

Biosynthesis of the Bufadienolide Marinobufagin in Toads *Bufo paracnemis* from Cholesterol-20-¹⁴C

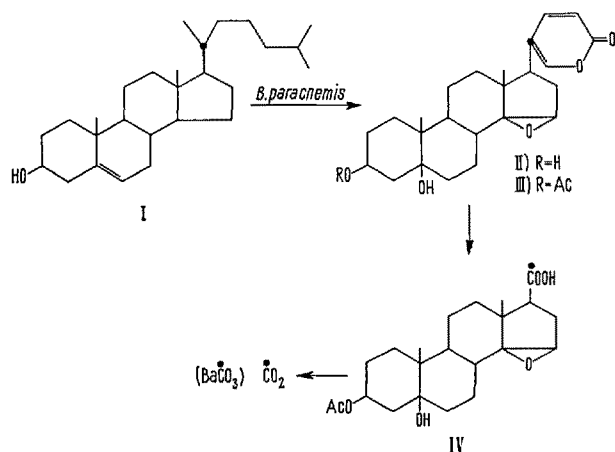
We have previously shown that pregnenolone-20-¹⁴C resulted a very poor precursor of bufadienolides from animal origin¹. As a consequence of this result, it was postulated that the biosynthetic precursor of animal bufadienolides should be cholesterol itself, in disagreement with the biosynthetic pathway to vegetal bufadienolides which are directly derived from pregnenolone^{1,2} plus a still unknown 3-carbon unit precursor.

To test this hypothesis, several intact *B. paracnemis* specimens were inoculated s.c. with synthetic³ cholesterol-20-¹⁴C (I). The venom from the parotid and tibial glands was collected 78 and 107 days after injection, and marinobufagin (II) was isolated and purified by

known methods⁴. In both cases compound II was found to be radioactive; activity values (see Table) show the slow metabolism of the animal, since the best incorporation resulted from the longer period of time. Immediately after collection of the venom, the animals were sacrificed, and cholesterol from liver and gall bladder was isolated and purified by known procedures⁵. Activity values of cholesterol are shown in the Table.

Marinobufagin (II) from both collections was combined and purified further as the acetate. Marinobufagin acetate (III) was oxidized to the etianic acid IV as described by SCHRÖTER et al.⁶. Compound IV was submitted to the Schmidt degradation reaction, and the evolved carbon dioxide was collected as barium carbonate, which had essentially the same specific activity of compound III.

The tabulated values clearly indicate that cholesterol-20-¹⁴C is an excellent precursor of marinobufagin, and that this compound is solely labelled at C-20. Hence, the present results strongly support the hypothesis that the α -pyrone ring of animal bufadienolides is directly derived from the side-chain of cholesterol⁷.



Precursor	Cholesterol-20- ¹⁴ C (1.93 × 10 ⁷ dpm/mM)	
Product	Specific activity dpm/mM	Specific incorporation (%)
Cholesterol	1.93 × 10 ^{4a}	0.10
(from liver)	5.00 × 10 ^{4b}	0.25
Marinobufagin	0.64 × 10 ^{4a}	0.03
acetate (III)	1.96 × 10 ^{4b}	0.10
	1.41 × 10 ^{4c}	—
Etianic acid (IV)	1.33 × 10 ⁴	—
BaCO ₃	1.46 × 10 ⁴	—

^a 78 days collection. ^b 107 days collection. ^c Combined from both collections.

Zusammenfassung. Der biogenetische Ursprung des Marinobufagins in Kröten *Bufo paracnemis* wurde durch Injektion von Cholesterol-20-¹⁴C nachgewiesen. Durch Abbau wurde festgestellt, dass die Gesamtaktivität des Produktes im C-20 des Marinobufagins enthalten ist.

ANA M. PORTO and E. G. GROS

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Perú 222, Buenos Aires (Argentina), 20 November 1970.

A. M. PORTO and E. G. GROS, *Experientia* 26, 11 (1970). — After publication of our paper we were kindly informed by Prof. R. TSCHESCHE (University of Bonn) that he had arrived to the same conclusion.

² R. TSCHESCHE and B. BRASSAT, *Z. Naturforsch.* 20b, 707 (1965).

³ A. M. PORTO and E. G. GROS, *J. label. Comp.*, 6, 369 (1970).

⁴ M. BARBIER, H. SCHRÖTER, K. MEYER, O. SCHINDLER and T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* 42, 2486 (1959). — E. G. GROS and A. M. PORTO, *An. Asoc. quim. argent.* 55, 177 (1967).

⁵ P. F. HALL and K. B. EIK-NES, *Biochim. biophys. Acta* 63, 411 (1962).

⁶ H. SCHRÖTER, R. REES and K. MEYER, *Helv. chim. Acta* 42, 1385 (1959).

⁷ We thank the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas for financial support.

Sur les intermédiaires de la désalkylation en C₂₄ du β -sitostérol par le criquet *Locusta migratoria* L.

Les insectes phytophages sont incapables de synthétiser le cholestérol et pourtant celui-ci leur est absolument nécessaire^{1,2}. Ils peuvent l'obtenir par dégradation de certains phytostérols comme le β -sitostérol à défaut de le trouver dans leur nourriture^{1,2}. SVOBODA^{3,4} a montré que le lépidoptère *Manduca sexta* transforme le β -sitostérol en cholestérol par l'intermédiaire du desmostérol. WIENTJENS⁵ à la suite de ses travaux sur la Blatte *Blattella germanica* a émis l'hypothèse que cette transformation devait se faire suivant un processus inverse de celui qui existe chez les végétaux supérieurs pour la synthèse des stérols

en C₂₉; l'éthylidène-24 cholestérol (fucostérol) et le méthylène-24 cholestérol seraient des intermédiaires. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un

¹ R. B. CLAYTON, *J. Lipid Res.* 5, 3 (1964).

² F. J. RITTER et W. H. J. M. WIENTJENS, *T.N.O. Nieuws* 22, 381 (1967).

³ J. A. SVOBODA et W. E. ROBBINS, *Science* 156, 1637 (1967).

⁴ J. A. SVOBODA, M. J. THOMPSON et W. E. ROBBINS, *Life Sci.* 6, 395 (1967).

β -sitostérol pur⁵ tritié en 3 par réduction⁶ de la cétone-3 Δ_5 par NaBH_4 en présence de NaB^3H_4 . 3 mg ($1,1 \times 10^6$ c/mn) ont été injectés dans l'abdomen de 24 criquets *Locusta migratoria* des deux sexes, pris après la quatrième mue larvaire, et sur une période de trois jours. Ils ont été maintenus en vie 8 jours à 30°C et tués par le froid à -20°C.

Après extraction des lipides et saponification suivant les méthodes habituelles, les stérols ont été isolés par chromatographie préparative sur couche mince (CCM) d'acide silicique dans le système de solvants pentane-acétate d'éthyle 7:3 v/v. Les stérols (26,4 mg radioactivité $6,8 \times 10^6$ c/mn) après propionylation⁷ et addition de 2 mg des propionates de fucostérol, desmostérol, méthylène-24 cholestérol, ont été séparés en 4 groupes par CCM sur alumine- AgNO_3 dans le système hexane-acétate d'éthyle 100:8 v/v. Le 1^{er} groupe (Rf 0,70) correspond aux propionates de cholestérol, campestérol, β -sitostérol et stigmastérol; le 2^e (Rf 0,40) correspond au propionate de fucostérol; le 3^e (Rf 0,30) correspond au propionate de desmostérol, et le 4^e groupe (Rf 0,18) au propionate de méthylène-24 cholestérol. Chacun de ces groupes de propionates de stérols a ensuite été analysé par chromatographie gaz-liquide (CGL) préparative sur une colonne à 1% de OV 101 de 2 m de longueur et à une température de 245°C. Les différents propionates ont été recueillis à la sortie de l'appareil et leur radioactivité mesurée séparément. Nous avons observé les radioactivités relatives ci-après (par rapport à la sommation des radioactivités recueillies): cholestérol 11,6%; fucostérol 0,5%; desmostérol 0,1%; méthylène-24 cholestérol 0%; stérol probablement en C_{29} non identifié 0,15%; β -sitostérol 87% (contient le précurseur). La possibilité d'une réintroduction du tritium en 3 après échange est exclue par la constatation que le méthylène-24 cholestérol est totalement dépourvu de radioactivité.

Ces résultats nous permettent de conclure que le β -sitostérol est transformé en cholestérol; le fucostérol et le desmostérol sont des intermédiaires de cette trans-

formation; aucune radioactivité n'a pu être observée dans le méthylène-24 cholestérol ou tout autre stérol en C_{28} ; par contre nous avons observé la présence d'un propionate de stérol radioactif qui est séparé au même endroit que le propionate de méthylène-24 cholestérol en CCM (0,15% de la radioactivité) et dont le comportement en CGL (temps de rétention un peu supérieur à ceux des β -sitostérol et fucostérol) indique qu'il peut correspondre à un propionate de stérol en C_{29} . La dégradation du β -sitostérol se ferait donc par le schéma suivant: β -sitostérol $\rightarrow$ fucostérol (+ stérol en C_{29} non identifié?) $\rightarrow$ desmostérol $\rightarrow$ cholestérol. Des expériences parallèles effectuées chez l'abeille *Apis mellifica*⁸ conduisent à des conclusions similaires. Les radioactivités ont été mesurées sur un scintillateur Nuclear Chicago de rendement 50%.

Summary. The locust *Locusta migratoria* L. transforms β -sitosterol into cholesterol. Fucosterol, desmosterol and an unknown sterol (probably in C_{29}) are found to be intermediates, but not 24-methylene cholesterol.

J. P. ALLAIS et M. BARBIER

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences, Orsay-91 et Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette-91 (France), 30 novembre 1970.

⁵ J. P. ALLAIS et M. BARBIER, *Qualitas Pl. Mater. veg.* 16, 215 (1968).

⁶ M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Phytochemistry* 8, 1441 (1969).

⁷ J. R. CLAUDE, *J. Chromat.* 17, 596 (1965).

⁸ J. P. ALLAIS, J. PAIN et M. BARBIER, *C. r. Acad. Sci Paris*, 272 Ser. D, 877 (1971).

⁹ Nous remercions le CEA pour des subventions ayant facilité l'achat du matériel radioactif. Nous remercions les professeurs E. LEDERER et J. BERGERARD pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Zum Protonentransfer in Modellsystemen für die komplementäre Basenpaarung in Nukleinsäuren

Nach einer Hypothese von LÖWDIN¹ kann ein Protonentransfer in der Desoxyribonukleinsäure über das Wasserstoffbrückensystem der komplementären Basen Adenin-Thymin (A-T) und Guanin-Cytosin (G-C) hinweg mutagene Effekte auslösen, womit der quantenmechanische Tunnel-effekt als mögliche Ursache der spontanen Cancerogenese und des Alterns auftritt. LÖWDIN zitiert infrarotspektroskopische Arbeiten von ZIMMERMANN² am Imidazol als Beweis für das Protonentunneln über intermolekulare Wasserstoffbrücken hinweg. Wegen der ausserordentlichen Bedeutung dieses Problems haben wir infrarotspektroskopische Untersuchungen an Modellen der komplementären Basen der DNS, nämlich 1-Methylthymin/9-Methyladenin (A-T-Modell) und 1-Methylcytosin/9-Äthylguanin (G-C-Modell), durchgeführt; die Kristallstrukturen beider Modelle (1:1-Mischkristalle) sind bekannt^{3,4}.

In beiden Fällen weichen die IR-Spektren der 1:1-Komplexe von denen der mechanischen Mischung ab (Figur 1), wie von KYOGOKU et al.⁵ für den Komplex aus 1-Methylthymin und 9-Methyladenin bereits beschrieben wurde. Die NH-Valenzschwingungsbanden (ν_s in der Nomenklatur von PIMENTEL⁶), haben eine komplexe Struktur mit zahlreichen Submaxima. Diese in starken Wasserstoffbrückensystemen oft beobachtbare Feinstruktur kann verschiedene Ursachen haben: 1. Überlagerung der N-H-

Valenzschwingung ν_s mit Vielfachen der Wellenzahl der niederfrequenten (N-H...N)-Valenzschwingung ν_r ⁶: $\nu = \nu_s \pm n \nu_r$; $n = 0, 1, 2, \dots$ (Frequenzmodulation)^{7,8}; 2. Protonentunneln in Kombination mit der vorstehend genannten Frequenzmodulation, wodurch zusätzliche Aufspaltung der Submaxima erfolgt²; 3. Aufspaltungen durch nächstnachbarliche Kopplung schwingender Gruppen in Festkörpern⁹; 4. FERMI-Resonanz der breiten ν_s mit Kombinations- oder Oberschwingungen.

Eine Entscheidung darüber, ob Protonentransfer und Frequenzmodulation die Feinstruktur der ν_s verursacht, kann durch Vergleich des bei Raumtemperatur aufgenommenen IR-Spektrums mit dem bei tiefen Temperaturen erzielt werden. Das Abkühlen der Probe bewirkt eine Verfestigung der Wasserstoffbrücke, wodurch die Atomabstände verkürzt werden. Die Kraftkonstante und damit auch die Schwingungsfrequenz von ν_s nehmen dabei kleinere Werte an, während Kraftkonstante und Schwingungsfrequenz von ν_r beim Abkühlen anwachsen¹⁰. Darüber hinaus nimmt durch die Abstandsverkürzung in der verfestigten Wasserstoffbrücke die Potentialbarriere zwischen den beiden Potentialminima des Protons ab¹¹, die durch den Tunneleffekt verursachten Aufspaltungen von Schwingungstermen würden somit vergrößert¹². Beim Abkühlen sollten folglich alle Submaxima auf der höher-