

345. Luigi Mamoli und Gerhard Schramm: Über die bakterielle Hydrierung von Androstendion und Testosteron.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 15. September 1938.)

In der Biochemie der Keimdrüsenhormone beansprucht die enzymatische Hydrierung der ungesättigten Wirkstoffe großes Interesse, da diese Reaktion eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung der ungesättigten 3-Oxo-Derivate dieser Reihe zu spielen scheint. So findet man im Harn statt der in der Drüse vorkommenden ungesättigten Wirkstoffe (Testosteron [I], Progesteron) hauptsächlich die hydrierten Verbindungen Androsteron¹⁾ und *epi*-Ätiocholan-diol-(3.17)²⁾ (II) bzw. Pregnandiol³⁾ und *allo*-Pregnandiol⁴⁾. L. Mamoli und A. Vercellone⁵⁾ ist es gelungen, die enzymatische Reduktion männlicher Prägnungsstoffe *in vitro* durchzuführen. Sie fanden, daß gärende Hefe in stände ist, isolierte Carbonylgruppen der männlichen Wirkstoffe zu hydrieren. Einen weiteren Fortschritt in der Erkenntnis der Vorgänge im tierischen Organismus versprach die Untersuchung von A. Ercoli und L. Mamoli⁶⁾, in der die Umwandlung des Androstendions (III) in Ätiocholandion-(3.17) (IV) mit einem Hengsthoden-Extrakt beschrieben wurde. Mit dem gleichen Extrakt beobachtete A. Ercoli⁷⁾ die Bildung von *epi*-Ätiocholandiol (II) aus Testosteron (I). Diese Reduktion wurde von Ercoli⁷⁾⁸⁾ auf die Wirkung einer Hydrase zurückgeführt, die sich im Hoden des geschlechtsreifen Hengstes und des Stieres finden sollte, dagegen nicht im Ovar.

In einer kurzen Mitteilung⁹⁾ wiesen wir bereits darauf hin, daß wir die Annahme eines spezifischen Enzyms der Testikel auf Grund der vorliegenden Versuche für unwahrscheinlich hielten. Wir hatten das Auftreten des *epi*-Ätiocholandioms (II) als Reduktionsprodukt des Androstendions in Fällen beobachtet, bei denen die Entstehung dieses Stoffes zweifellos auf das Vorhandensein von Bakterien zurückzuführen war, so z. B. bei der Einwirkung eines Extraktes aus Schweineovarien auf Androstendion (III). Unser Einwand erschien um so begründeter, da die ersten von Ercoli benutzten Hengsthoden-Extrakte, die unter Mitwirkung des einen von uns in Mailand hergestellt wurden, sicher nicht steril waren.

Um unsere Auffassung zu sichern, haben wir inzwischen die Hydrierung des Androstendions (III) und Testosterons (I) durch Hoden-Extrakte näher untersucht und sind zu dem Ergebnis gekommen, daß für diese Reduktion ausschließlich Fäulnisbakterien verantwortlich sind.

¹⁾ A. Butenandt, *Nature* (London) **130**, 238 [1932] (13. Aug. 1932); K. Tscherning, *Ergebn. Physiol.* **35**, 316 [1933].

²⁾ L. Ruzicka, M. W. Goldberg u. W. Bosshard, *Helv. chim. Acta* **20**, 541 [1937]; A. Butenandt, K. Tscherning u. H. Dannenberg, *Ztschr. physiol. Chem.* **248**, 205 [1937].

³⁾ A. Butenandt, *B.* **63**, 659 [1930]; **64**, 2529 [1931].

⁴⁾ M. Hartmann u. F. Locher, *Naturwiss.* **22**, 856 [1934]; über weitere gesättigte Umwandlungsprodukte der ungesättigten Wirkstoffe und ihre konstitutionellen Beziehungen zueinander vergl. R. E. Marker, *Journ. Amer. chem. Soc.* **60**, 1725 [1938].

⁵⁾ *B.* **70**, 470, 2079 [1937]; *Ztschr. physiol. Chem.* **245**, 93; **248**, 277 [1937].

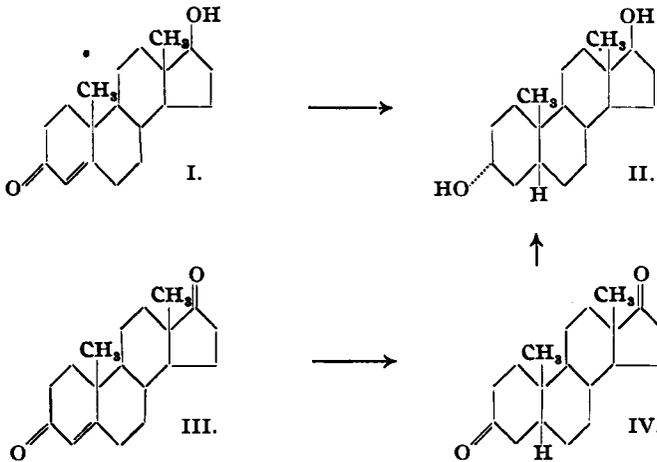
⁶⁾ *B.* **71**, 156 [1938].

⁷⁾ *B.* **71**, 650 [1938].

⁸⁾ *Chim. e Ind. (Milano)* **20**, 349 [1938].

⁹⁾ G. Schramm u. L. Mamoli, *B.* **71**, 1322 [1938].

Wir bereiteten 3 verschiedene Extrakte aus Stierhoden, indem wir das zerkleinerte Gewebe mit chloroform-gesättigtem Wasser, mit toluol-gesättigtem Wasser bzw. mit Wasser allein extrahierten. Diese Lösungen wurden mit Androstendion (III) oder Testosteron (I) im Brutschrank stehengelassen. Die durch Chloroform und Toluol steril gehaltenen Ansätze lieferten das Ausgangsmaterial zurück, während die ohne diese Zusätze hergestellten Extrakte in Fäulnis übergingen, wobei aus Testosteron (I) in guter Ausbeute *epi*-Ätiocholandioldiol (II) und aus Androstendion (III) das Ätiocholandioldiol (IV) entstand.



Gegen diese Versuche könnte man einwenden, daß in den sterilen Ansätzen die „Hydrase“ durch Toluol oder Chloroform gehemmt wird. Um diesen Einwand zu widerlegen, haben wir aus Stierhoden einen Kochsaft bereitet, der nach Zusatz von Androstendion bzw. Testosteron durch 3-maliges Erhitzen im Dampftopf keimfrei gemacht wurde. Von den Fäulnisbakterien der vorigen Ansätze wurde eine Kultur angelegt und damit ein Teil der Lösungen angeimpft, während ein anderer Teil der Ansätze als Kontrolle diente. Die Lösungen wurden 52 Tage im Brutschrank bei 37° gehalten. Während wir aus den sterilen Ansätzen das Ausgangsmaterial unverändert zurück erhielten, wurden in den infizierten Lösungen Testosteron (I) und Androstendion (III) bis zum *epi*-Ätiocholandioldiol (II) hydriert. Daneben wurde etwas Ausgangsmaterial unverändert wiedergefunden, da ein Teil der feingepulverten Substanz sich beim Sterilisieren zusammengeballt hatte und so dem Angriff der Bakterien entzogen wurde. Bei diesen Versuchen war die Wirkung irgendeines Enzyms aus Testikeln ausgeschlossen. Die von Ercoli gegebene Erklärung seiner Versuchsergebnisse durch Annahme einer „Testishydrase“ ist also unrichtig.

Es ist interessant, daß die Hydrierung mit dem von uns benutzten Bakteriengemisch anders verläuft als mit Hefe. Wir finden eine Hydrierung von Ketogruppen neben einer α, β -ständigen Doppelbindung, mit Hefe hingegen wurde bisher die Hydrierung eines konjugierten Systems in der Gruppe der Steroide nicht beobachtet.

Wir danken Hrn. Professor A. Butenandt für die Förderung dieser Arbeit und der eine von uns (L. Mamoli) für die ihm am Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie gewährte Gastfreundschaft. Frä. H. Teschen ist für wertvolle Mitarbeit und der Schering A.-G., Berlin, für die Unterstützung der Untersuchung zu danken.

Beschreibung der Versuche.

Versuche mit Stierhoden-Extrakten.

1200 g Stierhoden wurden mit der Fleischmaschine zerkleinert. Je 400 g des Gewebepulvers wurden mit 1 l Wasser (Lösung A), 1 l chloroform-gesättigtem Wasser (Lösung B) und 1 l toluol-gesättigtem Wasser (Lösung C) vermischt und in einer verschlossenen 2-l-Flasche 48 Stdn. im Brutschrank bei 37° stengelassen. Nach dem Zentrifugieren wurden die klaren Extrakte in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt.

1) *epi*-Ätiocholandioldiol aus Testosteron.

In einer 250-ccm-Flasche wurden 150 mg fein gepulvertes Testosteron mit 200 ccm des Extraktes A, der in Fäulnis übergegangen war, versetzt und das gut verschlossene Gefäß 30 Tage bei 37° aufbewahrt. Nach Filtration des Gemisches wurde der Rückstand in Aceton aufgenommen. Die Acetonlösung wurde nochmals filtriert, um die Bakterien abzutrennen, und eingeeengt. Hierbei krystallisierte *epi*-Ätiocholandioldiol vom Schmp. 231° aus. Die Ausbeute betrug 60%. Das p_H der Lösung nach Beendigung des Versuches war 7.5.

2) Ätiocholandioldiol aus Androstendion.

200 mg Androstendion wurden in genau derselben Weise behandelt. Nach der Aufarbeitung erhielten wir ein Gemisch verschiedener Hydrierungsprodukte, aus dem durch fraktionierte Krystallisation Ätiocholandioldiol abgetrennt werden konnte. Die Lösung hatte nach Beendigung des Versuches das p_H 7.5.

3) Kontrollversuche.

In derselben Weise wie unter 1) wurden je 2 Ansätze mit den Extrakten B und C gemacht. Diese Ansätze gingen nicht in Fäulnis über und lieferten Testosteron bzw. Androstendion quantitativ zurück. Die Lösungen hatten das p_H 6.5.

Versuche mit Kochsaft.

600 g zerkleinerter Stierhoden wurden 1 Stde. mit 1 l Wasser gekocht. Die Lösung wurde dann filtriert, und mit dem Kochsaft wurden folgende Ansätze gemacht:

Zwei 250-ccm-Flaschen mit eingeschliffenen Stopfen wurden mit je 200 mg Androstendion und 200 ccm des Kochsaftes beschickt. Ein gleicher Doppelansatz wurde mit je 200 mg Testosteron bereitet. Die Lösungen wurden $\frac{1}{2}$ Stde. an 3 verschiedenen Tagen im Dampftopf sterilisiert. Jeweils einen der Ansätze mit Androstendion und Testosteron impften wir mit Bakterien an, die aus Vers. 2) stammten und auf steriler Stierhodenbrühe weitergezüchtet waren. Die infizierten Lösungen und die Kontrollen wurden

52 Tage bei 37° aufbewahrt. Die zum Animpfen benutzten Bakterien stellen ein Gemisch verschiedener Fäulnisbakterien dar, unter denen eine besondere Form nicht vorherrscht.

Die Aufarbeitung der infizierten Versuche geschah wie oben. Der nach dem Einengen der Acetonlösung verbliebene Rückstand wurde aus Aceton umkristallisiert. Sowohl Testosteron als auch Androstendion waren zu 25% in *epi*-Ätiocholandioldi umgewandelt. Der Rest war aus den im allgemeinen Teil angegebenen Gründen unverändert geblieben. Die Lösungen hatten am Ende des Versuches ein p_H von 7 bzw. 7.6.

Bei der Aufarbeitung der sterilen Kontrollen erhielten wir das Ausgangsmaterial (Androstendion bzw. Testosteron) quantitativ zurück. Das p_H der Kontrollen betrug 6.35.

346. Eugen Bamann und Marianne Meisenheimer: Umwandlung von Metaphosphat in Orthophosphat unter dem Einfluß von Metall-oxiden und Hydroxyden (III. Mitteil. über „phosphatatische“ Wirkungen von Hydrogelen).

[Aus d. Pharmazeut. Abteil. d. Chem. Instituts d. Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 3. September 1938.)

Eine Reihe von Metallhydroxyden, insbesondere Hydroxyde der seltenen Erden, besitzen die Fähigkeit, die Spaltung von Estern der Phosphorsäure zu katalysieren. Diese Beobachtung sowie das Ausmaß der Ester-spaltung und einige dabei erkannte Gesetzmäßigkeiten haben wir in den beiden vorausgehenden Mitteilungen beschrieben¹⁾.

Das Bild eines Phosphatase-Modells wäre noch vollständiger, wenn sich die „phosphatatische“ Wirkung auch auf die Metaphosphorsäure erstrecken würde. Bekanntlich bildet die tierische und pflanzliche Zelle Enzyme, die die Überführung von anorganischem Metaphosphat in Orthophosphat bewirken.

Diese Umwandlung der Metaphosphorsäure geht nun in der Tat, wie wir in dieser Abhandlung zeigen werden, auch unter dem katalytischen Einfluß einer größeren Anzahl von Hydroxyden und Oxyden vor sich.

1) Versuchsanordnung.

Die Versuchsansätze von 10 ccm enthielten 0.051 g $(NaPO_3)_3 + 6H_2O$ ²⁾ (entspr. 26.4 mg P_2O_5), 1 ccm 2.5-n-Ammoniak-Ammoniumchloridpuffer³⁾ vom p_H 9.2. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser auf 9 ccm ergänzt und im Thermostaten auf 37°

¹⁾ B. 71, 1711, 1980 [1938].

²⁾ Das Natriumtrimetaphosphat-Präparat erhielten wir in freundlicher Weise von den Chemischen Werken, vorm. H. u. E. Albert, A.-G., Amöneburg bei Wiesbaden-Biebrich, wofür wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

³⁾ C. Oppenheimer u. L. Pincussen, „Die Methodik der Fermente“, Gg. Thieme, Leipzig 1929, S. 615.