

ENZYMATISCHE SYNTHESE VON $[5\alpha\text{-T}]\text{-DIHYDROTESTOSTERON}$

Ursula Lemm und Martin Wenzel
 Biol. Chem. Abt. Pharmazeut. Institut, Freie Universität
 Berlin.

Received December 19, 1975

Revised May 20, 1976

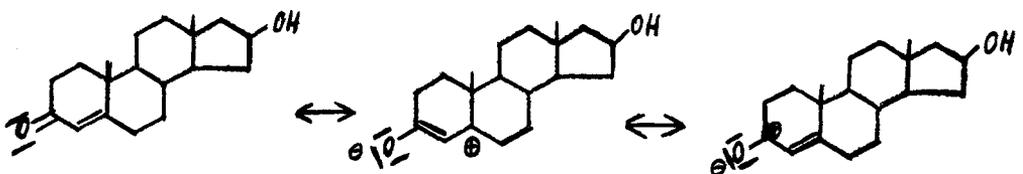
SUMMARY

$[5\alpha\text{-T}]\text{-Dihydrotestosteron}$ was labeled by the reduction of testosterone by NADP-T. Using liver microsomes of female rats only the 5α -labeled compound was gained.

Key Words: Dihydrotestosterone, Tritium, Liver Microsomes

In einer früheren Arbeit (1,2) konnten wir bei Ratten in vivo und in vitro eine HTO-Bildung aus $[5,6\text{-T}]\text{-}5\alpha\text{-Androstan-3,17-dion}$ nachweisen. Als Ursache für diese Tritium-Labilisierung wurde eine Dehydrierung an C-5 und C-4 diskutiert. Um diese offengebliebene Frage beantworten zu können, sollten entsprechende Versuche mit $[5\alpha\text{-T}]\text{-Dihydrotestosteron}$ ausgeführt werden. In der nachstehenden Arbeit beschreiben wir die Synthese dieser Verbindung.

Im Testosteron, einem α,β -ungesättigtem Keton hat die unterschiedliche Elektronenaffinität von Sauerstoff und Kohlenstoff eine Polarisierung der Carbonylgruppe zur Folge. Dementsprechend lassen sich nach Ringold et al. (3) folgende Grenzstrukturen formulieren:



oder nach Ansprühen mit Primulin-Lösung (12) bei 350 nm sichtbar gemacht.

Präparativer Teil

Inkubationsansatz (13): 1,0 ml Mikrosomensuspension = 200 mg Leber ♀
2,0 ml TRIS-HCl-Puffer pH 7,4 mit
ATP 1,2 μ Mol
NADP 0,8 μ Mol
MgCl₂ 10 μ Mol
0,5 ml Glucose-1-T 0,1 μ Mol = 530 μ Ci
0,1 ml Glucose 0,7 μ Mol
0,1 ml Hexokinase 19 μ g
0,1 ml Glucose-6-P-Dehydrogenase 5 μ g
0,1 ml Testosteron-Lsg. mit 1 μ Mol
in Äthanol

Nach der Inkubation (15 Min. bei 37°) wurden die Steroide 4 mal mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch in CHCl₃/Aceton 9:1 (Laufzeit 3 Std.) aufgetrennt. Das Radiochromatogramm (Abb. 1) zeigt, daß außer [5 α -T]-Dihydrotestosteron (R_F=0,78)* in geringer Ausbeute noch zwei weitere radioaktive Verbindungen, nämlich 3 α ,17 β -Androstandiol (R_F=0,54)* und 5 Δ -Androstandion (R_F=1,0)* gebildet wurden.

Test auf radiochemische Reinheit

Die radiochromatographische Reinheit des synthetisierten [5 α -T]-Dihydrotestosteron wurde bewiesen durch Rechromatographie in Chloroform/Tetrahydrofuran (96:1) und in Äther/Dimethylformamid (99:1) R_F-Wert: 0,38 bzw. 0,41. Die R_F-Werte waren mit denen von authentischem 5 Δ -Dihydrotestosteron identisch.

Die radiochemische Reinheit wurde außerdem folgendermaßen überprüft:

Eine Probe des radioaktiven Materials wurde mit 100 mg inaktivem 5 Δ -Dihydrotestosteron verdünnt und in verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Dabei blieb die spezifische Aktivität (ZpM/mg), die nach jeder Umkristallisation erneut bestimmt wurde, konstant. Somit konnte [5 α -T]-Dihydrotestosteron als radiochemisch rein bezeichnet werden.

* R_F-Werte bezogen auf 5 Δ -Androstandion (=1)

Tab.1: Umkristallisation von $[5\alpha-^3\text{T}]$ -Dihydrotestosteron		
	spez. Akt. (ZpM/mg)	Lösungsmittel
1.	1473	Essigester
2.	1618	Essigester
3.	1581	Essigester
4.	1534	Isopropanol
5.	1552	Isopropanol

Zur Kontrolle der spezifischen Markierung des Moleküls mit Tritium in Position 5 wurde das synthetisierte $[5\alpha-^3\text{T}]$ -Dihydrotestosteron nach der Methode von Abul-Hajj (14) enolisiert. Sinn der Enolisierung war es, eventuell am Kohlenstoff 4 eingebautes Tritium zu entfernen und als HTO nachzuweisen. Es konnten aber nach Enolisierung nur 0,4 % der eingesetzten Aktivität als HTO bestimmt werden. Dies spricht eindeutig gegen einen Tritium - Einbau an C-4, zumal das in so geringfügiger Menge abgespaltene Tritium auch von C-5 stammen kann.

Radiochemische Ausbeuten

Tab. 2 gibt eine Übersicht über Ausbeuten und spezifische Aktivitäten des synthetisierten $[5\alpha-^3\text{T}]$ -Dihydrotestosteron. Es fällt auf, daß die Ausbeuten zwischen 15 - 30 % der eingesetzten Aktivität schwanken. Die Ursache dafür konnte nicht geklärt werden. Die verschiedenen spezifischen Aktivitäten von $[5\alpha-^3\text{T}]$ -Dihydrotestosteron ergaben sich deshalb, weil unterschiedliche Mengen an Glucose-1-T eingesetzt wurden, während die Menge an inaktiver Glucose konstant 0,7 μMol pro Ansatz betrug.

Tab. 2: Synthese von [5 α -T]-Dihydrotestosteron

n	Glucose-1-T	[5 α -T]-Dihydrotestosteron		
	(μ Ci/Ans.)	μ Ci/Ans.	% d.eing.Akt.	spez.Akt. (μ Ci/ μ g)
1	525	86	16,4	656
1	469	125	26,6	595
2	589 \pm 22	124 \pm 13	21,3 \pm 3	692 \pm 25
4	492 \pm 7	119 \pm 33	19,2 \pm 5	620 \pm 8
4	624 \pm 24	99 \pm 19	15,8 \pm 3	763 \pm 24
4	406 \pm 33	135 \pm 8	33,4 \pm 4	500 \pm 52

Danksagung

Für finanzielle Unterstützung dieser Arbeiten danken wir der Stiftung Volkswagen-Werk, für materielle Unterstützung der Fa. Schering AG, Berlin.

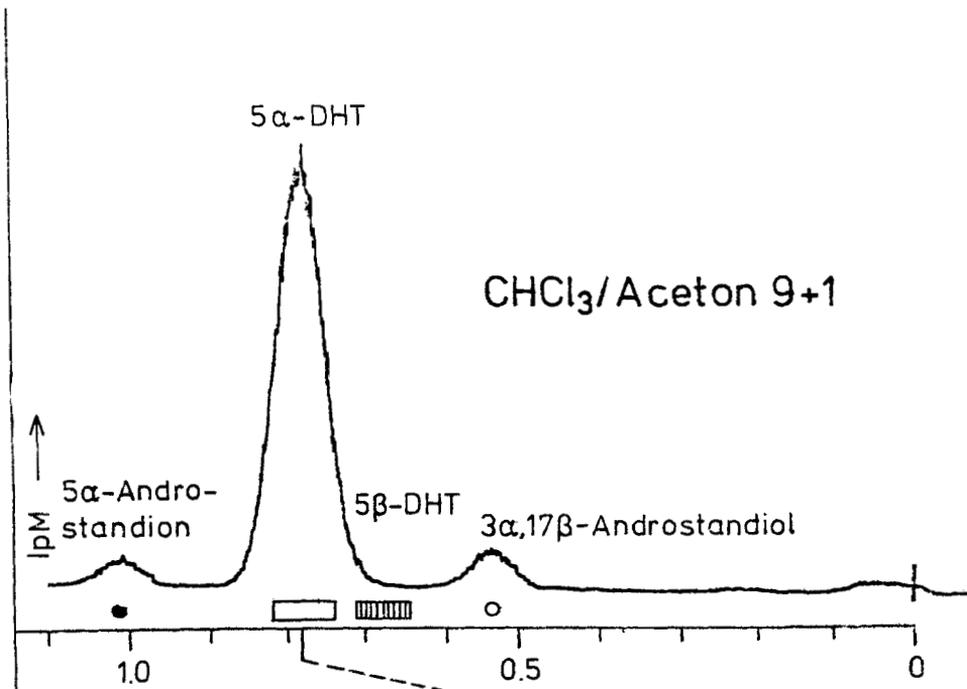


Abb. 1 DC-Reinigung von [5α -T]-Dihydrotestosteron

Ansatz gemäß Methodik. Auf einer DC-Platte wurden ca. 100 μ Ci entsprechend 60 μ g [5α -T]-Dihydrotestosteron auf einer Bahn von 2,5 cm Breite aufgetragen. R_F -Werte bezogen auf 5α -Androstandion (=1.0). Der 5α -DHT-Peak wurde abgeschabt, eluiert und rechromatographiert.

Literatur

1. Wenzel, M., Pitzel, L. und Bollert, B.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 335, 861 (1972)
2. Pitzel, L.
J. labelled Compound 9, 57 (1973)
3. Ringold, J.H., Ramachandran, S. Forchieli, E.
Biochim. Biophys. Acta 82, 143 (1964)
4. Mc.Guire, J., Tomkins, G.M.
Fed. Proc. 19 (1960) 29
5. Berseus, O., Björkhem, I.
Europ. J. Biochem. 2 (1967) 503
6. Björkhem, I., Danielsson, H.
Europ. J. Biochem. 12 (1970) 80
7. Björkhem, I.
Europ. J. Biochem, 8 (1969) 345
8. Schriefers, H., Cremer, W., Otto, M.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 138
9. Schriefers, H., Waßmuth, E., Lauffs, K.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 138
10. Wenzel, M., Wolf, S.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 1203
11. Simon, H. Herausgeber
Messungen von radioaktiven und stabilen Isotopen
Springer Verlag Berlin (1974) Seite 225
12. Wright, R.S.
J. Chromatogr. 59 (1971) 220

13. Bergmeyer, H.U.

Methoden der Enz. Analyse Bd. II
Verlag Chemie, Weinheim (1970) 1163

14. Abdul-Hajj

J.of labelled Compounds 7 (1971) 33