

158. Über die adrenale Steroid-Biosynthese *in vitro* I. Umwandlung endogener und exogener Vorstufen im Nebennieren-Homogenat des Rindes

von F. W. Kahnt und R. Neher

(8. VII. 1965)

1. Einleitung. – Seit längerer Zeit benützen wir die Enzyme in Nebennieren-homogenaten, um die *in-vitro*-Biosynthese der Corticosteroide aus endogenen und exogenen Vorstufen nach verschiedenen Problemstellungen hin zu untersuchen.

War ursprünglich beabsichtigt, grössere Mengen des damals noch sehr schwer zugänglichen Cortisols (Hydrocortison) aus seiner 11-Desoxyverbindung (REICHSTEIN'S Substanz S) herzustellen [1], später die Ausbeute von Aldosteron [2] oder anderen 18- und 19-hydroxylierten Steroiden [3] in Nebennieren durch Umwandlung endo- oder exogener Vorstufen zu erhöhen, so rückte hierauf das Interesse am Biosyntheseweg von verschiedenen Steroiden, wie Aldosteron [4] [5], 16-hydroxylierten Pregnenderivaten [6] bzw. Dehydroepiandrosteron [7] in den Vordergrund, ebenso wie die Bedeutung der Nebennierenfunktion unter pathologischen Bedingungen [8].

Schliesslich verwendeten wir die Biogenese-Kapazität von Rinder-Nebennieren-homogenaten, um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Steroidgenese zu untersuchen. Auszugsweise haben wir über einige dieser Resultate berichtet [9] [10], ohne jedoch auf die im Laufe der Jahre weiterentwickelte Methodik näher einzugehen. Die vorliegende Arbeit fasst sich daher in erster Linie mit den erprobten Methoden und den für die Corticosteroid-Biosynthese unseres Systems wichtigen endogenen und exogenen Vorstufen. Über Untersuchungen mit Stoffen, welche diese Biosynthese, insbesondere aus endogenen Vorstufen, auf verschiedene Weise zu hemmen oder zu aktivieren vermögen, wird später berichtet werden.

2. Methodik und Versuchsbedingungen. – Um Hemmeffekte zahlreicher Substanzen deutlich erfassen zu können, benötigten wir ein leistungsfähiges, für Routineuntersuchungen brauchbares System.

Nach längeren Vorversuchen mit Schnitten bzw. Homogenaten von Rinder-, Schweine- und Ratten-Nebennieren erwies sich für unsere Zwecke die Verwendung von Nebennieren-Homogenaten von Kühen als am vorteilhaftesten. Diese *in-vitro*-Methode beruht auf der Bestimmung der einzelnen Corticosteroide, welche bei der aeroben Inkubation von frischem Gewebekomogenat aus vorhandenen Vorstufen enzymatisch gebildet werden (vgl. hierzu die älteren Literaturangaben in [1] und [11]). Wir verwendeten jeweils das Homogenat der Nebennierenrinden mehrerer Tiere für Serien zu 12 Ansätzen mit je 5 g Gewebe, die unter identischen Bedingungen in Pufferlösung mit den nötigen Cofaktoren und gegebenenfalls exogenen Vorstufen oder sonstigen Zusätzen unter Durchleitung von Sauerstoff inkubiert wurden. Zwei der 12 Ansätze dienten als Kontrollinkubate, auf welche für die Auswertung der übrigen inkubierten Ansätze Bezug genommen wurde. Einen weiteren Ansatz arbeitete man

ohne Inkubation sofort auf, um den Steroidgehalt des Gewebes zu ermitteln. Der Steroidgehalt der Kontrollinkubate betrug das 10- bis 30fache der ursprünglichen Gewebekonzentration (s. Vermehrungsfaktoren in Tab. 3).

Nach dem im Experimentellen Teil genau beschriebenen Verfahren wurden die Inkubate extrahiert und entfettet, die gereinigten Extrakte mehrfach auf Papier chromatographiert und die wichtigsten Steroide mit Farb- und Fluoreszenz-Reaktionen halbquantitativ ($\pm 20\%$) bestimmt. Die Identifizierung erfolgte auf Grund unserer früheren ausgedehnten Arbeiten mit Nebennierenextrakten [12-17] chromatographisch, kombiniert mit Derivatbildung, in eindeutiger Weise. Diese routinemässige Bestimmung erfasste 11-Desoxycorticosteron (DOC), Corticosteron (B)¹⁾ mit 11-Dehydrocorticosteron (A)¹⁾, 11-Desoxycortisol (REICHSTEIN's Substanz S), Cortisol (F)¹⁾ mit Cortison (E)¹⁾, Aldosteron, 19-Hydroxycorticosteron und 18-Hydroxycorticosteron; letzteres wegen seiner Labilität nur qualitativ. B und A sowie F und E wurden üblicherweise gemeinsam bestimmt, da die 11-Keto-Verbindungen A bzw. E nur Folgepunkte von B bzw. F sind und weniger als 10% der letzteren ausmachten. In speziellen Fällen, in welchen das Gleichgewicht 11β -Hydroxy- \rightleftharpoons 11-Keto-Verbindungen interessierte, wurden sie einzeln bestimmt. Die Bildung dieser Steroide bzw. ihre absolute wie relative Ausbeute diente uns als Mass für das Funktionieren der einzelnen Biosynthesestufen bzw. ihrer zugehörigen Enzyme (Biosyntheschema siehe nächsten Abschnitt): Die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ -Isomerase sowie die 21-Hydroxylase sind für die Bildung aller bestimmten Steroide nötig; die 17α -Hydroxylase für F, E und S, die 11β -Hydroxylase für B, A, F, E, Aldosteron, 19-Hydroxy-B und 18-Hydroxy-B, die 19-Hydroxylase für 19-Hydroxy-B, die 18-Hydroxylase für 18-Hydroxy-B und Aldosteron, und schliesslich die 18-Hydroxysteroid-Dehydrogenase für Aldosteron.

Wir gingen von einem Homogenat der in Tab. 1 wiedergegebenen Zusammensetzung und von einem Inkubationsverfahren (System I) aus, welches bereits eine Weiterentwicklung des ursprünglich verwendeten [1] darstellte, und dessen Parameter aus Tab. 1 und 2 hervorgehen. Durch Variation der Versuchsbedingungen wurde schliesslich unter besonderer Berücksichtigung der Aldosteron-Bildung ein *neues*,

¹⁾ Bezeichnung nach KENDALL; die übrigen hier verwendeten Abkürzungen bedeuten:

NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduzierte Form des NAD
AMP	Adenosinmonophosphat
3', 5'-AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Cortisol (F)	Pregn-4-en-11 β , 17, 21-triol-3, 20-dion
Cortison (E)	Pregn-4-en-17, 21-diol-3, 11, 20-trion
REICHSTEIN's Substanz S	Pregn-4-en-17, 21-diol-3, 20-dion
Corticosteron (B)	Pregn-4-en-11 β , 21-diol-3, 20-dion
11-Dehydrocorticosteron (A)	Pregn-4-en-21-ol-3, 11, 20-trion
11-Desoxycorticosteron (DOC)	Pregn-4-en-21-ol-3, 20-dion
Aldosteron	Pregn-4-en-11 β , 21-diol-18-al-3, 20-dion (18 \rightarrow 11 β Hemiactal)
Pregnenolon	Pregn-5-en-3 β -ol-20-on

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Inkubate und ihrer Komponenten*

	A) Homogenat ^{a)}		B) Inkubationslösung		C) Inkubat (1 Vol. A + 1 Vol. B)	
	Systeme I und II		Syst. I ^{c)}	Syst. II ^{d)}	Syst. I	Syst. II
	mMolar		mMolar	mMolar	mMolar	mMolar
Saccharose	114		–	–	57	57
NaCl	354		62	62	49	49
KCl	14,3		25	25	20	20
Na ₂ HPO ₄	11,4 ^{b)}		20	–	16	8
NaHCO ₃	–		–	20 ^{e)}	–	10
Kaliumfumarat	–		40	40	20	20
MgSO ₄	–		4,7	8,0	2,4	4,0
	Syst. I	Syst. II				
	mMolar					
ATP	3	–	–	–	1,15	–
NAD	16 × 10 ⁻²	–	–	–	8 × 10 ⁻²	–
NADH	9 × 10 ⁻²	–	–	–	4,5 × 10 ⁻²	–
NADP	4,4 × 10 ⁻²	–	–	86 × 10 ⁻²	2,2 × 10 ⁻²	43 × 10 ⁻² f)
% Frischgewebe	29,4	29,4	–	–	14,7 g)	14,7 g)
% Gewebe-Trocken- substanz	4,5	4,5	–	–	2,3	2,3

a)

Unter Einbeziehung des Frischgewebe-Gewichtes als Volumenteil Wasser;

b)

Erhöht das pH auf 8,1–8,2; es sinkt während der Homogenisation rasch ab und wird auf 6,9–7,1 gehalten;

c)

pH 7,0;

d)

pH 8,2; vor Gebrauch mit Oxycarbon begast, pH 7,4;

e)

Zugabe erst unmittelbar vor der Vorbegasung mit Oxycarbon;

f)

Entspricht 12 mg NADP BÖHRINGER;

g)

Entspricht 5 g Gewebe auf 34 ml.

Tabelle 2. *Parameter der Inkubation*

	System I	System II
Na ⁺ /K ⁺ -Verhältnis (molar) ^{a)}	1,22	1,17
Ionenstärke, I/2	0,193	0,171
Isotoniefaktor (0,9% NaCl = 1)	0,98	0,885
pH	6,9–7,2 ^{b)}	7,1–7,2
Gasphase (0,5 l/Min., 2 Std.)	Sauerstoff	Oxycarbon (95% O ₂ + 5% CO ₂)

a) in Nebennierenrinde 1,06; b) laufend korrigiert.

vereinfachtes Verfahren (System II, Tab. 1 und 2) entwickelt, welches eine *gute durchschnittliche Biogenese aller uns interessierenden Corticosteroide* erlaubt (Tab. 3).

Im folgenden werden zunächst kurz die wichtigsten Faktoren diskutiert, welche bei gegebener Enzym- und Vorstufen-Konzentration und unter Berücksichtigung von molekularem Sauerstoff und NADPH als obligatorische Bestandteile [11] [18–22] für die Umwandlung der zunächst unbekanntesten Vorstufen eine Rolle spielen.

Tabelle 3. Ausbeute der Corticosteroide (Endprodukte) durch aerobe Inkubation der endogenen Vorstufen in Rinder-Nebennierenrinden-Homogenat
(μg Steroid/g Gewebe^{a)})

Steroide ^{b)}	Ohne Inkubation	System I	Vermehrungs-faktor	System II	Vermehrungs-faktor
F + E	6	20–70	4–12	40–200	7–33
B + A	6	15–35	3–7	50–200	10–34
Aldosteron	<0,2	~ 0,6–2,0	>3–10	0,7–2,3	> 4–12
18-Hydroxy-B	<0,2	~ 0,6–1,8	>3–9	~ 0,7–2,3	> 4–12
19-Hydroxy-B	<0,2	0,7–2,3	>4–12	0,9–3,0	> 5–15

^{a)} Unkorrigierte Werte; über die Wiedergewinnungsrate der einzelnen Steroide s. Exp. Teil. Innerhalb der Serien von je 12 Ansätzen waren die Werte gut reproduzierbar, da homogenes Gewebe verwendet wurde. Von Serie zu Serie können die Steroid-Ausbeuten je nach Gewebequalität, Jahreszeit usw. erheblich schwanken. Es sind auch Wechselbeziehungen zwischen der Konzentration einzelner Steroide möglich (s. Text).

^{b)} S und DOC stellen normalerweise Zwischenprodukte dar, die sich bei der Inkubation nicht anreichern und deshalb auch nicht in Erscheinung treten.

2.1. Rinder-Nebennierengewebe (Kuh). Die Verwendung *schlachtfrischer Drüsen* erwies sich als unumgänglich. Gefrieren oder Lyophilisieren führte in erster Linie zu einem Abfall der Endprodukte Aldosteron und Cortisol und einem Anstieg der Zwischenprodukte DOC und S. Auf den ungünstigen Einfluss des Gefrierens auf die Aktivität der 17 α -Hydroxylase haben auch kürzlich YOUNG *et al.* [23] hingewiesen. Ebenso beeinträchtigte eine mehrstündige Alterung des frischen Gewebes oder seines Homogenates bei 0° zuerst die Bildung von Aldosteron und Cortisol. Homogenatfraktionen oder Aceton-Trockenpulver sind der endogenen Vorstufen meist beraubt und eignen sich deshalb nur für Umwandlungen exogener Steroid-Vorstufen.

Zwischen ganzen Nebennieren und Nebennieren-Rinde war in der absoluten Steroidbildung pro g Rindengewebe kein erheblicher Unterschied festzustellen; auch Catecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin, zeigten in einer Konzentration von 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keinen Einfluss. COOPER und Mitarbeiter [24] haben damit allerdings einen erhöhten Einbau von exogenem Progesteron in 17-Hydroxycorticosteroide erzielen können. Dies ist insofern mit unseren Ergebnissen vergleichbar, als wir das Verhältnis der 17-Hydroxycorticosteroide F + E zu den 17-Desoxycorticosteroiden B + A in Gegenwart der *Medulla* von ca. 1 auf 1,5 verschoben fanden. Unter diesem Gesichtspunkt dürften auch die Unterschiede zwischen *rechter* (nierenförmiger) und *linker* (herzförmiger) *Mark-reicherer* Nebenniere zu deuten sein; das F/B-Verhältnis mit letzterer war höher (1,5). In anderer Hinsicht verhielten sie sich jedoch ähnlich. Da sich, statistisch betrachtet, ein grösseres F/B-Verhältnis auf die Aldosteronbildung ungünstiger auswirkte als ein kleineres, und da die *Medulla* zusätzliche Unsicherheiten, wie beschleunigte Aktivitätsabnahme, in das System brachte (vgl. hierzu [72] [73], verwendeten wir *rutinemässig* nur noch Nebennierenrinde (mehrerer Tiere), um besser reproduzierbare Werte zu erhalten. Auch so traten von Serie zu Serie noch erhebliche Schwankungen in den Steroidausbeuten auf (s. Tab. 3), die auf der unterschiedlichen Qualität des Tiermaterials beruhten, auf welches wir angewiesen waren. Ernährung, Wasserhaushalt und Stress der Tiere vor der Schlachtung, zusammen mit jahreszeitlichen Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, hatten zweifellos einen erheblichen Einfluss auf die Nebennierenrinden-Funktion zur Zeit der Schlachtung.

2.2. *Homogenat.* Die von Tourenzahl, Dauer und Volumenverhältnis abhängige Intensität der Homogenisation spielte für die Erhaltung der Enzymaktivität des Gewebes eine kritische Rolle; auf diese Grössen wird im Experimentellen Teil eingegangen. Als Homogenisationsmedium bewährte sich eine Saccharose-haltige Salzlösung, die nach der Verdünnung mit Eis ein annähernd blutisotonisches Homogenat der Ionenstärke $I/2 = 0,118$ lieferte und die Funktion der teilweise an die Mitochondrien gebundenen Enzym-Komplexe aufrecht erhielt; sowohl salzfreie, hypotonische oder isotonische Saccharoselösungen, wie entsprechend isoosmotische, saccharosefreie Salzlösungen waren für die Corticosteroidbildung ungünstig. Das molare Na/K-Verhältnis entsprach mit 1,22 bzw. 1,17 demjenigen der Rinde. Eine Variation in Richtung auf den Serumwert (21,5) ergab keine eindeutigen Änderungen, wie auch von ROSENFELD [25] für die Steroidgenese in der Perfusionstechnik gefunden wurde. Der Zusatz von *sek.*-Natriumphosphat wirkte dem raschen Absinken des pH während der Homogenisation entgegen und erleichterte die Einstellung auf pH 6,9–7,1; die enzymatische Aktivität des Homogenates nahm bei der Aufbewahrung bei 0° allmählich ab, insbesondere die 17-Hydroxylase, die auch gegen andere Einflüsse sehr labil zu sein schien (vgl. unter 2.1).

2.3. *Inkubation.* Um die für alle Endprodukte optimalen Bedingungen der obligat aeroben [19] Umwandlung endogener Vorstufen zu ermitteln, war nicht nur die absolute Konzentration, sondern ebensosehr die relative der einzelnen Bestandteile zu berücksichtigen.

Es war uns schon früher bei der Inkubation in Phosphatpuffer aufgefallen [9] [10], dass der übliche Zusatz von Nicotinamid (ca. 650 µg/ml) in Gegenwart von Mg⁺⁺ zwar die Bildung von F und B besonders begünstigt, diejenige von Aldosteron jedoch verringert hatte. Da ausserdem unsere interessantesten Aktivatoren und Hemmstoffe der Pyridinreihe angehören ([9] [10] und folgende Mitteilung), verzichteten wir auf dessen Zusatz und erreichten eine allgemein höhere Steroidbildung unter Konstanthaltung des F/B-Verhältnisses durch andere Massnahmen.

Wir wiesen schon oben darauf hin, dass für eine gute Steroidbildung ein gewisses Minimum an Ionenstärke und osmotischer Grösse, gewährleistet durch das gewählte Verhältnis der Saccharose-Salz-Konzentration im Homogenat, vorhanden sein musste. Als optimales pH bestimmten wir 7,0–7,2 für B und Aldosteron, 7,0–7,5 für F, wobei für letzteres 7,5 vorteilhafter schien (vgl. hierzu [23]); wir stellten daher auf das Hydrogencarbonatpuffer-System II um, welches unter Begasung mit Oxycarbon (95% O₂ + 5% CO₂), eine bessere, selbstregulierende Pufferung gestattete (vgl. Tab. 2).

Die Inkubationsdauer hatten wir schon früher von 3 auf 2 Stunden verkürzt, da gleichzeitig verlaufende Abbaureaktionen nach 2 Stunden die nur noch geringfügige Bildungsrate aus endogenen wie exogenen Vorstufen zu übertreffen begannen. Von zugefügtem radioaktivem Aldosteron wurden ca. 20% während der 2-stündigen Inkubation zerstört. Zudem verschob sich das 11β-Hydroxy- \rightleftharpoons 11-Keto-Verhältnis mit zunehmender Inkubationsdauer zu ungunsten der primär gebildeten 11β-Hydroxysteroiden. Eine recht gute Steroidausbeute war zwar schon nach 30–60 Minuten zu verzeichnen, aus praktischen Gründen und zwecks besserer Reproduzierbarkeit wurde die maximale Bildung bei 2 Stunden vorgezogen. Die Begasung erwies sich mit etwa 0,5 l pro Minute hinsichtlich Sauerstoffangebot, wie nicht minder wichtiger Rühr-

wirkung, in den von uns benützten Gefässen als optimal. Die durch Begasung mit reinem Stickstoff erzielte Steroidausbeute entsprach dank des im Homogenat noch vorhandenen Sauerstoffs immerhin noch ca. 20–40% der Normalwerte; die Aldosteronbildung reagierte auf Sauerstoff-Mangel oder -Entzug am empfindlichsten.

Aus den Versuchen mit *Fumarat-Mg⁺⁺-Kombinationen* ging ferner hervor, dass die optimalen Bedingungen für Aldosteron, 18-Hydroxy-B und 19-Hydroxy-B nicht identisch waren mit denjenigen für F und B. Als Kompromiss ergaben sich die in Tab. 1 angegebenen Konzentrationen. Das galt ebenso für das Verhältnis von *Fumarsäure* und *NADP*. Da *NADPH* einen obligaten Cofaktor für die Steroid-Biosynthese darstellt [19], haben wir schon früher die wichtige Rolle der Fumarsäure bei der Bildung von *NADPH* aus exogenem *NADP* und Nebennierenenzymen diskutiert [1] [9]. Wir konnten nun papierchromatographisch und spektrophotometrisch nachweisen, dass in unserem System II während der Inkubation Fumarat verbraucht und reduziertes Nucleotid gebildet wurde. GRANT und Mitarbeiter [26] vermuteten, dass die in Rinder-Nebennieren-Mitochondrien durch Zwischenstufen des Tricarbonsäurecyclus vermittelte Bildung von *NADPH* von Äpfelsäuredecarboxylase abhängig ist. Äpfel- oder Bernsteinsäure vermochten jedoch in unserem System die Fumarsäure nicht vollwertig zu ersetzen (vgl. auch [22]).

Ein gleichwertiger Ersatz war möglich durch ein anderes, nicht an die Mitochondrien gebundenes *NADPH*-erzeugendes System, wie exogenes Glucose-6-phosphat mit *NADP* und endogener Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; unter diesen Bedingungen war die Ausbeute von F und B mindestens so gut, und zwar unter Vergrößerung des F/B-Verhältnisses, während diejenige von Aldosteron bestenfalls gleich blieb. Ersatz von *NADP* durch 0,2–4 μMol vorgebildetes *NADPH* pro g Gewebe bewirkte unter Erhaltung der F- und B-Bildung ebenfalls einen Ausbeute-Abfall von Aldosteron im Phosphat-Medium (System I), nicht aber im Hydrogencarbonat-Medium (System II). Aus ökonomischen und Stabilitäts-Gründen wurde somit die Verwendung von *NADP* vorgezogen, nachdem sich auch gezeigt hatte, dass andere Nucleotide wie ATP, ADP, AMP, 3',5'-AMP, NAD und NADH (mit je 8 μMol) die Biogenese aus endogenen Vorstufen unseres Homogenates nicht besser bzw. wesentlich schlechter zu fördern vermochten; das gleiche galt für Trigonellin als potentieller Vorstufe für die Nucleotide.

Bei einer auf rund 3 μMol *NADP* pro g Gewebe erhöhten Konzentration, was etwa der 300fachen Menge der Gewebekonzentration entsprach, war auch die Ausbeute aller Steroid-Endprodukte erhöht gegenüber geringeren Mengen. Bei 6 und 9 μMol *NADP* stieg die Bildung von F, B und 19-Hydroxy-B noch weiter an, diejenige von Aldosteron aber nicht mehr so stark. Andererseits sank bei Ersatz von *NADP* durch NAD (je 3 μMol) die Ausbeute der erstgenannten Steroide bedeutend stärker als die von Aldosteron.

Einen ähnlichen Effekt beobachteten wir auch bei der Umwandlung exogener Vorstufen, wobei NAD gegenüber *NADP* bei absolut geringerer Ausbeute das Verhältnis zugunsten von Aldosteron verschob (s. Abschnitt über Vorstufen).

Diese quantitativen Verschiebungen, welche durch die Wahl der *NADPH*-erzeugenden Systeme bzw. der Nucleotide selbst auftraten, lassen vermuten, dass die Aldosteronbildung eines anderen Nucleotid-Gleichgewichtes bedarf als die Biosynthese anderer Corticosteroide; Aldosteron stellt auch insofern eine Ausnahme dar, als

seine Bildung, wenigstens theoretisch, auf einer der Stufen eine Dehydrierung der 18-Hydroxylgruppe erfordert.

Nachdem wir auf diese Weise zu einer Kompromisslösung mit für unsere Zwecke, gesamthaft betrachtet, optimaler Steroidbildung gelangt waren, wie in Tab. 1–3 angegeben (System II), sei noch kurz auf einige weitere Variationen oder Zusätze verwiesen; sie hatten alle keinen oder keinen günstigen Effekt auf unser System.

In Übereinstimmung mit anderen Angaben [25], hatte der Ersatz aller Natrium- durch Kalium-Ionen keine eindeutige Änderung der Steroidbildung zur Folge. Ersatz von Magnesium-Ionen durch Calcium- oder Mangan-Salze erwies sich jedoch, teilweise im Gegensatz zu Befunden mit Gewebe anderer Spezies oder Präparation [25] [27] [28], als ungünstig.

Zusätze wie Vitamin A bzw. A-acetat (150 bzw. 1300 $\mu\text{g}/\text{ml}$; vgl. [29]), Vitamin K_1 , E [30] und der B-Gruppe (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), oder Cytochrom C (1500–7500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hatten keinen Einfluss auf unser System, überraschenderweise auch nicht 2,4-Dinitrophenol (bis 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; vgl. [25]); zur Ascorbinsäure vgl. [72].

Natürliches ACTH oder das synthetische β^{1-24} -Corticotropin, bzw. Hypertensin (Val^5 -Hypertensin II-Asp- β -amid) vermochten mit bis zu 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ unser bereits optimal produzierendes *in-vitro*-Homogenat-System mit endogenem Vorläufer oder exogenem, inaktivem bzw. [^3H]-Cholesterin nicht weiter zu stimulieren. Selbst wenn das System durch Weglassen von Fumarsäure oder NADP bzw. Magnesium-Ionen stark verarmt, oder durch Austausch der Fumarsäure mit Glucose-6-Phosphat modifiziert wurde, war kein wesentlicher Effekt durch 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 24er-Peptid zu erkennen; ein solcher wäre unter der Annahme zu erwarten gewesen, nach welcher die stimulierende Wirkung von Corticotropin durch eine Aktivierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zustandekommen soll (vgl. [31]).

3. Endogene und exogene Vorstufen. – Für die Untersuchung einzelner Biosynthese-Reaktionen und deren Beeinflussung durch Aktivatoren oder Blocker war ein Homogenat mit den natürlichen *endogenen* Vorstufen besonders wünschenswert, das mit einem möglichst vollständigen Enzymsystem ein Steroidspektrum lieferte, wie es physiologischerweise z. B. im Nebennieren-Venenblut anzutreffen ist [32]. Bei Verwendung *zusätzlicher exogener* Vor- oder Zwischenstufen in einem solchen System musste daher berücksichtigt werden, dass ihre Umsetzung mit derjenigen der gleichzeitig vorhandenen *endogenen Metaboliten in Konkurrenz steht*. Unter der Annahme, dass endo- und exogene Vorstufe im Homogenat in physikalisch identischer Weise vorlagen, konnte nur dann mit einer identischen Umsetzung gerechnet werden, wenn die exogene Vor- oder Zwischenstufe qualitativ der endogenen entsprach und quantitativ – wegen der möglichen Substratsättigung – nur einen geringen Bruchteil der letzteren ausmachte. Aus diesem Grunde war für uns die Identifizierung der endogenen Vorstufe von grossem Interesse.

3.1. Generelle Vorstufen. Nach zahlreichen Arbeiten mehrerer Forschergruppen verläuft die Biosynthese der Corticosteroide in verschiedenen Nebennierensystemen *in vitro* mit radioaktiven, teils auch unmarkierten Steroiden als Vorstufen ausgehend von Cholesterin über die in Fig. 1 skizzierten Etappen [5] [11] [18–20] [22] [33–44] [74]. Dabei hängt die relative Bedeutung der einzelnen Wege oft stark von der Wahl des verwendeten Systems ab. Fig. 1 stellt die hauptsächlichsten und möglichen Biosynthese-Wege vereinfacht, in Form senkrechter Kanäle mit horizontalen Querverbin-

dungen, dar; in den Schnittpunkten stehen die Zwischen- oder Endprodukte, letztere als Quadrate markiert; die Verbindungslinien bedeuten die einzelnen Schritte: Die Senkrechten von der Δ^5 - zur Δ^4 -Ebene entsprechen den 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ Isomerasen, die Waagrechten von links nach rechts 11β -Hydroxylasen, die Linien von vorne nach hinten 21 -Hydroxylasen, die Diagonalen vom Zweitinnersten, stärker ausgezogenen Kanal nach innen den 17α -Hydroxylasen, nach aussen den 18 -Hydroxylasen; die Diagonalen nach dem äussersten Kanal repräsentieren die 18 -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen.

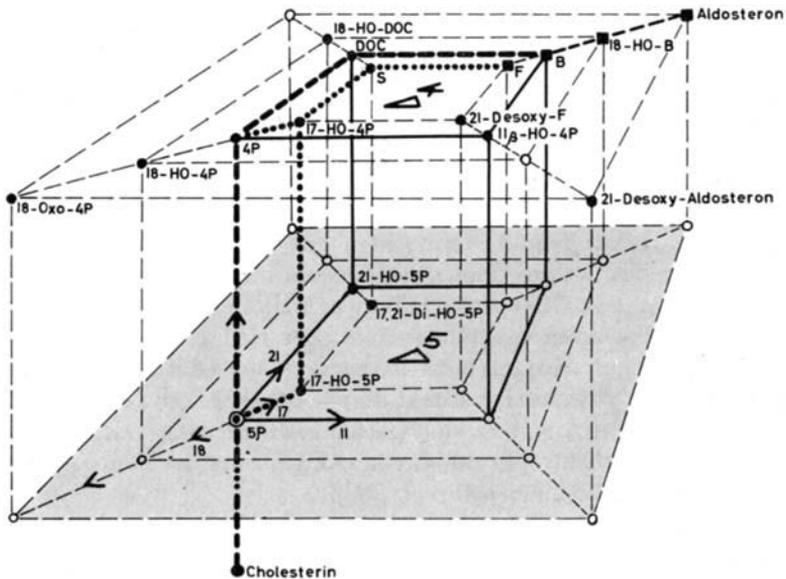


Fig. 1. Vereinfachtes Schema der Corticosteroid-Biosynthese ausgehend von Cholesterin bzw. Pregnenolon (5P). Die fein gestrichelten Verbindungslinien weisen auf die strukturellen Zusammenhänge hin; die Hydroxylierungen in 11, 17, 18 und 21 erfolgen in Richtung der angegebenen Pfeile, ausgehend vom stärker ausgezogenen zweitinnersten Kanal, und zwar hauptsächlich in der Reihenfolge 21, 11 oder 17, 21, 11 (B \rightarrow F ist somit keine realisierbare Transformation). Die senkrechten Linien bedeuten den Übergang von Δ^5 - 3β -Hydroxy- zu Δ^4 -3-Keto-Steroiden, die äussersten Diagonalen den Übergang 18-Hydroxy- zu 18-Oxo-Steroiden. Die vollen Kreise bedeuten nachgewiesene bzw. eingesetzte Vor- und Zwischenprodukte, die vollen Rechtecke die Endprodukte. Die dick gestrichelte Linie bezeichnet den Biosyntheseweg zu B, die dick punktierte denjenigen zu F (s. auch Text).

Nach heute gültigen Anschauungen würde das biosynthetische Potential der *zona fasciculata* der Nebennierenrinde die Steroide des innersten Kanals umfassen, das Potential der *zona glomerulosa* die Steroide der beiden äusseren Kanäle, während die Reaktionen des zweitinnersten Kanals in beiden Zonen nachweisbar sind [34]. Weitere Transformationen, wie 6β -, 16α - oder 19 -Hydroxylierung, Seitenkettenabspaltung oder Aromatisierung sind der Übersicht wegen im Schema ausgelassen worden; verzichtet wurde auch auf die Wiedergabe von Hydrierungs- und Dehydrierungs-Reaktionen, z. B. der Sauerstofffunktionen in 11- oder 20-Stellung.

Ausgehend von Acetat dürften heute *Cholesterin* und *Pregnenolon* als obligate Zwischenprodukte der Steroidbildung angesehen werden [22] [33–40] [43–46]. Die gelegentliche Vermutung, dass es andere, von Cholesterin unabhängige Wege gibt [39] [41], liess sich bisher nicht bestätigen [40] [45], aber auch noch nicht ganz ausschliessen [40]. Der vermutlich für die Steroidgenese einen Engpass darstellende Weg Cholesterin-Pregnenolon führt über 20α -Hydroxy- und $20\alpha, 22R$ -Dihydroxycholesterin unter Abspaltung von Isocaproensäure [22] [36] [43].

Ausgehend von Pregnenolon bzw. Progesteron teilt sich der Weg in 2 Hauptstränge (vgl. Fig. 1); der eine, dick gestrichelte, führt von Pregnenolon über Progesteron und DOC nach B, der andere, punktierte, von Pregnenolon über 17-Hydroxypregnenolon, 17-Hydroxyprogesteron und S nach F, wobei auch die Abzweigung von Progesteron eine gewisse Rolle spielt. Sehr viele Nebenwege (fein gestrichelt) sind dadurch denkbar und teils auch realisierbar, dass die Hydroxylierungen auf der Δ^6 -Ebene verlaufen, bevor die Dehydrierung zu den Δ^4 -3-Ketosteroiden erfolgt [47]; dabei ist die Reihenfolge der Hydroxylierungen im wesentlichen immer 17, 21, 11 bzw. 21, 11 [34].

Die relativ nur geringfügige Umwandlung zu Aldosteron geht bisher am besten aus B als Vorläufer, offensichtlich über 18-Hydroxy-B, obwohl letzteres eine schlechtere Vorstufe darstellt. Auf andere mögliche Vorstufen des Aldosterons auf den beiden äusseren Kanälen in Fig. 1, wird weiter unten eingegangen.

20α -Hydroxycholesterin, $20\alpha, 22R$ -Dihydroxycholesterin, sowie Pregnenolon oder Progesteron, die in unseren Homogenaten höchstens in Spuren ($< 1 \mu\text{g/g}$) nachzuweisen waren, kamen daher schon aus quantitativen Gründen als vorgebildete endogene Vorstufe nicht in Betracht, da die Neubildung der reduzierenden Corticosteroide 200–400 $\mu\text{g/g}$ Gewebe betrug. Progesteron fiel auch in qualitativer Hinsicht aus, da es sowohl als inaktive (100–400 $\mu\text{g/g}$) wie radioaktive Vorstufe (3 $\mu\text{g/g}$) bei völligem Umsatz ein B/F-Verhältnis von durchschnittlich 5 gegenüber 1–2 aus endogener Produktion lieferte. Hinsichtlich des B/F-Verhältnisses erwies sich Pregnenolon (0,6–500 $\mu\text{g/g}$) bei ebenfalls 100-proz. Umsatz mit einem Wert von ca. 2,5 bereits sehr ähnlich der endogenen Vorstufe, und tritiiertes 20α -Hydroxycholesterin (0,6 $\mu\text{g/g}$) ergab bei einem Umsatz von 70% praktisch identische Werte. Dies liess vermuten, dass die endogene Vorstufe keine Δ^4 -3-Ketosteroid-Struktur besass und dass ihr Weg zu F in unserem Homogenat nicht über Progesteron, sondern 17-Hydroxypregnenolon führte (vgl. auch WELIKY & ENGEL [75]).

Das einzige Sterin, das im Nebennieren-Rinden-Gewebe *mengenmässig* als präformierte Vorstufe in Frage kam, ist freies *Cholesterin*, das rund 0,2% vom Frischgewicht ausmacht [48] [49], und teils aus der Nebenniere selbst [38–40] [46], teils aus dem Blut stammt [45] [50]. Deshalb erschien Cholesterin als die wahrscheinlichste Muttersubstanz der Corticosteroide in unserem System, wenn nicht eine weiter *vor* Cholesterin liegende Verbindung oder Acetat selbst [38–40] [46] [51] dafür in Betracht zu ziehen war.

Exogenes, inaktives Cholesterin bewirkte bis zu 1000 $\mu\text{g/g}$ keine Steigerung der Steroidbildung mehr, da bereits die endogene Substratkonzentration von ca. 1800 $\mu\text{g/g}$ einer Übersättigung der vorhandenen enzymatischen Kapazität entsprach. Eine weitere Steigerung der Cholesterin-Konzentration hatte sogar eine deutliche Hemmwirkung zur Folge. Wurde hingegen mit [7α - ^3H]-Cholesterin inkubiert (6 $\mu\text{g/g}$), so

erhielten wir einen Umsatz von rund 25% der eingesetzten Radioaktivität zu Corticosteroiden, der im gleichen Ansatz recht genau mit demjenigen der endogenen Vorstufe zu nicht-radioaktiven Corticosteroiden entsprach; auch war das B/F-Verhältnis aus exogenem wie endogenem Vorläufer identisch. Ausserdem verhielt sich exogenes [³H]-Cholesterin in qualitativer und quantitativer Hinsicht gleich wie die endogene Vorstufe, wenn deren Umsetzungen durch Zugabe von Aktivatoren oder Blockern generell oder selektiv modifiziert worden war. Über diese Versuche wird später genauer berichtet werden.

Die dünnschichtchromatographische Bestimmung mit unseren Homogenaten bzw. ihren Hexanextrakten ergab eine durch die Inkubation bedingte Abnahme des Cholesteringehaltes von durchschnittlich 400 $\mu\text{g/g}$, eine Menge, die nur wenig über derjenigen der neu gebildeten Corticosteroide (300–400 $\mu\text{g/g}$) lag. Ähnliche Verhältnisse haben auch DAILEY und Mitarbeiter [28] bei der Inkubation von Schweine-Nebennieren gefunden. Ferner ergab sich, dass entfettetes, Vorstufen-freies Aceton-Trockenpulver von Nebennieren-Rindengewebe sowohl die wieder zugefügte Vorstufe in Form des Hexanextraktes, als auch inaktives oder tritiiertes Cholesterin in gleicher Ausbeute zu B umsetzte. Ohne diese Vorstufen entstanden praktisch keine Corticosteroide.

Somit konnten wir mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass unsere endogene Vorstufe aus *freiem Cholesterin* bestand. Es war allerdings noch abzuklären, ob nicht primär *Cholesterinfettsäureester* betroffen waren, obwohl das Verhältnis Cholesterinester/Cholesterin in der Rinder-Nebennierenrinde mit rund 0,15 [48] im Gegensatz zu anderen Spezies mit 1–10 [49] [52] [53] aussergewöhnlich niedrig ist. Dagegen sprach auch, dass sich die endogene Cholesterinesterfraktion während der Inkubation nicht merklich verändert hatte, obwohl nach SHYAMALA *et al.* [54] die enzymatische Hydrolyse dieser Ester in Rinder-Nebennierenhomogenat bei pH 7,5 in guter Ausbeute verlaufen soll. Unter unseren Bedingungen fanden wir, dass einerseits ein Zusatz von Cholesterin-oleat, -linolat, -linolenat, -palmitat oder -stearat (je 200 $\mu\text{g/g}$) zu den endogen vorhandenen Estern (rund 300 $\mu\text{g/g}$) die Steroidgenese nicht erhöhte; andererseits wurde [¹⁴C]-Cholesterinlinolenat bis zu 65% hydrolysiert, wobei die Ausbeute der Corticosteroide aber nur rund $\frac{1}{3}$ derjenigen aus T-Cholesterin selbst entsprach. Eine gleichzeitige Veresterung von tritiiertem Cholesterin zu Fettsäureestern fand nur zu 1–2% statt. Eine direkte Verwendung von Cholesterinestern für die Corticosteroidgenese in Rinder-Nebennierenhomogenat liess sich somit im Wesentlichen ausschliessen; ein gleiches Ergebnis erhielten DAILEY *et al.* [52] mit Schweine-Nebennieren bei einem sogar viel höheren Esterverhältnis von 1,0, während bei Hund oder Mensch (Verhältnis 9–10) die Cholesterinester eine gewisse Rolle für die Steroidgenese zu spielen scheinen [34] [55].

Schliesslich war *Cholesterinsulfat* als möglicher Vorläufer zu beachten, obwohl sein Gehalt in Rinder-Nebennieren nur zu 1,5 $\mu\text{g/g}$ gefunden wurde [56]. Kürzlich ist jedoch nachgewiesen worden, dass Nebennierengewebe Sulfokinasen enthält, die – allerdings unter Zusatz von Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat – verschiedene Δ^5 -3 β -Hydroxysteroiden verestern können [57] [58], und dass auch Cholesterin bzw. Pregnenolon als Sulfate zu einem geringen Prozentsatz in 17-Hydroxypregnenolonsulfat umgewandelt werden [58] [59]. Unter den Bedingungen unseres Systems konnten wir jedoch inaktives oder tritiiertes Cholesterinsulfat und Pregnenolonsulfat nur

zu einem geringen Teil in freie Corticosteroide überführen; daneben waren noch hydrolysierte Vorstufen bzw. unhydrolysierte Sulfate nachzuweisen. Umgekehrt liessen sich bei Einsatz tritiiertes Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid-Vorstufen höchstens einige Prozente davon in der Sulfatfraktion nachweisen.

Der Vollständigkeit halber untersuchten wir noch, ob sich in unserem System [^{14}C]-Acetat in Corticosteroide einbauen liesse, wie dies schon früher mit Homogenaten [37], Schnitten [38] [60] oder nach der Perfusionstechnik [39] erwiesen worden war. Mevalonat schien unter diesen Bedingungen nicht geeigneter zu sein [37] [76]. Unsere Versuche verliefen völlig negativ.

Alle unsere Resultate sprechen somit dafür, dass *freies Cholesterin* die *endogene Vorstufe* für die in unserem System während der Inkubation entstehenden Corticosteroide darstellt.

3.2. *Exogene Vorstufen für Aldosteron.* Über die bevorzugte Biosynthese des Aldosterons, deren mögliche Wege in Fig. 1 angedeutet sind, ist man sich noch nicht im klaren. Nach AYRES und Mitarbeiter [61] entstehen mindestens 50% davon über B als Zwischenstufe, was zwangsläufig zur Annahme eines Weges über 18-Hydroxy-B führt. Aus der Literatur geht zwar hervor, dass sich B besser zu Aldosteron umwandeln lässt als Pregnenolon, Progesteron, 11β -Hydroxyprogesteron, DOC und 18-Hydroxyprogesteron, aber auch besser als 18-Hydroxy-B selbst [5] [34] [61–68].

In Ergänzung früherer Versuche [2–5] konnten wir diese Befunde mit inaktiven und radioaktiven Steroiden im Wesentlichen bestätigen. Tab. 4 gibt eine Zusammenstellung der unter unseren Bedingungen erzielten Umsätze mit 100–400 μg Steroid/g Gewebe; in den mit * bezeichneten Fällen, in denen auch radioaktive Vorstufen in einer Konzentration von 1–10 $\mu\text{g/g}$ verwendet worden sind, erhielten wir praktisch das gleiche Ergebnis.

Tabelle 4. *Biosynthetische Umsetzung verschiedener Steroide zu Aldosteron in Rindernebennieren-Rindenhomogenat*

	Aldosteronausbeute	
1–5%	0,2–1,0%	<0,2%
B*	18-Hydroxy-B *	11β -Hydroxyprogesteron
21-Desoxyaldosteron	DOC *	18-Oxoprogesteron
11-Dehydroaldosteron	21-Hydroxypregnenolon	A
	Progesteron *	Cholesterin *
	Pregnenolon *	Cholesterinsulfat *
	18-Hydroxy-DOC	Pregnenolonsulfat *
	18-Hydroxyprogesteron	21-Dehydro-B
		DOC-18-säure
		Pregn-4-en- 11β , 21-diol-3, 20-dion-18-säurelacton (18 \rightarrow 11) (Ketolacton)

Die bessere Aldosteronbildung aus B als aus 18-Hydroxy-B, überhaupt generell aus 18-Desoxy-Verbindungen als aus 18-hydroxylierten Vorstufen, lässt sich u. a. damit erklären, dass exogenes 18-Hydroxy-B in der zyklischen Hemiketal-Form vorliegt und als solche die enzymatische Dehydrierung erschwert [63] [68]. Es erscheint somit nicht unwahrscheinlich, dass die endogene Biosynthese diesen Weg beschreitet; es gibt auch gewisse pathologische Fälle, die bei höchstens normaler Sekretionsrate

von Aldosteron eine enorm erhöhte Sekretionsrate von 18-Hydroxy-B aufweisen, was sich durch einen Defekt der 18-Hydroxy-Dehydrogenase interpretieren lässt [64] [69].

Andererseits fanden wir in Übereinstimmung mit SANDOR & LANTHIER [66], dass der umgekehrte Weg von Aldosteron zu 18-Hydroxy-B unter den gegebenen Bedingungen nicht durchführbar ist.

Die relativ gute Aldosteronbildung aus 21-Desoxyaldosteron bzw. 11-Dehydroaldosteron (\equiv 18-Oxo-A) zeigte, dass auf diesen Stufen sowohl 21-Hydroxylierung wie Reduktion der 11-Ketogruppe noch möglich waren; ob diese Umwandlungen biogenetisch von einiger Bedeutung sind, erscheint uns zweifelhaft im Hinblick auf die geringen bis kaum nachweisbaren Umsetzungen von 18-Hydroxyprogesteron, 18-Oxoprogesteron, 11 β -Hydroxyprogesteron bzw. A; letzteres und 21-Dehydro-B waren jedoch insofern von Interesse, als sie schon eine Oxydationsstufe darstellten, die nach 18-Hydroxylierung theoretisch nur durch Disproportionierung zu Aldosteron hätte führen können, was nicht der Fall war. Auch Vorstufen wie DOC-18-Säure oder das Ketollacton, die zur Umwandlung einer Reduktion der Sauerstofffunktion in 18 bedurften, versagten gänzlich. Unter 10 synthetischen C₂₁- Δ^4 -3-Ketosteroiden mit Sauerstofffunktionen in 18 und 20 bzw. 11, 18 und 20, teils mit Lacton- oder Epoxid-Brücken zwischen 11 und 18 bzw. 18 und 20, teils mit freien Hydroxylgruppen in 18 und/oder 20-Stellung, fanden wir ebenfalls keine, welche zur Bildung von Aldosteron oder 18-Hydroxy-B beitrugen.

Nachdem sich in der Tat keine der geprüften Verbindungen besser als B in Aldosteron umwandeln liessen, prüften wir, wie weit diese Situation von den Inkubationsbedingungen abhängt. Für die Aldosterongenese aus dem endogenen Vorläufer (\equiv Cholesterin) erwiesen sich die gleichen Bedingungen als optimal wie für die Steroidhydroxylierungen. Da die Aldosteronbildung aus 18-Hydroxy-B formal nur einer Dehydrierung bedarf, verglichen wir die Umwandlung von tritiiertem B und 18-Hydroxy-B unter Veränderung der Konzentrationen von Fumarsäure, NADP, NAD und ATP. Das Resultat war folgendes: ohne Fumarsäure, aber mit relativ viel Nucleotiden, also unter Bedingungen, unter denen die Aldosteronbildung aus endogener Vorstufe bedeutend sank, blieb sie aus exogenem B oder 18-Hydroxy-B noch in gleicher Höhe erhalten, war aber auch nicht besser als unter Normalbedingungen. *Immerhin erwies sich nun 18-Hydroxy-B dem B als ebenbürtige, wenn nicht bessere Vorstufe.*

Diese Versuche bestätigten die weiter oben geäußerte Vermutung, dass die Bedingungen für die Biosynthese von Aldosteron zumindest in der letzten Stufe verschieden sind von denjenigen anderer Corticosteroide.

Für die ausdauernde und zuverlässige Mitarbeit bei den annähernd 6000 Inkubationen danken wir den Herren H. STEFFEN, W. ROSSMANN und B. LEONARDI bestens. Herrn Dr. K. SCHMID sind wir für die Radiometrie, Herrn E. VON ARX, Fr. M. MERKLE und Fr. R. HÄLG für die grosse Hilfe bei der Chromatographie sehr zu Dank verpflichtet. Den Herren Dres. G. ANNER, K. HEUSLER, J. SCHMIDLIN, J. KALVODA und P. WIELAND verdanken wir viele der 18-oxygenierten Steroide.

Experimenteller Teil

A. Material. - Nucleotide BÖHRINGER: ATP-Dinatriumsalz, NAD-Tetrahydrat, NADH-Dinatriumsalz, NADP-Mononatriumsalz, NADPH-Tetranatriumsalz.

Reagentien p. A.: Polyäthylenglykol Carborex 200 und Antifoam Siliconöl AF von Dow CORNING. Lösungsmittel frisch destilliert; chromatographische Lösungsmittelsysteme und Indi-

katoren s. [17]; WHATMAN-Papier No. 1; Kieselgel G MERCK. Gase von CARBA (Basel). Farbstoff F5: 4'-Diäthylamino-2'-methyl-4-nitro-azobenzol; Rhodamin B extra, 0,1% in Äthanol (CIBA AG); die für die Lokalisierung von Aldosteron wichtigen UV.-fluoreszierenden Komponenten des Rhodamins B extra (s. Fig. 2) entstehen erst nach mindestens 2–3 wöchiger Alterung der Farbstofflösung unter dem Einfluss von Tageslicht. Szintillator: 0,4% BBOT CIBA (2,5-Bis-[5'-*t*-butylbenzoxazolyl-(2')]-thiophen) in Benzol.

Folgende *Steroide* bezogen wir vom RADIOCHEMICAL CENTER, Amersham, bzw. NEW ENGLAND NUCLEAR CORP., Boston, (spez. Akt. in mc/mg) und reinigten sie, wenn nötig, papierchromatographisch: [4-¹⁴C]-Cholesterinlinolenat (0,032), [7 α -³H]-Cholesterin (6,5), [7 α -³H]-Pregnenolon (3,33), [4-¹⁴C]-Progesteron (0,07), [1, 2-³H]-Desoxycorticosteron (2,7), [1, 2-³H]-Corticosteron (2,1), [1, 2-³H]-11 β -Desoxycortisol (1,85), [7 α -³H]-Cortisol (28), [1, 2-³H]-Aldosteron (80). Ferner erhielten wir [1, 2-³H]-18-Hydroxycorticosteron von Dr. Sr. ULICK, [21-³H]-21-Hydroxypregnenolon von Dr. J. R. PASQUALINI, [7 α -³H]-20 α -Hydroxycholesterin von Dr. T. T. TCHEN, 20 α -Hydroxy- und 20 α , 22R-Dihydroxycholesterin von Dr. M. GUT, 18-Hydroxy-desoxycorticosteron von Dr. R. PAPPO und 18-Hydroxycorticosteron sowie 21-Desoxyaldosteron von Dr. J. SCHMIDLIN²⁾. Sulfate von Cholesterin und Pregnenolon (radioaktive und inaktive) wurden mit Pyridiniumsulfat und Diäthylamin in Pyridin nach SOBEL & SPÖERRI [70] hergestellt und dünnschichtchromatographisch gereinigt; als System eignete sich mit Kieselgel G eine Mischung von Äthylacetat-Pyridin-Essigsäure-Wasser (62 + 21 + 6 + 11) sehr gut; Nachweis mit Antimontrichlorid.

Die *Nebennieren* wurden im Schlachthof Basel von frisch geschlachteten, entbluteten Tieren (je 4–5 Kühe oder 7–8 Rinder) samt Fettpolster gewonnen, bei 0–5° transportiert, von Fett befreit und gewogen. Das Mark schabte man aus den längs halbierten Drüsen aus.

Die *Homogenisationslösung*, welche alle 2 Wochen frisch hergestellt wurde, enthielt in bidest. Wasser gelöst: Saccharose (0,2 M), NaCl (0,062 M), KCl (0,025 M), Na₂HPO₄ (0,02 M), und wurde im Kühlschrank (0°) aufbewahrt.

Homogenisator CUISTO mit 1-Liter-Glasgefäß; pH-Meter Polymetrohm 39C mit kombinierter Einstab-Glaselektrode mit Schliff (METROHM AG); Durchflussmesser Rotameter geeicht auf 0,1–2,8 Minutenliter; UV.-Spektrophotometer PERKIN-ELMER, Model 137.

B. Methoden. – 1) Herstellung des Homogenates (im Kühlraum bei 0–5°). Von den in eiskühlten Gefässen gesammelten Nebennierenrinden wurden 70 g mit dem Wiegemesser fein gehackt (Teilchengrösse ca. 8–10 mm³). Dieser Brei wurde im vorgekühlten Homogenisator, welcher bereits 140 ml einer eiskalten *Homogenisationslösung* enthielt, eine Minute auf eine Tourenzahl von nicht höher als ca. 22000 Touren/Min. homogenisiert, die Temperatur kontrolliert (unter 12°) und das pH gemessen; wenn nötig wurde auf pH 6,9–7,1 korrigiert, da ein Absinken unter 6,9 zu einem irreversiblen Aktivitätsverlust führte. Dann wurden 35 g fein zerschlagenes, aus bidest. Wasser hergestelltes Eis zugegeben³⁾ und 4 Min. auf voller Tourenzahl so homogenisiert, dass etwa drei bis viermal abgestoppt, pH und Temperatur kontrolliert, und sofort wieder auf volle Tourenzahl gestellt wurde. Das Homogenat (ca. 230–245 ml) wurde in einen eiskalten Messzylinder abgefüllt und kalt gehalten. 17 ml des Homogenates entsprachen ca. 5 g Rindengewebe; Zusammensetzung s. Tab. 1. Für die Herstellung möglichst salzreicher und/oder saccharosefreier Homogenate wurde in bidestilliertem Wasser, salzfreier Saccharoselösung oder Salzlösung homogenisiert. Von der Schlachtung bis zum fertigen Homogenat wurden ungefähr 2 bis 3 Std. benötigt.

2) Inkubation. – Unter Umrühren des Homogenates wurden ungefähr 20 ml mit einer Pipette vom Messzylinderboden her aufgesogen, davon 17 ml in einen 25-ml-Messzylinder abgemessen und in einen Inkubationskolben (nicht siliconisiert) geleert, welcher im Thermostatenbad (35°) in einem Schüttelgestell mit einem mit Glasritze versehenen Gaseinleitungsrohr bereit war.

²⁾ Für die Überlassung der verschiedenen Steroide sind wir diesen Herren zu grossem Dank verpflichtet, ebenso der ENDOCRINOLOGY STUDY SECTION, N.I.H., Bethesda, für die anfängliche Belieferung mit [7 α -³H]-Aldosteron und [7 α -³H]-Cortisol.

³⁾ Im System I (vgl. Tab. 1) wurden in diesem Moment auch die eingewogenen Mengen der Nucleotide (350 mg ATP, 35 mg NAD, 17,5 mg NADH, 8,75 mg NADP) zugefügt. Wenn der Einfluss bestimmter Substanzen auf das Homogenat interessierte, wurden sie vor der 4-Minuten-Homogenisation zugefügt, sofern sie nicht in der Homogenisationslösung gelöst werden konnten.

Aus einer Bürette wurden 17 ml der *Inkubationslösung*⁴⁾, deren Zusammensetzung in Tab. I für jedes System angegeben ist, in den gleichen Messzylinder abgefüllt und unter leichtem Schütteln zum Homogenat zugefügt. Aus einer Stabpipette wurde 0,5 ml Feinsprit, welcher gegebenenfalls die zu prüfenden Substanzen (Blocker, Aktivatoren oder Vorstufen) enthielt, zugefügt⁵⁾. Nach Zugabe von 2 Tropfen Antifoam wurde *sofort* mit der Begasung, im System I mit Sauerstoff, im System II mit Oxycarbon, begonnen. Diese Gase wurden vorher mit Wasser gesättigt; die Durchflussmenge musste für jeden einzelnen der 12 Inkubationskolben mit einem zugehörigen Rotameter auf 0,5 Minutenliter eingestellt und während der Inkubationsdauer konstant gehalten werden. Der 1. und der 7. Kolben dienten für die Kontrollversuche. Zwecks pH-Kontrolle waren die Kolben mit einem seitlichen Schliffstutzen versehen, in welchen die Glaselektrode passend eingeführt werden konnte. Im System I wurde das pH laufend kontrolliert und durch tropfenweise Zugabe von 1 N HCl auf pH 6,9–7,2 korrigiert. Im System II war eine Korrektur normalerweise nicht nötig; eine Kontrolle erfolgte bei Beginn der Inkubation und nach einer Stunde. Die sich im Laufe der Begasung an der Kolbenwand ansammelnde, fettige Schicht wurde vor den pH-Messungen mit einem Spatel in das Reaktionsmedium zurückgeschabt.

Nach 2 Std. stellte man die Begasung in den einzelnen Kolben sukzessive ab, und im System II wurde das Oxycarbon durch Einleiten von Stickstoff ausgetrieben. Bis zur pH-Konstanz war eine Begasung mit 1,5–2 Minutenliter Stickstoff während 5 Minuten notwendig. Die Kohlensäure aus dem Oxycarbon schien an den Gewebeteilen des Homogenates stark adsorbiert zu sein. Gleichzeitig wurde das pH mit 1 N HCl auf 6,9–7,1 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde quantitativ mit total 50 ml Methanol in einen Scheidetrichter gespült und gut geschüttelt; die Methanolkonzentration betrug ca. 60 Vol.-%. Die beiden Kontrollversuche wurden durch Zugabe eines Farbstoffes F₅ markiert. Zur Bestimmung der ursprünglichen Steroidkonzentration im Gewebe wurden die wie oben zusammengesetzten Ansätze ohne Inkubation sofort mit 50 ml Methanol versetzt.

3) Aufarbeitung. – Die Aufarbeitung erfolgte nach folgendem Schema, wobei die durchschnittliche prozentuale Wiedergewinnung nach Zusatz radioaktiver Steroide verschiedener Polarität (ohne oder nach Inkubation) angegeben ist. Die Wiedergewinnungsrate nach Zugabe nicht markierter Steroide im mg-Masstab war deutlich höher als diejenige nach Zugabe der radioaktiven Steroide im μ g-Masstab; in diesem Fall wirkten sich Verluste durch Adsorption an Glas und den grossen Oberflächen relativ stark aus.

Bei der Inkubation der radioaktiven Steroide verschob sich die Verteilung der Aktivität entsprechend der fortschreitenden Transformation in Richtung auf die polare Fraktion (d); eine Zunahme der Aktivität in (f) oder (g) war dadurch kaum festzustellen (0,5–5%); auffallenderweise reicherte sich aber einige Aktivität (3,5–8,5%) im Gewebe-Chloroformextrakt (b) an; obwohl sie aus dem Geweberückstand mit Hexan nicht zu entfernen war, löste sich (b) doch leicht darin.

3.1. Extraktion. Alle Extrakte aus organischen Lösungsmitteln wurden durch Eindampfen im Wasserstrahlvakuum bei 40° im Rotationsverdampfer gewonnen und die Trockenrückstände unter 0,05 Torr bei 40° 6–10 Std. getrocknet.

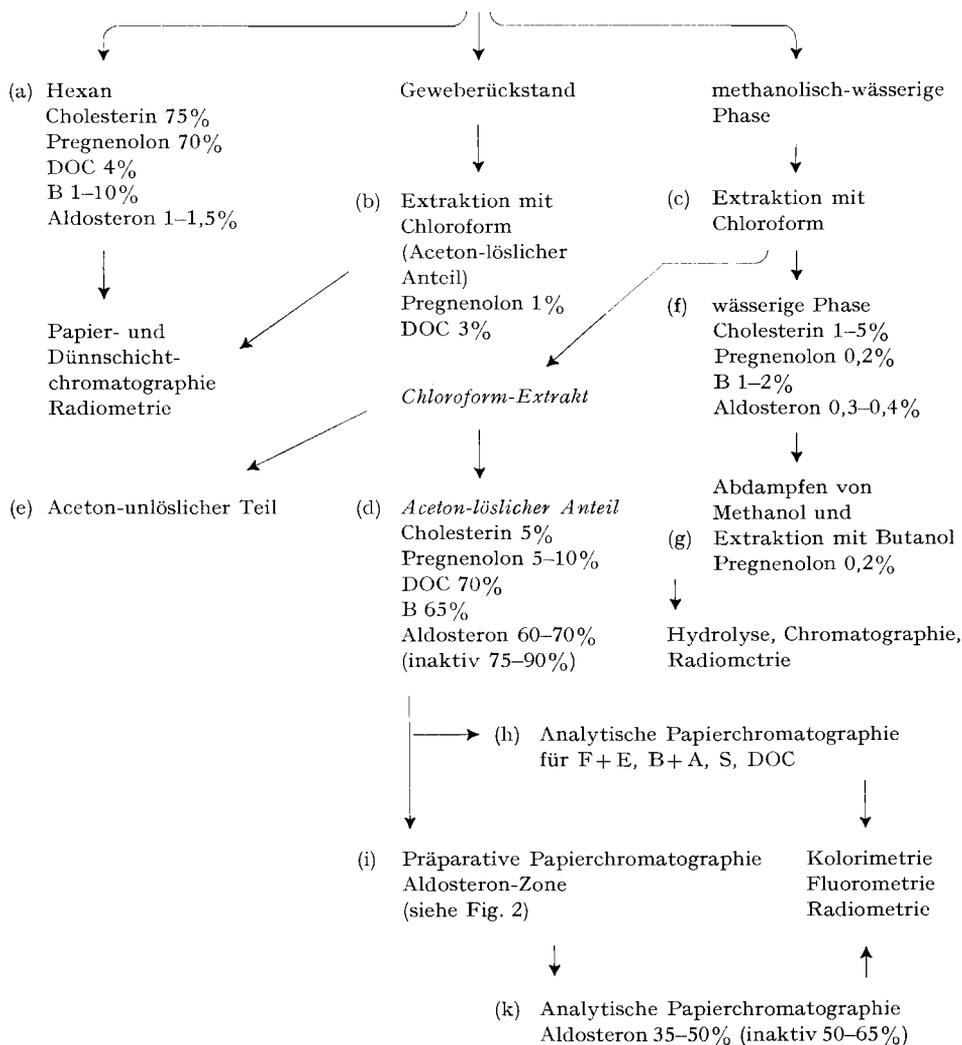
(a) *Hexanextrakt:* Die im Scheidetrichter auf 60% Methanolgehalt gestellten Inkubate wurden mit 100 ml Hexan, welches mit 60-proz. Methanol-Wasser bei Raumtemperatur gesättigt war, gut durchgeschüttelt. Die goldgelbgefärbte Hexanschicht wurde abgesogen, und die wässrige Phase noch viermal mit je 100 ml Hexan extrahiert. Die methanolische Phase, in welcher Gewebestandteile und denaturiertes Eiweiss ungelöst zurückblieben, wurde in der Kühlzentrifuge (0–5°) 15 Min. bei 5000 RPM zentrifugiert. Die geringe überstehende Hexanschicht wurde abgesogen und zum Hexanextrakt gegeben. Der Rückstand des Hexanextraktes betrug je Ansatz ca.

⁴⁾ Wenn alle Ansätze z. B. die gleichen radioaktiven Vorstufen enthielten, wurden letztere in der Inkubationslösung gelöst, wobei ihr genaues Volumen in den Inkubationskolben vorgelegt und 17 ml Homogenat nachträglich zugeführt wurde. Sonst gab man die radioaktiven Vorstufen, in wenig Feinsprit gelöst, vor der Begasung des Inkubates zu. – In anderen Sonderfällen, wo besondere Bestandteile der Inkubationslösung geprüft werden sollten, wurden entsprechend anders zusammengesetzte Lösungen bzw. Kombinationen eingesetzt.

⁵⁾ Substanzen, welche sich in Feinsprit nicht lösten, wurden in 0,5 ml Polyäthylenglykol, Wasser oder in Inkubationslösung separat gelöst und zugefügt. Ausnahmsweise wurden unlösliche Substanzen in Inkubationslösung suspendiert zugefügt. Die Steroidbiosynthese wurde weder durch 2,0 ml Feinsprit noch 0,5 ml Polyäthylenglykol beeinträchtigt.

Aufarbeitungsschema

Verteilung: Inkubat + Methanol + Hexan



200 mg. Die methanolisch-wässrige Phase wurde vorsichtig abdekantiert, über Watte filtriert und der unlösliche Rückstand einmal mit 25 ml 60-proz. Methanol, das mit Hexan gesättigt war, auf der Zentrifuge gewaschen. Diese Waschlösung wurde zur Hauptlösung gegeben.

(b) *Gewebeextrakt*: Üblicherweise wurde der Zentrifugationsrückstand verworfen. In speziellen Fällen wurde dieser Rückstand 2mal mit je 25 ml Chloroform tüchtig durchgeschüttelt und zentrifugiert. Aus den filtrierten Lösungen erhielten wir den *Gewebeextrakt* (je ca. 25–40 mg).

(c) *Chloroformextrakt*: Die methanolische-wässrige Phase (ca. 100 ml) mit der Hauptmenge der Corticosteroide wurde viermal mit je 25 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformlösungen wurden zweimal mit je 5 ml 0,1 N NaOH, 5 ml Wasser, zweimal mit je 5 ml 0,1 N HCl und je 5 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformlösung wurde nie längere Zeit (z. B. über Nacht) aufbewahrt, sondern sofort über wasserfreiem Natriumsulfat filtriert und eingedampft. Der

Rückstand wurde viermal mit je 4 ml Aceton digeriert und die Aceton-unlöslichen Anteile durch ein kleines Wattefilter abgetrennt und nachgewaschen. Die vereinigten Acetonlösungen wurden eingengt und quantitativ in kleinere Röhrchen transferiert. Dieser Rückstand = Extrakt (d) (Aceton-löslicher Teil des Chloroformextraktes) wog ca. 10–40 mg und enthielt die zu bestimmenden Corticosteroide. Die Aceton-unlöslichen Anteile im Rundkolben und auf den Wattefiltern wurden im Bedarfsfalle in Chloroform gelöst und eingedampft = Extrakt (e) (Aceton-unlöslicher Teil des Chloroformextraktes, ca. 10–20 mg); diese Fraktion enthielt weniger als 1% der im Aceton-löslichen Teil gefundenen Steroide.

(d) *Wässrige Phase*: Die mit Chloroform extrahierte methanolisch -wässrige Phase wurde im Wasserstrahlvakuum von Methanol befreit und mit Wasser auf 50 ml eingestellt. Die wässrigen Phasen, welche ein pH von 6,8–7,2 aufwiesen, dienten zur UV.-spektrophotometrischen Bestimmung von NADPH (λ_{max} 340 nm) und Fumarsäure (λ_{max} 210–215 nm) oder bei Verwendung radioaktiver Vorstufen zur Radiometrie.

(e) *n-Butanolextrakte*: In einigen Inkubationen wurden die wässrigen Phasen mit oder ohne vorheriger salzsaurer Hydrolyse mit je 15 ml *n*-Butanol zweimal extrahiert. Die Butanolextrakte (ca. 4–8 mg) dienen der Untersuchung eventueller wasserlöslicher Steroidkonjugate.

3.2. Chromatographische Bestimmungen. Ausführung der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie, einschliesslich Farbreaktionen, wie in [17] angeben.

Erste, analytische Papierchromatographie (h). Extrakt (d) wurde in 1 ml Chloroform-Methanol (1 + 1) gelöst; davon chromatographierte man 0,5% auf 1,5 cm breiten Papierstreifen im System F₂₀/EBW, 22°, oder F₂₅/EBW, 30°: Imprägnierung des Papiers mit einer 20–25-proz. Lösung von Formamid in Aceton, absteigende Chromatographie mit einer Formamid-gesättigten Mischung von Äthylacetat-Butylacetat-Wasser (15 + 85 + 5) bei 22 bzw. 38°. Parallel dazu lief eine Mischung von je 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 und 10 μ g F und B. Nach UV.-Photokopie wurden die getrockneten Chromatogramme durch alkalisches Blautetrazolium-Reagens (BT) gezogen und sofort durch visuellen Vergleich der blauen Flecke halbquantitativ ausgewertet; nach 50-minütigem Liegenlassen bei 22° trocknete man mit IR.-Strahlern zur Erzeugung der für Δ^4 -3-Ketone charakteristischen gelben Alkali-Fluoreszenz (AF) und bestimmte ebenfalls die Konzentration durch visuellen Vergleich. Der Fehler der Mittelwerte aus BT und AF-Bestimmung lag unter \pm 20%. Die Sequenz zahlreicher Corticosteroide im F/EBW-System ist auf S. 150 in [17] oder S. 30 in [16] angegeben (s. auch Fig. 2). Das erste Chromatogramm (h) diente zur Bestimmung von F + E (laufen gemeinsam), B + A (laufen gemeinsam), sowie gegebenenfalls S, DOC oder weiterer Steroide, sofern sie in genügender Menge und genügend getrennt auftraten; zur Bestimmung der ungetrennten Gruppe Aldosteron, 18-HO-B und 19-HO-B in der vorliegenden kleinen Konzentration s. unten (Chromatogramme i und k).

Zur gelegentlichen separaten Bestimmung von F und E bzw. B und A wurden aliquote Teile des Extraktes (d) im System B₅ bzw. BL₁ ([17], S. 97) chromatographiert. Bei Einsatz radioaktiver Stoffe wurde parallel zum Chromatogramm für die kolorimetrisch-fluorometrische Auswertung ein zweites 0,5% Aliquot chromatographiert zur radiometrischen Auswertung und gleichzeitig ein 0,5% Aliquot unchromatographiert radiometriert (s. unten).

Zweite, präparative Chromatographie (i). Zur Bestimmung der Aldosterongruppe chromatographierte man 80% des Extraktes (d) präparativ auf 2 Blatt Papier (19 × 37 cm) im System F₂₀/EBW, 22°, nachdem 10 μ g Rhodamin B extra auf die Mitte der Startlinie (über den Extrakt) aufgetragen worden waren.

Die Steroide verteilten sich, wie aus Fig. 2 ersichtlich, in gut getrennte Zonen, die sich unter der UV.-Lampe oder im Fluoreszenz-Schirm dank dem aus mehreren Komponenten bestehenden Leitfarbstoff sehr leicht lokalisieren liessen, auch wenn die Steroidkonzentration zu gering war, um durch UV.-Absorption nachweisbar zu sein. Die nach Fig. 2 markierte Aldosteron-Zone beider Blätter wurde zerschnitten und mit 50 ml Methanol-Wasser (80 + 20) durch $\frac{1}{2}$ -stdg. Schütteln eluiert. Vom Eluat wurden 80% (40 ml) abpipettiert und im Vakuum eingedampft; den Rückstand transferierte man quantitativ mit Aceton in kleinere Gläser.

Dritte, analytische Chromatographie (k). Man löste in 30 μ l *n*-Propanol und chromatographierte $\frac{1}{3}$ oder $\frac{2}{3}$ davon im System F₃₀/CHCl₃, 38° (Imprägnierung mit 30-proz. Formamid in Aceton, mobile Phase Formamid-gesättigtes Chloroform) parallel zu 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 und 10 μ g E (in Propanol gelöst) und bestimmte nach UV.-Photokopie das fast wie E laufende Aldosteron sowie das stärker polare 19-HO-B nach BT und AF. Das noch stärker polar, hinter 19-HO-B wandernde

18-HO-B konnte nur nach AF. oder UV.-Absorption (UV.-Photokopie) geschätzt werden, da es als Cyclohemiketal nur äusserst schwache reduzierende Eigenschaften aufweist. Im Falle radioaktiver Vorstufen wurden Parallelchromatogramme mit je $\frac{1}{3}$ -Aliquoten ausgeführt.

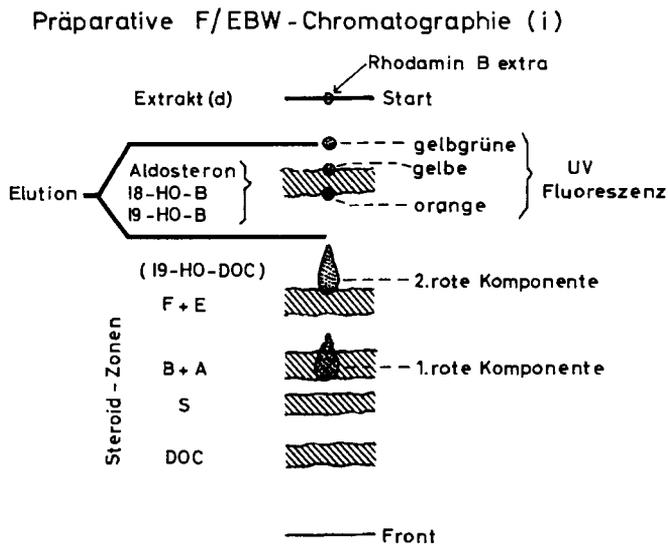


Fig. 2.

Der Gehalt der Steroide in $\mu\text{g/g}$ Gewebe ergab sich durch Multiplikation der gefundenen Werte mit einem Faktor, der dem zur Chromatographie eingesetzten aliquoten Anteil angepasst war; es wurden jeweils Serien zu 12 Ansätzen gleichzeitig inkubiert und aufgearbeitet, davon stets 2 als Kontrollversuche; deren Mittelwerte für die einzelnen Steroide wurden gleich 100 gesetzt, und die Resultate der übrigen Ansätze in % der Kontrollversuche berechnet.

Die Analyse der Hexanextrakte (a) auf Cholesterin, 20α -Hydroxycholesterin, $20\alpha, 22\text{R}$ -Dihydroxycholesterin, Pregnonol und Progesteron erfolgte durch Chromatographie in Decanit, 38° , (Decalin-Nitromethan-Methanol (10 + 5 + 5) [17]). Eine einwandfreie Abtrennung von Progesteron gelang im gleichen System besser nach Acetylierung.

Zur Bestimmung von Cholesterin wurden kleine Extraktaliquote an Kieselgel G mit Chloroform-Aceton (90 + 10) nach üblicher Dünnschichttechnik getrennt (R_f ca. 0,65) und nach Besprühung mit äthanolischer Schwefelsäure (1 + 1) mit 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,075, 0,10, 0,15, 0,20 μg mitchromatographiertem Cholesterin im UV. verglichen (alle Lösungen mit selbstfüllenden Spezialpipetten aufgetropft). Dünnschichtchromatographisch isoliertes Cholesterin erwies sich als einheitlich nach Propionylierung und Rechromatographie an Kieselgel-Silbernitrat [71], und insbesondere frei von Desmosterol.

Zur Bestimmung der Cholesterinester wurden Extraktaliquote an Kieselgel-G in Petroläther-Isopropyläther (99 + 1) 3mal 15 cm weit entwickelt und mit äthanolischer Schwefelsäure besprüht. Als Standardsubstanzen dienten Palmitat, Stearat, Oleat, Linolenat oder Linolat von Cholesterin.

Die Güte dieser Trennungen sowie die Spezifität dieser Bestimmungen, insbesondere diejenige von Aldosteron [16], welches in nur relativ kleiner Konzentration vorlag, ist bereits früher sehr ausführlich untersucht worden [13] [17] und hat in der Folge zu diesem Trennschema geführt. Bei Einsatz verschiedener Blocker oder Aktivatoren wurde die Identität einzelner Steroide kontrollhalber überprüft durch Derivatbildung, Abbau und Rechromatographie in geeigneten Systemen, ähnlich wie es bei der Doppelisotopen-Verdünnungstechnik [16] oder bei Konstitutionsaufklärungen durchgeführt worden war [13] [15]. Wenn nötig, wurden auch die anderen Zonen des präparativen Chromatogrammes (i) eluiert und weiter untersucht.

3.3. *Radiometrie*. Die qualitative Messung von Papier- und Dünnschicht-Chromatogrammen erfolgte im PACKARD Radiochromatogramm Scanner Model 7201. Die quantitative Messung von Extrakten und Chromatogrammen wurde im PACKARD TRICARB liquid scintillation counter Model 314 Ex folgendermassen ausgeführt: Extraktaliquote wurden auf $1,5 \times 1$ cm Papierstückchen getropft, welche sich in Plastik-Messgefässen befanden; dann wurde mit 1 ml Methanol *in situ* eluiert, 20 ml Szintillator zugegeben, verschraubt und geschüttelt. Von den 1,5 cm breiten analytischen Papierchromatogrammen, oder entsprechenden Streifen der präparativen Chromatogramme wurden ab Start, oder 1 cm dahinter, 1-cm-Stückchen in die Plastikgefässe geschnitten. Dann wurde mit 1 ml Methanol eluiert und wie oben behandelt. Von den Dünnschichtchromatogrammen wurden 1 cm breite Banden der Länge nach 0,5- oder 1-cm-weise mit dem Rasiermesser abgekratzt, und diese Silicagelportionen in Plastikgefässen mit 1 ml Methanol und 20 ml Scintillator versetzt. Von wässrigen Lösungen wurden jeweils 10–100 μ l mit Methanol und Scintillator vermischt; die Zählausbeute wurde unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst.

SUMMARY

The conditions of the adrenal steroid biosynthesis *in vitro* have been thoroughly studied, using beef adrenal cortex homogenate with endogenous and exogenous precursors. The preformed endogenous precursor has been identified with cholesterol. Its aerobic incubation produced a 10–30-fold increase of the amount of originally present corticosteroids, such as cortisol, corticosterone, aldosterone, 18-hydroxy-corticosterone and 19-hydroxy-corticosterone. From a wide variety of exogenous precursors studied so far, corticosterone proved quantitatively to be the best precursor for aldosterone, whereas the pathway involves probably 18-hydroxy-corticosterone. The results suggest that the optimal conditions for the formation of aldosterone are different from those for other corticosteroids. The methods used are fully described.

Forschungslaboratorien des Pharma-Departementes der CIBA
AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. W. KAHNT & A. WETTSTEIN, *Helv.* 35, 284 (1951).
- [2] A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT & R. NEHER, *Ciba Found. Coll. Endocrinol.* 8, 170 (1955).
- [3] F. W. KAHNT, R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 38, 1237 (1955).
- [4] F. W. KAHNT, R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Experientia* 11, 446 (1955).
- [5] A. WETTSTEIN, *Experientia* 17, 329 (1961).
- [6] A. WETTSTEIN, R. NEHER & H. J. URECH, *Helv.* 42, 956 (1959).
- [7] F. W. KAHNT, R. NEHER, K. SCHMID & A. WETTSTEIN, *Experientia* 17, 19 (1961).
- [8] E. MINDER, N. G. MARKOFF, R. NEHER & F. W. KAHNT, *Schweiz. med. Wschr.* 94, 622 (1964); W. ALBRECHT, F. W. KAHNT, R. NEHER & W. SCHULER, *J. Arterioscl. Res.* 5, 369 (1965).
- [9] F. W. KAHNT & R. NEHER, *Experientia* 18, 499 (1962).
- [10] R. NEHER & F. W. KAHNT, *Drugs and Enzymes*, Proc. 2nd Intern. Pharmacolog. Meeting Prag 1963; Pergamon, Oxford 1965.
- [11] O. HECHTER, A. ZAFFARONI, R. P. JACOBSON, H. LEVY, R. W. JEANLOZ, V. SCHENKER & G. PINCUS, *Recent Progr. Hormone Res.* 6, 215 (1951).
- [12] R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 34, 2278 (1951); S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 1163 (1954).
- [13] R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 39, 2062 (1956).
- [14] R. NEHER, *Proc. IVth Internat. Congr. Biochemistry*, Vol. 4, p. 28 (1959), Pergamon.
- [15] R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 43, 1171 (1960).
- [16] R. NEHER, 9. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mai 1962, Springer 1963, p. 21.

- [17] R. NEHER, Steroid Chromatography, Elsevier 1964.
- [18] O. HECHTER & G. PINCUS, *Physiol. Rev.* **34**, 459 (1954).
- [19] R. I. DORFMAN, *Annu. Rev. Biochemistry* **26**, 523 (1957).
- [20] L. T. SAMUELS, in «Metabolic Pathways», Vol. I, Ed. D. M. GREENBERG, Acad. Press, New York 1960, p. 431.
- [21] J. K. GRANT, *Sympos. biochem. Soc.* **78**, 24 (1960).
- [22] I. D. K. HALKERSTON, J. EICHORN & O. HECHTER, *J. Biol. Chemistry* **236**, 374 (1961).
- [23] R. B. YOUNG, M. J. BRYSON & M. L. SWEAT, *Arch. Biochem. Biophysics* **109**, 233 (1965).
- [24] D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL, V. J. PILEGGI & W. S. BLAKEMORE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **104**, 52 (1960).
- [25] G. ROSENFELD, *Amer. J. Physiol.* **200**, 477 (1961).
- [26] J. K. GRANT, *Biochem. J.* **64**, 559 (1956); J. K. GRANT & K. MONGKOLKUL, *ibid.* **69**, 36 P (1958).
- [27] P. F. HALL & S. B. KORITZ, *Endocrinology* **75**, 135 (1964); F. DE VENTURO & U. WESTPHAL, *Biochim. biophysica Acta* **54**, 294 (1961); S. B. KORITZ & F. G. PERÓN, *J. Biol. Chemistry* **234**, 3122 (1959).
- [28] R. E. DAILEY, A. E. REEVES, L. SWELL & C. R. TREADWELL, *Endocrinology* **70**, 322 (1962).
- [29] R. A. VAN DYKE, G. WOLF & B. C. JOHNSON, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **3**, 123 (1960).
- [30] A. E. KITABCHI, *Nature* **203**, 650 (1964).
- [31] K. W. MCKERNS, *Biochim. biophysica Acta* **90**, 357 (1964).
- [32] H. REICH, D. H. NELSON & F. X. GASSNER, *Fed. Proc.* **10**, 331 (1951); I. E. BUSH, *Ciba Found. Coll. Endocrinol.* **7**, 210 (1953); F. E. YATES & J. URQUHART, *Physiol. Rev.* **62**, 359 (1962).
- [33] R. I. DORFMAN & F. UNGAR, *Metabolism of Steroid Hormones*, Burgess, Minneapolis 1953; G. PINCUS, *Proc. IVth Internat. Congr. Biochemistry*, Vol. 4, p. 61 (1959), Pergamon Press, Oxford.
- [34] J. K. GRANT, *Brit. med. Bull.* **78**, No. 2 (1962), p. 99.
- [35] O. HECHTER, in R. P. COOK (ed.), *Cholesterol*, Academic Press, New York 1958, p. 309.
- [36] G. CONSTANTOPOULOS & T. T. TCHEN, *J. Biol. Chemistry* **236**, 65 (1961); G. CONSTANTOPOULOS & P. SATOH, *Fed. Proc.* **21**, 298 (1962).
- [37] M. J. BRYSON & M. L. SWEAT, *Arch. Biochem. Biophysics* **96**, 1 (1962).
- [38] P. A. SRERE, I. L. CHAIKOFF & W. G. DAUBEN, *J. Biol. Chemistry* **176**, 829 (1948).
- [39] O. HECHTER, M. M. SOLOMON, A. ZAFFARONI & G. PINCUS, *Arch. Biochem. Biophysics* **46**, 201 (1953).
- [40] E. CASPI, R. I. DORFMAN, B. T. KHAN, G. ROSENFELD & W. SCHMID, *J. Biol. Chemistry* **237**, 2085 (1962).
- [41] J. EICHORN & O. HECHTER, *Arch. Biochem. Biophysics* **84**, 196 (1959).
- [42] H. LEVY, D. I. CARGILL, CH. HWA CHA, B. HOOD & J. J. CARLO, *Steroids* **5**, 131 (1965).
- [43] K. SHIMIZU, M. HAYANO, M. GUT & R. I. DORFMAN, *J. Biol. Chemistry* **236**, 695 (1961); K. SHIMIZU, M. GUT & R. I. DORFMAN, *ibid.* **237**, 699 (1962); A. C. CHAUDHURI, Y. HARADA, K. SHIMIZU, M. GUT & R. I. DORFMAN, *ibid.* **237**, 703 (1962); W. S. LYNN, E. STAPLE & S. GURIN, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 4048 (1954); S. SOLOMON, P. LEVITAN & S. LIEBERMAN, *Rev. can. Biol.* **15**, 282 (1956); K. SHIMIZU, R. I. DORFMAN & M. GUT, *J. Biol. Chemistry* **235**, PC 25 (1960); G. CONSTANTOPOULOS, P. S. SATOH & T. T. TCHEN, *Biochem. biophysic Res. Commun.* **8**, 50 (1962); T. T. TCHEN, 6th Internat. Congr. Biochemistry, New York 1964, Abstr. VII-86.
- [44] E. CASPI, G. ROSENFELD & R. I. DORFMAN, *J. org. Chemistry* **27**, 814 (1956).
- [45] H. WERBIN & I. L. CHAIKOFF, *Arch. Biochem. Biophysics* **93**, 476 (1961); A. A. KRUM, M. D. MORRIS & L. L. BENNETT, *Endocrinology* **74**, 543 (1964).
- [46] R. G. GOULD, in R. P. COOK (ed.), *Cholesterol*, Academic Press, New York 1958, p. 209.
- [47] D. L. BERLINER, D. M. CAZES & CH. J. NABORS JR., *J. Biol. Chemistry* **237**, 2478 (1962).
- [48] D. I. CARGILL & R. P. COOK, *Biochem. J.* **93**, 504 (1964).
- [49] F. A. HARTMANN & K. A. BROWNELL, *The Adrenal Gland*, Philadelphia 1949.
- [50] J. C. MELBY, T. E. WILSON & S. L. DALE, *J. clin. Invest.* **43**, 1282 (1964); E. M. BOYD, *J. Biol. Chemistry* **143**, 131 (1942).

- [51] L. D. WRIGHT, *Annu. Rev. Biochem.* **30**, 525 (1961).
[52] R. E. DAILEY, L. SWELL & C. R. TREADWELL, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **110**, 571 (1962).
[53] C. LONGCOPE & R. H. WILLIAMS, *Endocrinology* **72**, 735 (1963).
[54] G. SHYAMALA, W. J. LOSSOW & I. L. CHAIKOFF, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **118**, 138 (1965).
[55] R. E. DAILEY, L. SWELL & C. R. TREADWELL, *Arch. Biochem. Biophysics* **100**, 360 (1963);
K. GRIFFITHS, J. K. GRANT & T. SYMINGTON, *J. clin. Endocrinol. Metabol.* **23**, 776 (1963).
[56] N. M. DRAYER, K. D. ROBERTS, L. BANDI & S. LIEBERMAN, *J. biol. Chemistry* **239**, PC 3112 (1964).
[57] M. C. LEBEAU & E. E. BAULIEU, *Endocrinology* **73**, 832 (1963); J. B. ADAMS, *Biochim. biophysica Acta* **82**, 572 (1964).
[58] D. W. KILLINGER & S. SOLOMON, *J. clin. Endocrinol.* **25**, 290 (1965).
[59] K. D. ROBERTS, L. BANDI, H. I. CALVIN, W. D. DRUCKER & S. LIEBERMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 958 (1964); H. I. CALVIN & S. LIEBERMAN, *Biochemistry* **3**, 259 (1964).
[60] K. SAVARD & P. J. CASEY, *Endocrinology* **74**, 599 (1964).
[61] P. Y. AYRES, J. EICHHORN, O. HECHTER, N. SABA, J. F. TAIT & S. A. S. TAIT, *Acta endocrinol.* **33**, 27 (1960).
[62] J. H. LARAGH & W. G. KELLY, *Advances in Metabolic Disorders* **1**, 217 (1964).
[63] ST. ULICK, G. L. NICOLIS & K. K. VETTER, in *Aldosterone*, BAULIEU & ROBEL, Eds., CIOMS Symposium, Prague 1963, Blackwell, Oxford 1964, p. 3.
[64] ST. ULICK, E. GAUTIER, K. K. VETTER, J. R. MARKELLS, S. YAFFEE & C. U. LOWE, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **24**, 669 (1964).
[65] A. WETTSTEIN, *Verh. deutsch. Ges. inn. Med.* **68**. Kongress, 1962, p. 582.
[66] T. SANDOR & A. LANTHIER, *Acta endocrinol.* **42**, 355 (1963).
[67] J. R. PASQUALINI, *Nature* **201**, 501 (1964).
[68] G. L. NICOLIS & ST. ULICK, *Endocrinology* **76**, 514 (1965).
[69] H. K. A. VISSER & W. S. COST, *Acta endocrinology* **47**, 589 (1964).
[70] A. E. SOBEL & P. E. SPOERRI, *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 1259 (1941).
[71] J. R. CLAUDE, *J. Chromatogr.* **17**, 596 (1965).
[72] M. L. SWEAT & M. J. BRYSON, *Endocrinology* **76**, 773 (1965).
[73] A. CARBALLEIRA, A. MEHDI & E. H. VENNING, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **119**, 751 (1965).
[74] R. I. DORFMAN, & D. C. SHARMA, *Steroids* **6**, 229 (1965).
[75] I. WELIKY & L. L. ENGEL, *J. biol. Chemistry* **237**, 2089 (1962).
[76] R. B. BILLIAR, A. ORIOL-BOSCH & K. B. EIK-NES, *Biochemistry* **4**, 457 (1965).

159. FRIEDEL-CRAFTS-Reaktionen mit aromatischen Äthern

1. Mitteilung

Die Herstellung von Alkoxy-indanonen-(1)

von F.-H. Marquardt

(9. VII. 65)

Indanone sind schon verschiedentlich mit Hilfe der FRIEDEL-CRAFTS-Reaktion aus aromatischen Verbindungen und Derivaten von α,β -ungesättigten Säuren hergestellt worden [1]. Diese Methode lässt sich jedoch im allgemeinen nicht auf Alkylphenyl-äther übertragen, da die als Katalysator für die FRIEDEL-CRAFTS-Reaktion gebräuchlichen LEWIS-Säuren die Äther-Gruppen in einer Nebenreaktion aufspalten [2].

Eine Möglichkeit, diese Ätherspaltung auszuschliessen, besteht darin, Polyphosphorsäure anstelle einer LEWIS-Säure [3] zu verwenden, da Alkoxygruppen von