich drei Formen

ab, die sich durch eine Umkehrung der Konfiguration am C-Atom 5, an den C-Atomen 5 und 14 und am C-Atom 14 unterscheiden. Die erste Form ist das „Testan“, das zur 5( $\beta$ )-Reihe gehört, die beiden folgenden haben keine Eigenamen und können als „14( $\beta$ )-Testan“ und „14( $\beta$ )-Androstan“ bezeichnet werden.



Das Auftreten der abgeleiteten Formen ist zwanglos durch die Annahme zu erklären, die der neuen Hypothese zugrunde liegt.

Zu der Umkehrung der Konfiguration am C-Atom 5 braucht hier nichts gesagt zu werden, da im Cholesterin die „natürliche Zwischenstufe“ vorliegt, von der aus die Steroide der 5( $\alpha$ )- und 5( $\beta$ )-Reihe zugänglich sind. Der Übergang von der einen in die andere sterische Reihe ist seit langem bekannt und wurde eingehend untersucht. Das gilt auch für die Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 3, deren Anordnung mit der Konfiguration am C-Atom 5 eng verknüpft ist.

Die Umkehrung der Konfiguration am C-Atom 14 konnte bisher nicht befriedigend erklärt werden. Sie wird ausschließlich bei Steroiden gefunden, die zu den Familien der Herz- und Krötengifte, der Uzarawurzel und zu den Meerzwiebelgewächsen gehören. Alle diese Verbindungen haben eine ( $\beta$ )-Hydroxyl-Gruppe am C-Atom 14, viele außerdem die gleiche Gruppierung am C-Atom 5. Im Zusammenhang mit der oxydativen Entfernung der überzähligen Methyl-Gruppe am C-Atom 8 des „Primärproduktes“ wurde ein Abbauprodukt mit einer Doppelbindung zwischen den C-Atomen 14 und 15 formuliert. An diese Doppelbindung wird in der Weise Wasser angelagert, daß die Hydroxyl-Gruppe an das C-Atom 14 tritt, dabei wird die ursprüngliche trans-Verknüpfung der Ringe C/D in eine cis-Verknüpfung umgewandelt. Der gleiche Vorgang kann sich an der Doppelbindung zwischen den C-Atomen 5 und 6 wiederholen.

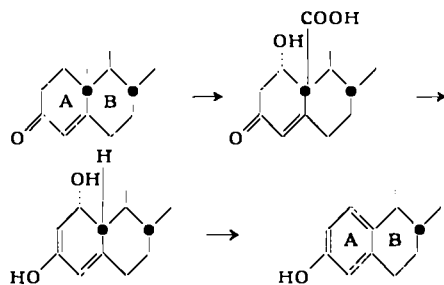
In der Umkehrung der Konfiguration am C-Atom 14 wird ein weiterer Beweis für die Realität der Methyl-Gruppe am C-Atom 8 des „Primärproduktes“ gesehen.

### Die Bildung spezifischer Steroide

Die biologischen Versuche mit markiertem Cholesterin haben viele Hinweise dafür erbracht, daß das Cholesterin die Muttersubstanz der tierischen Steroide ist. Manche Beobachtungen sprechen aber auch für die Annahme, daß einzelne Organe befähigt sind, spezifische Steroide unmittelbar aufzubauen. Diese Ergebnisse können so gedeutet werden, daß der Aufbau aller Steroide bis zu dem „Primärprodukt“ gleichartig verläuft und daß aus diesem durch Abbau spezifische Steroide hervorgehen, ohne die Zwischenstufe des Cholesterins zu durchlaufen.

<sup>75)</sup> F. G. Fischer: Fortschr. Chem. organ. Naturst. III, 52 [1939].  
<sup>76)</sup> Vorschläge zur Nomenklatur der Steroide, Helv. Chim. Acta 34, 1680 [1951].

Die Bildung der weiblichen Sexualhormone vom Typ des Östrons und Equilenins ist mit dem „Prinzip der  $\beta$ -Oxydation in Ringverbindungen“ ohne weiteres zu erklären:



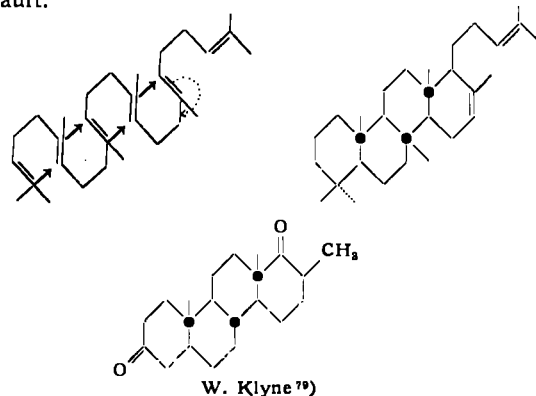
Sinngemäß läßt sich auch der Abbau zum Equilenin formulieren, bei dem zwei weitere Hydroxyl-Gruppen in der 7( $\alpha$ )- und 9( $\alpha$ )-Stellung beteiligt sind.

Die Stellung mancher Hydroxyl-Gruppen im Ringsystem der Steroide ist schwieriger zu erklären. Die C-Atome 2, 11, 12 und 16, die bei den Saponinen, Corticosteroiden und Gallensäuren substituiert sind, werden bei dem Abbau des „Primärproduktes“ nicht berührt. Für das C-Atom 11 ist nachgewiesen, daß es im pflanzlichen und tierischen Organismus unmittelbar durch Bioxydation angegriffen wird<sup>77, 78</sup>).

Die einzelnen Steroid-Familien sind vor allem durch die mannigfaltigen Abwandlungen im Bereich der Seitenkette gekennzeichnet. Durch stufenweisen Abbau bis zum Fünfring entstehen die Gallensäuren, die Corticosteroide und Sexualhormone; die Abwandlung zum Fünfring- oder Sechsring-Lacton ist für die Herz- und Krötengifte charakteristisch, während die Steroid-alkaloide und Sapogenine komplizierter gebaute Hetero-Ringe aufweisen. Alle natürlichen Steroide haben die gleiche typische Struktur der Seitenkette, die auch in ihren Abwandlungen deutlich erkennbar bleibt. Unregelmäßigkeiten im Bereich der Seitenkette treten nur bei wenigen Steroiden auf; so hat das Ergosterin eine zusätzliche Methyl-, das Stigmasterin eine zusätzliche Äthyl-Gruppe am C-Atom 24— diese Veränderungen haben aber keine grundsätzliche Bedeutung für die Biogenese.

<sup>77</sup>) D. H. Peterson u. H. C. Murray, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1871 [1952].  
<sup>78</sup>) O. Hechter, A. Zaffaroni, R. P. Jacobson, H. Levy, R. W. Jeanloz, W. Schenker u. G. Pincus: „Recent Progress Hormone Research“ 1951, Vol. VI, p. 215.

Interessant ist das Vorkommen natürlicher Homosterioide, die Klyne<sup>79</sup>) aus Stutenharn isoliert hat. Es wird vermutet, daß sie aus einer Vorstufe gebildet werden, in der fünf Isopren-Einheiten in der normalen Verknüpfung vorliegen. Bei der Cyclisierung werden vier Sechsringe mit der Konfiguration der Steroide ausgebildet, deren Umwandlung im Sinne der vorhergehenden Ableitungen verläuft.



Die Homosterioide stehen in der Mitte zwischen den Steroiden und den pentacyclischen Triterpenen, ihr Vorkommen wird als ein weiterer Beweis für die genetische Verwandtschaft der beiden Verbindungsklassen angesehen.

### Zusammenfassung

Als Vorläufer der natürlichen Steroide des Tier- und Pflanzenreiches sind Triterpen-Kohlenwasserstoffe vom Typus des Isosqualens anzunehmen. Aus den Vorstufen entsteht durch asymmetrische Cyclisierung das Ringsystem mit der Seitenkette unter Ausbildung der charakteristischen Konfiguration. Auch die weiteren Zwischenstufen der Biogenese sind Sauerstoff-arme Verbindungen, die erst durch nachfolgenden oxydativen Angriff — im Ringsystem und in der Seitenkette — in die bekannten Naturstoffe übergeführt werden.

Zur Stützung der theoretischen Überlegungen ist die Synthese des Isosqualens in Angriff genommen, um sein Verhalten bei der Cyclisierung und beim oxydativen Abbau kennenzulernen.

Eingegangen am 29. Januar 1953 [A 494]

<sup>79</sup>) W. Klyne, Nature [London] 166, 559 [1950].

## Papierchromatographische Analyse von Alkylpyridinen

Von Prof. Dr. D. JERCHEL und Dipl.-Chem. W. JACOBS<sup>1)</sup>

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz und dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

Alkylpyridine lassen sich nach Oxydation mit  $\text{SeO}_2$  bequem der Papierchromatographie zuführen. Die entstandenen Pyridincarbonsäuren können durch Besprühen mit 0,05proz. Fluoreszein-Lösung auf dem Papier im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Sie sind auf Grund ihrer  $R_F$ -Werte sowie bestimmter Farbreaktionen identifizierbar. Die Stellung der Alkyl-Reste im Pyridinkern wird bestimmt und eine analytische Kennzeichnung von Pyridinbasengemischen möglich. Pyridinaldehyde wurden in die Untersuchung einbezogen.

Da Trennung, Identifizierung und Reinheitsprüfung von Pyridinbasen aus technischen Gemischen nach den bisher geübten Verfahren meist recht umständlich sind und relativ große Substanzmengen erfordern, wollten wir solche Analysen papierchromatographisch ausführen. Zur direkten Bestimmung auf Chromatogrammen eignen sich Alkylpyridine mit kurzen Alkyl-Resten wegen ihrer niedrigen

Siedepunkte nur wenig. Nach Überführung in die entsprechenden Carbonsäuren ist jedoch der papierchromatographische Nachweis zuverlässig möglich. Derart lassen sich die Stellungen der Substituenten am Pyridin-Kern exakt bestimmen. Diese Aussage kann dann gemeinsam mit der Kenntnis der analytischen und physikalischen Daten des Ausgangsmaterials zur Aufklärung der vorliegenden Alkylpyridine dienen. Pyridinaldehyde lassen sich

<sup>1)</sup> Auszug aus der Diplomarbeit W. Jacobs, Mainz 1953.