

sei auch auf die sich dabei ergebenden Möglichkeiten hingewiesen, einerseits den Einstell- und Relaxationsvorgang an Hand des Effektes zeitlich zu verfolgen oder andererseits – bei polydispersen Systemen – durch Wahl geeigneter Zeiten die längsten Molekeln von der Orientierung fernzuhalten. Jedenfalls sind mit elektronischen Hilfsmitteln solche Messungen grundsätzlich möglich. Schwieriger ist allerdings abzuschätzen, wie weit unübersichtliche Nebeneffekte, wie thermisch bedingte Brechungserscheinungen oder andere, nicht voraussehbare Störungen die Messbarkeit beeinträchtigen werden.

Die Untersuchung wurde während der Tätigkeit an einem durch den Schweiz. Nationalfonds finanzierten und von *R. Signer*, *H. Nitschmann* und *A. Hässig* geleiteten Proteinforschungsprojekt an der Universität Bern ausgeführt. Wir danken den erwähnten Herren für ihr Interesse.

SUMMARY.

1. An attempt is made to calculate the changes in intensity of scattered light due to partial orientation, when the scattering particles are rod-shaped dipoles in an electric field. For the case in which the direction of the field is identical with the median between the direction of the incident beam and the direction of observation, the relative decrease in intensity of the scattered light will be $s^2 \kappa^2 / 270$. For the case in which the field is perpendicular to the median (i.e., in the "mirrorplane"), a relative increase of intensity of $s^2 \kappa^2 / 540$ will result;

$$s = 2 \pi (L/\lambda) \sin \theta / 2, \quad \kappa = D E / k T.$$

2. The expected orders of magnitude of the effect in the case of a protein are mentioned and some general principles of its measurement are considered.

Bern, Theodor-Kocher-Institut.

226. Konjugation und Oxydation von Gallensäuren in Rattenleberhomogenaten.

Gallensäuren und Steroide, 16. Mitteilung¹⁾

von **Urs Gloor**.

(3. IX. 54.)

Im Zusammenhang mit Arbeiten über die Umwandlungen von Gallensäuren und Sterinen im Tierkörper wurde in unserem Institut versucht, mit Hilfe von Schnitten und Homogenaten aus Rattenlebern die einzelnen Reaktionen etwas näher zu studieren. In vivo²⁾

¹⁾ 15. Mitt. *S. Bergström & U. Gloor*, Acta Chem. Scand., **8**, 1373 (1954).

²⁾ *S. Bergström, M. Rottenberg & J. Sjövall*, Z. physiol. Ch. **295**, 278 (1953).

ebenso wie *in vitro*¹⁾²⁾³⁾ wurde gezeigt, dass bei Ratten Desoxycholsäure durch 7α -Hydroxylierung und Konjugation mit Taurin zu Taurocholsäure oxydiert werden kann.

Bei diesen Umwandlungen muss man die erwähnte Hydroxylierung und die ebenfalls eintretende Konjugation der Säuregruppe mit Taurin bzw. Glycin auseinanderhalten. Der vorliegende Artikel befasst sich mit Vorarbeiten für Untersuchungen über die 7α -Hydroxylierung, die uns einen Anhaltspunkt über die Verhältnisse zwischen Enzymsystem und Substrat gegeben haben. Die Einflüsse verschiedener Reaktionsprodukte und anderer zugesetzter Verbindungen wurden ebenfalls untersucht.

I. Stoffwechsel von freien Gallensäuren in Rattenleberhomogenaten. Folgende, am Kohlenstoffatom 24 mit ^{14}C markierte Gallensäuren standen zur Verfügung: Cholsäure, Desoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure und Lithocholsäure⁴⁾. Zur Darstellung der Homogenate vergleiche¹⁾.

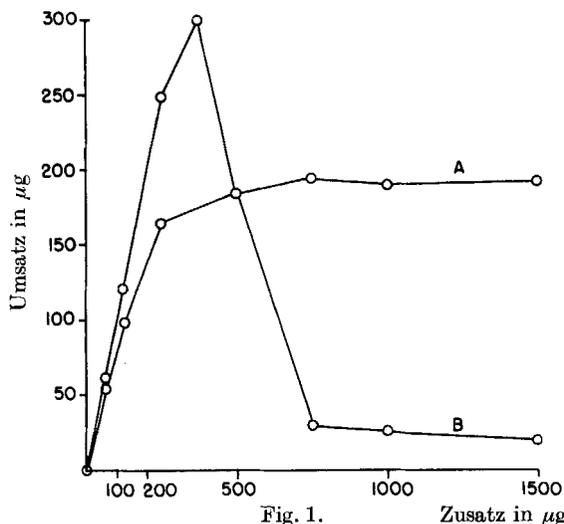


Fig. 1.

Kapazitätskurven für die Umwandlung von a) Cholsäure, b) Desoxycholsäure. 2 ml Rattenleberhomogenat pro Ansatz (entsprechen 800 mg Leberfrischgewicht). pH = 7,5; 2 Std.; 37°; in Luft.

In einer ersten Serie von Experimenten wurden steigende Mengen freier Gallensäuren zu einer gleichbleibenden Menge von Rattenleberhomogenat zugegeben; nach einer bestimmten Zeit wur-

¹⁾ S. Bergström & U. Gloor, Acta Chem. Scand. **8**, 1373 (1954).

²⁾ S. Bergström, A. Dahlquist & U. Ljungqvist, Kungl. Fysiogr. Sällsk. i Lund Förh. **23**, 12 (1953).

³⁾ S. Bergström & U. Gloor, Proceedings Swedish Bioch. Soc., Acta Chem. Scand. **8**, 1109 (1954).

⁴⁾ S. Bergström, M. Rottenberg & J. Voltz, Acta Chem. Scand. **7**, 481 (1953).

den die umgesetzten Mengen der Gallensäuren gemessen. Die umgesetzten Säuren bestehen hier sowohl aus nur konjugierten, als auch aus konjugierten und hydroxylierten Säuren, d. h. sie entsprechen der Gesamtheit der irgendwie veränderten Ausgangsprodukte. Fig. 1 zeigt den typischen Verlauf solcher Umsatzkurven für A) Cholsäure und B) Desoxycholsäure. Die Menge der zugesetzten Säure, die dem höchsten Punkt der Kurve bzw. dem Beginn des Plateaus entsprach, wurde als diejenige Menge angenommen, die von der entsprechenden Homogenatmenge ohne Hemmerscheinungen verändert werden kann. Diese Menge wurde als Kapazität bezeichnet und in mg umgewandelte Gallensäuren pro 100 g Leberfrischgewicht (mg %) ausgedrückt.

Tab. 1 gibt Auskunft über die Kapazität von Rattenleberhomogenaten in Bezug auf die Umwandlung der verschiedenen Säuren.

Tabelle 1.

Kapazität von Rattenleberhomogenat für den Umsatz von freien Gallensäuren zu entsprechenden und höher oxydierten Taurin-Konjugaten.

(Inkubationsansätze 100–250 γ Gallensäure pro 2 ml; Homogenat entsprechend ca. 350 mg Leberfrischgewicht; 2 Std., 37°; pH = 7,5. Gasphase: Luft)

Zugesetzte Gallensäure	Kapazität in mg% von Leberfrischgewicht
Cholsäure (3 α , 7 α , 12 α -Trioxycholansäure)	70 \pm 10
Desoxycholsäure (3 α , 12 α -Dioxycholansäure)	30 \pm 10
Chenodesoxycholsäure (3 α , 7 α -Dioxycholansäure)	20 \pm 10
Lithocholsäure (3 α -Oxycholansäure)	40 \pm 10

Diese Ergebnisse bedeuten, dass für die Gallensäuren mit weniger als 3 Hydroxylgruppen im Sterinskelett die Konzentration in den Versuchen nicht über 20 mg % gesteigert werden darf, wenn man jegliche ins Gewicht fallende Hemmwirkung der entstehenden Reaktionsprodukte sicher ausschliessen will. Mit anderen Worten, das Verhältnis Gallensäuren : Gewebe soll nicht grösser als 1 : 5000 sein.

Anders sind die Verhältnisse bei der Bebrütung von Cholsäure, die 3 Hydroxylgruppen besitzt und die als Endprodukt im Stoffwechsel angesehen wird. Kurve A in Fig. 1 zeigt das Bild eines typischen Versuches. Nach Zusatz von ungefähr 70 mg % Cholsäure erreicht die Kurve ein Plateau. Bei Zugabe weiterer Cholsäure tritt keine Hemmung, aber auch keine Vermehrung des Umsatzes ein. Die Reaktionsprodukte sind hier ca. 95 % Tauro- bzw. 5 % Glycocholsäure. Der begrenzende Faktor, der dieses Plateau entstehen lässt, ist nicht die Verfügbarkeit von Taurin bzw. Glycin, da gezeigt werden konnte, dass angebotenes Taurin zum Aufbau von Taurocholsäure verwendet wird¹⁾, und dass trotz Angebot einer genügenden Menge der Umsatz nicht weiter ansteigt.

¹⁾ J. Bremer, Acta Chem. Scand., im Druck.

Die Zeitkurve für die Konjugation von Cholsäure in Homogenaten zeigt, dass innerhalb von 20 Min. ein Plateau erreicht wird und nachher keine konjugierten Säuren mehr aufgebaut werden.

Um den Einfluss von Fettsäuren sowohl auf die Konjugation wie auch auf die Hydroxylierung zu studieren, wurde freie Desoxycholsäure mit Leberhomogenat in Gegenwart steigender Mengen Ölsäure inkubiert (1 bis 8 Mol Ölsäure per Mol Gallensäure, entsprechend 8–350 μ Mol/l). Während die Konjugation nicht gehemmt wurde, erschien die Oxydation zu Taurocholsäure um ca. 50% gehemmt.

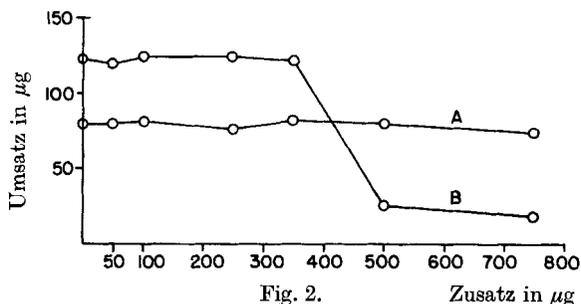


Fig. 2. Einfluss der Reaktionsprodukte auf den Umsatz von freier Desoxycholsäure. Rattenleberhomogenat je 2 ml pro Ansatz (entsprechen 800 mg Leberfrischgewicht). 2 Std.; 37°; n Luft; pH = 7,5. Pro Ansatz 125 μ g radioaktive Desoxycholsäure und steigende Mengen a) inaktive Taurocholsäure bzw. b) Taurodesoxycholsäure.

Der Einfluss von Taurodesoxychol- und Taurocholsäure wurde ebenfalls untersucht, da es ja denkbar wäre, dass ein Überschuss dieser Reaktionsprodukte, der nicht aus dem System entfernt werden kann, hemmend wirkt. Es zeigte sich denn auch (Fig. 2), dass bei einer gewissen Konzentration von Taurodesoxycholsäure der weitere Umsatz (sowohl Konjugation als auch Hydroxylierung) stark unterdrückt wird, während bei Zugabe von Taurocholsäure eine solche Hemmung innerhalb der geprüften Konzentration nicht auftrat.

II. 7 α -Hydroxylierung. Um die Hydroxylierung des Steringerüsts in 7 α -Stellung besser studieren zu können, wurde Taurodesoxycholsäure-24-¹⁴C als Substrat verwendet¹⁾. Die mit der Konjugation zusammenhängenden Fragen wurden so ausgeschaltet, und als alleinige Reaktion blieb die enzymatische Hydroxylierung übrig. Auch hier wurde zuerst mit einem Phosphat-Puffer/Saccharose-System²⁾ als Homogenisierungsmedium gearbeitet, während später ein System nach *Bucher*³⁾ Verwendung fand.

¹⁾ Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Dr. *Arne Norman* für die Überlassung von radioaktiver Taurodesoxycholsäure nochmals bestens danken.

²⁾ *S. Bergström & U. Gloor*, Acta Chem. Scand., **8**, 1373 (1954).

³⁾ *N. L. R. Bucher*, Am. Soc. **75**, 498 (1953); *I. D. Frantz jr. & N. L. R. Bucher*, J. Biol. Chem. **206**, 471 (1954).

Ein Vergleich von Leberschnitten und Leberhomogenat zeigte ungefähr den gleichen Umsatz von ca. 6 mg Gallensäure pro 100 g Leber. Eine Zeitkurve ergab wie früher für Desoxycholsäure¹⁾ ein Plateau in der Umsetzung nach ca. 30 Min. Ein von dem Verhalten der nicht konjugierten Säuren ganz verschiedenes Bild ergab sich aber in bezug auf die Kapazität der Homogenate. Weder erreicht die Kurve (siehe Fig. 3) ein Plateau, noch wird in den untersuchten Konzentrationen eine ausgeprägte Hemmung sichtbar. Es zeigt sich im Gegenteil, dass, je grösser die zugesetzte Menge ist, desto grösser auch die umgewandelte Menge wird. Immerhin konnte kein linearer Anstieg beobachtet werden.

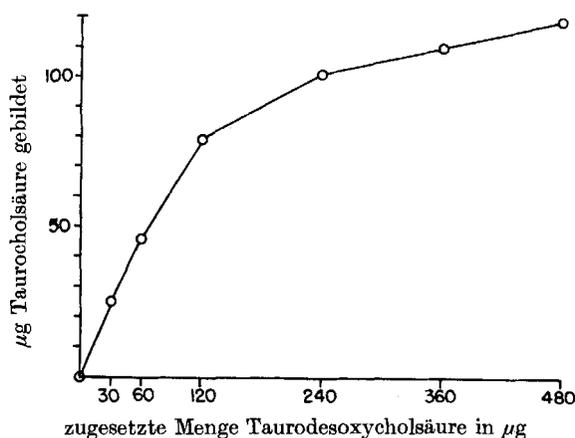


Fig. 3.

Kapazitätskurve für die Hydroxylierung von Taurodesoxycholsäure in Rattenleberhomogenat. 1 ml entspricht 500 mg Leberfrischgewicht pro Ansatz. 2 Std.; 37°; pH = 7,5; in Luft.

Die pH-Kurve für die Hydroxylierung zeigt ein Maximum bei pH = 7,5 ± 0,2, während bei pH = 6 oder 9 praktisch kein Umsatz mehr stattfindet.

Die Konzentration des Homogenates (Leberfrischgewicht pro ml zugegebenes Homogenisierungsmedium) ist ohne Einfluss auf die Umsetzung, solange sich diese Konzentration in den Grenzen zwischen 15 und 50% hält. Es wurde für alle Versuche 35-proz. Homogenat verwendet.

Ein Zusatz von Rattenblutserum derart, dass sowohl das Inkubationsvolumen als auch die Lebermenge konstant blieben, bewirkte einen abnehmenden Umsatz mit zunehmender Serummenge (Fig. 4). Dieser Effekt könnte wohl durch eine teilweise Bindung von Substrat an Proteine erklärt werden und wurde nicht weiter untersucht.

¹⁾ S. Bergström & U. Gloor, Acta Chem. Scand., 8, 1373 (1954).

Ein Zusatz steigender Mengen unmarkierter, freier Desoxycholsäure zu Inkubationsmischungen, die schon markierte Taurodesoxycholsäure enthielten, vermochte die Menge der gebildeten markierten Cholsäure nicht zu beeinflussen. Es ist darum anzunehmen, dass keine Konkurrenz zwischen freier und taurinkonjugierter Desoxycholsäure eintritt in bezug auf das hydroxylierende Enzymsystem. Dies könnte als Andeutung dafür gelten, dass nur konjugierte Gallensäuren oxydiert werden, nicht aber freie. Schon früher¹⁾ wurde dies anhand der Reaktionsgeschwindigkeit wahrscheinlich gemacht.

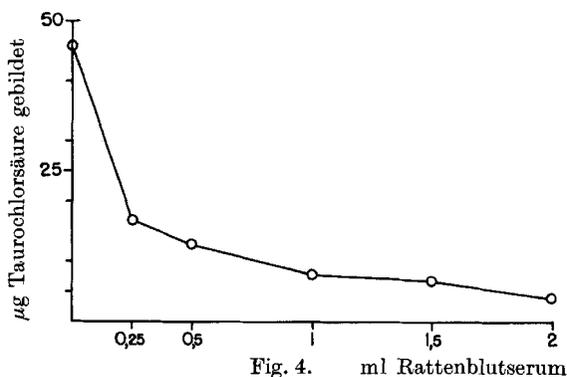


Fig. 4. Einfluss von Zusatz von Rattenblutserum auf die Hydroxylierung von Taurodesoxycholsäure in Rattenleberhomogenat (2 ml entsprechen 600 mg Leberfrischgewicht pro Ansatz). Inkubiert mit 50 µg Taurodesoxycholsäure-24-¹⁴C. 2 Std.; 37°; pH = 7,5; in Luft.

Icteroenin²⁾, eine Substanz, die aus *Lippia Rehmanni* Pears³⁾ isoliert wurde, prüften wir auf ihren Einfluss auf die 7 α -Hydroxylierung von Taurodesoxycholsäure. In Konzentrationen, die denjenigen entsprechen, die in vivo einen Effekt erzielen (1–10 mg pro 100 g Lebergewicht), hatte diese Substanz keinen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion⁴⁾.

Über weitere Versuche zur Aufteilung der Homogenate in verschiedene Fraktionen und über die Bestimmung verschiedener Zusätze zur Erhöhung der Aktivität wird in einer weiteren Arbeit berichtet werden⁵⁾.

Experimentelles. Die Rattenleberhomogenate wurden dargestellt wie in ¹⁾ beschrieben. Nach der Bebrütung (normalerweise 2 Std. bei 37° mit Luft als Gasphase) wurde mit der fünffachen Menge Alkohol versetzt zur Fällung der Proteine. Dann wurde

¹⁾ S. Bergström & U. Gloor, Acta Chem. Scand., **8**, 1373 (1954).

²⁾ Herr Prof. Dr. C. Rimington, Dep. Chem. Pathology, University College Hospital, London W. C. 1, hat uns Icteroenin zur Verfügung gestellt, wofür ihm auch hier bestens gedankt sei.

³⁾ C. Rimington, J. I. Qvin & G. C. S. Roets, Onderstepoort J. of Veterin. Sc. and Animal Ind. **9**, 225 (1937).

⁴⁾ Die Prüfung von Icteroenin wurde durch Herrn Dr. C. E. Dent, Medical Unit, University College Hospital, London W. C. 1, angeregt.

⁵⁾ S. Bergström & U. Gloor, Acta Chem. Scand., im Druck.

filtriert, das Filtrat eingedampft (Badtemperatur höchstens 50°) und in einer geeigneten Menge 70-proz. Alkohol aufgenommen. Ein aliquoter Teil, entsprechend ca. 1000 counts per min., wurde ohne weitere Reinigung papierchromatographiert¹⁾. Auf den entwickelten und getrockneten Papierchromatogrammen wurden mittels eines speziell konstruierten *Geiger-Müller-Zählrohres* die radioaktiven Flecken quantitativ ausgewertet²⁾. Es soll speziell noch einmal darauf hingewiesen werden, dass bei der Herstellung von Homogenaten, mit denen diese Hydroxylierung ausgeführt werden soll, jede Anwendung von Druck irgendwelcher Art (Gewebepresse, dicht sitzender Homogenisator) vermieden werden muss.

SUMMARY.

The capacity of rat liver homogenates for the metabolism of different free bile acids has been established. The inhibition by different substances is discussed. Some conditions for the 7 α -hydroxylation of tauro-desoxycholic acid have also been investigated.

Ich danke Herrn Prof. Dr. *Sune Bergström* für die Unterstützung und die wertvollen Anregungen und Diskussionen zu dieser Arbeit.

Diese Arbeit ist von „*Statens Medicinska Forskningsrad*“, „*Knut och Alice Wallenbergs Stiftelse*“ und „*Magn. Bergvalls Stiftelse*“ unterstützt worden, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Lund,
Schweden.

227. Die Isolierung von 3 α ,17 α ,21-Trioxo-pregnanon-(20) (THS) aus menschlichem Harn

von J. P. Rosselet, L. Overland, J. W. Jailer und S. Lieberman.

(7. IX. 54.)

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Ausscheidung von Nebennierenrinden-Hormonen und ihrer Umwandlungsprodukte im Urin wurde in solchem von zwei Patientinnen mit *Cushing's* Syndrom ein neues reduzierendes Steroid isoliert und als 3 α ,17 α ,21-Trioxo-pregnanon-(20), das Tetrahydro-Derivat von *Reichstein's* Substanz S (THS), charakterisiert. Über die Isolierung dieser Substanz aus menschlichem Harn ist kürzlich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet worden.

Nach oraler Verabreichung von 2,4 g (800 mg/Tag) 17 α ,21-Dioxy-pregnanon-(3,20) (Dihydro-Derivat von Substanz S) isolierten *Ungar* und Mitarbeiter³⁾ aus dem Urin einer 66jährigen Frau mit Gelenkrheumatismus 1,5 mg THS. Auf die Anwesenheit dieser Substanz im Urin einer Patientin mit Nebennieren-Carcinom wurde von *Touchstone*

¹⁾ *J. Sjövall*, Acta Chem. Scand. **8**, 339 (1954).

²⁾ *S. Bergström & U. Gloor*, Acta Chem. Scand. **8**, 1373 (1954).

³⁾ *F. Ungar, J. W. Davis, H. Rosenkrantz & R. I. Dorfman*, J. Biol. Chem. **207**, 375 (1954).