

## ABBAU VON STEROIDEN

### XII. ENZYMATISCHE BILDUNG EINES 5-RING-KETONS AUS DEM ENTSPRECHENDEN $\delta$ -LAKTON BEIM ABBAU VON PROGESTERON DURCH DEN PILZ *ASPERGILLUS FLAVUS*

K. SCHUBERT, K.-H. BÖHME, F. RITTER und CLÄRE HÖRHOLOD

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Zentral-Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena (Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll), Abteilung für Steroidforschung, Jena, DDR

(Received 15 March 1971)

#### SUMMARY

*Aspergillus flavus* degrades progesterone in the same way as bacteria, but an alternative pathway leads through testolactone to a corresponding keto acid with the remaining lactone ring. At this stage of metabolism the lactone ring was enzymatically reconverted into the 5-ring ketone.

#### EINLEITUNG

BAKTERIEN aus verschiedenen Gattungen, wie *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* und *Pseudomonas* können das Steranskelett abbauen[1]. Bei Pilzen ist ein solcher Abbau bisher nicht beschrieben worden. Von *Aspergillus flavus* sind zahlreiche Hydroxylierungsreaktionen und die Laktonisierung von Steroiden bekannt geworden[2]. Wir wählten diesen Stamm als Modell aus, um Struktur-Stoffwechselbeziehungen bei Steroiden zu untersuchen. Dabei wurde der Abbau des Steranskeletts bei Pilzen entdeckt, sowie in Abhängigkeit von Substrat und Fermentationsbedingungen alternative Stoffwechselwege aufgefunden. Überraschenderweise wurde ein neuer enzymatischer Reaktionstyp entdeckt. Die durch eine Laktonisierung hervorgerufene Öffnung einer C-C-Bindung im D-Ring kann auf einer späteren Stufe des Stoffwechsels wieder geschlossen werden.

#### MATERIAL UND METHODEN

##### *Substrate*

Zur fermentativen Darstellung der [2-<sup>3</sup>H-]Lakton-Abbau-Säure (VI) diente [16-<sup>3</sup>H-]Progesteron (I), welches zunächst mit *Penicillium chrysogenum* in [16-<sup>3</sup>H-]Testolacton (II) umgewandelt wurde[3]. Durch mikrobiellen Abbau dieser Verbindung mit *Nocardia restrictus* wurde die [2-<sup>3</sup>H-]Lakton-Säure (VI) erhalten[4].

##### *Chromatographie*

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel G (Merck) für Steroide in dem System Benzol/Äthylacetat (1:1, v/v) und für Abbausäuren in dem System Chloroform/Äthylacetat/Ameisensäure (5:4:1, v/v/v) ausgeführt. Die Papierchromatographie erfolgte absteigend auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 bm in den Systemen Bush B-1 Benzin (100-120°)/Benzol/Methanol/Wasser (5:5:7:3, v/v/v/v) und Toluol/tert. Butanol/Eisessig/Wasser (255:245:90:210, v/v/v/v) für Säuren. Die Abbausäuren wurden auf der Dünnschicht und auf dem

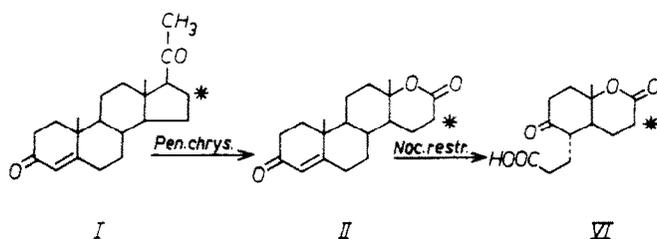


Abb. 1. Mikrobielle Darstellung der 2-<sup>3</sup>H-Lacton-Abbausäure (VI) aus 16-<sup>3</sup>H-Progesteron aus (I) über lestolaktone (II).

Papier mit einer 0,04%igen alkoholischen Lösung von Bromkresolgrün angefärbt. Als weitere Anfärbereagenzien kamen eine 0,2%ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl (für die Dünnschicht) und das Zimmermann-Reagens (für Papierchromatogramme) zur Anwendung. Das gaschromatographische Verhalten der Methylester der Abbausäuren wurde mit einem Gaschromatograph des Typs Aerograph 1520 unter folgenden Bedingungen untersucht: spiralförmige Glassäule 3000 × 2,5 mm (lichte Weite); 2% XE 60 auf Gaschrom Q (80–100 mesh). Flammenionisationsdetektor; Trägergas Argon; Säulentemperatur: 190°C, Injektor: 255°C, Detektor: 260°C. Die Ermittlung der genauen Retentionsdaten erfolgte mit dem elektronischen Digitalintegrator Modell 480 (Varian-Aerograph).

#### Radioaktivitätsmessungen

Die radioaktiven Dünnschicht- und Papierchromatogramme wurden mit einem Methandurchflußzählrohr und einem linearen Impulsdichteschreiber VA-D-53 (VEB Vacutronik) ausgewertet. Als Transportvorrichtung diente der Scanner LB 2721 der Firma Berthold (Wildbad). Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit dem Tri-Carb-Liquid Scintillation Spektrometer Modell 3375 (Packard). Als Scintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von PPO und POPOP in Toluol. Die Zähleffektivität lag bei 40%, der background betrug 35 cpm.

#### Fermentation

(a) 100 ml Malzwasser in einem 500 ml-Rundkolben wurden mit einer Schrägagarkultur von *Aspergillus flavus* 98/2, (Malzager, 3 Tage, 28°) beimpft. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 28°C auf einem Rundschwingtisch. Nach 48 Stunden wurden 20 mg Progesteron in 1 ml Azeton zugegeben und nach weiteren 48 Stunden wurde das Kulturmedium filtriert. Das gewaschene Mycel wurde bei –20°C für weitere Umwandlungsversuche (siehe c) aufbewahrt. Das Filtrat wurde vor der Aufarbeitung mit verd. HCl auf pH 3 eingestellt.

(b) *Aspergillus flavus* wurde wie vorher beschrieben angezüchtet. Nach 2 Tagen wurde das Mycel abfiltriert, mit einer Salzlösung—bestehend aus 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 1 Liter Wasser—gewaschen und in der gleichen Lösung resuspendiert. 10 mg Steroid bzw. Abbausäure, gelöst in 0,25 ml Aceton, wurden zu jeweils 100 ml Suspension gegeben. Die Umwandlung erfolgte innerhalb 48 Stunden bei 28°C unter Schütteln. Nach Abfiltrieren des Mycels wurde das Kulturfiltrat mit verd. HCl auf pH 3 angesäuert und wie nachstehend beschrieben aufgearbeitet.

(c) 2 g des nach der Fermentationsbedingung (b) mit Progesteron erhaltenen Mycels wurden in 100 ml der unter (b) beschriebenen Salzlösung resuspendiert, mit 10 mg Steroid oder Abbausäure 48–72 Std. bei 28°C unter Schütteln inkubiert und in analoger Weise weiter behandelt.

### Isolierung der Fermentationsprodukte

Das angesäuerte Filtrat wurde 3 mal mit Chloroform extrahiert. Die Auszüge wurden vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft. Der Rohextrakt wurde in Benzol/Äther (1:1, v/v) aufgenommen und zur Abtrennung der Abbausäuren 2 mal mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung ausgeschüttelt. Die  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wurde mit verd. HCl angesäuert und mit Chloroform extrahiert (Säure-Anteil). Die mit Wasser gewaschene und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknete Benzol-Ätherlösung ergab nach dem Eindampfen den Neutralanteil. Beide Anteile wurden in den entsprechenden Systemen dünn- und papierchromatographisch aufgetrennt. Die weitere Identifizierung der Substanzen erfolgte durch chromatographischen Vergleich mit Testsubstanzen sowie nach Elution und Kristallisation durch Schmelzpunkts- und Mischschmelzpunkts-Bestimmung.

### ERGEBNISSE

Bei der Biotransformation von Progesteron mit *Aspergillus flavus* unter Fermentationsbedingung (a) und (b) ließ sich nach 48-stündiger Inkubation nur noch ca 50% mit Chloroform extrahierbares Material auffinden. Davon konnten 5% saurer Anteil abgetrennt werden. Durch anschließende papier- und dünn- schichtchromatographische Untersuchungen wurden im Neutralanteil neben wenig 4-Androstendion und 1,4-Androstadiendion relativ viel Testololaktone und etwas 1-Dehydrotestololaktone sowie 3 nicht näher identifizierte polare Hydroxylierungsprodukte festgestellt. Aus dem sauren Anteil wurden papier- und anschließend dünn- schichtchromatographisch 3 verschiedene Abbausäuren isoliert und als die schon beschriebenen 7 $\alpha$ -Methylhexahydroindan-1,5-dion-4 $\alpha$  (3-propionsäure), 7 $\alpha$ -Methyl-5,6,7,7 $\alpha$ -tetrahydroindan-1,5-dion-4 $\alpha$ -(3-propionsäure) und 1-Methyl-cyclohexan-1-ol-4-on-2,3-dipropionsäurelacton identifiziert.

Die in Abb. 2 dargestellten Reaktionsfolgen wurden dadurch gesichert, daß die isolierten Umwandlungsprodukte einzeln wieder eingesetzt wurden: Die 3 Abbausäuren (VI, VII, VIII) wurden unter den Fermentationsbedingungen (a) und (b) nicht weiter umgewandelt. Dagegen gelang es mit einem Mycel von

Tabelle 1. Schmelzpunkte und chromatographisches Verhalten der mikrobiellen Transformationsprodukte

Isolierte Substanzen	Schmelzpunkt (°C)	$R_f$ -Wert		Retentionszeit des ME (min)
		PCG	DSC	
Testololaktone	208–210	0.35	0.33	
1-Dehydro-Testololaktone	217–219	0.14	0.25	
7 $\alpha$ -Methylhexahydroindan-1,5-dion-4 $\alpha$ -(3-propionsäure)	109–111	0.58	0.44	11,6
7 $\alpha$ -Methyl-5,6,7,7 $\alpha$ -tetrahydroindan-1,5-dion-4 $\alpha$ -(3-propionsäure)	139–142	0.50	0.42	3,4
1-Methyl-cyclohexan-1-ol-4-on-2,3-dipropionsäurelactone	129–131	0.25	0.29	58,6

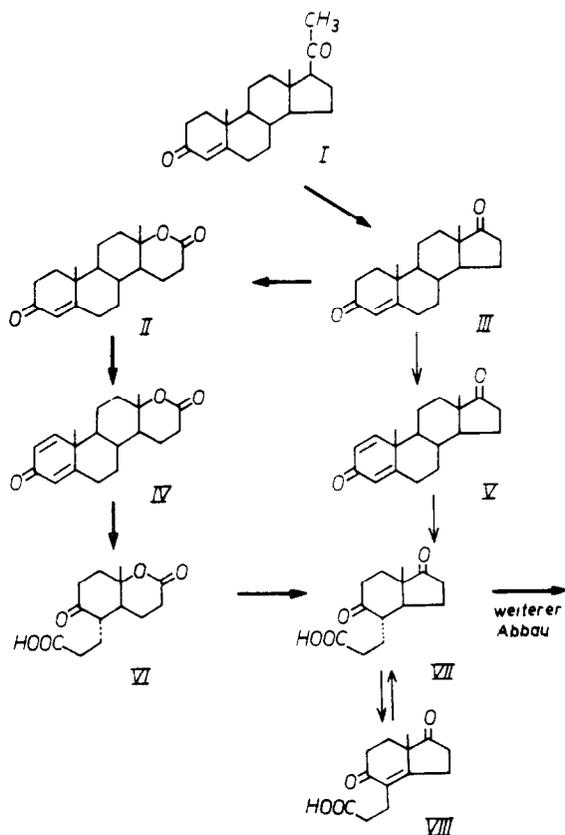


Abb. 2. Stoffwechselwege des Progesterons bei *Aspergillus flavus*.

*Aspergillus flavus*, welches mit Progesteron induziert worden war (Fermentationsbedingung (c)), die Abbausäure VIII in die Abbausäure VII zu überführen und letztere vollständig abzubauen (Tabelle 2). Überraschenderweise wurde unter diesen Bedingungen die Abbausäure VI mit Laktoring in die Abbausäure VII mit dem 5-Ringketon umgewandelt. Um diesen Befund abzusichern und um die Möglichkeit der Bildung von Abbausäure VII aus dem zur Induktion eingesetzten Progesteron auszuschließen, wurde Abbausäure VII eingesetzt, die in Position 2 mit Tritium markiert war. Die Position 2 der Abbausäure entspricht der Position 16 der Steroidnomenklatur. Es wurden Fermentationsansätze unter der Bedingung (c) durchgeführt, bei denen unterschiedliche spezifische Aktivitäten für die eingesetzte Abbausäure angewendet wurden. Bei beiden Ansätzen konnte radioaktive Abbausäure VII gefunden werden, wobei deren spezifische Aktivität mit der theoretisch zu erwartenden übereinstimmte.

	Ansatz 1	Ansatz 2
Spez. Akt.	VI: $5,63 \times 10^6$	VI: $23,6 \times 10^6$
dpm/m mole	VII: $5,56 \times 10^6$	VII: $24,9 \times 10^6$

Die Ausbeuten an Abbausäure VII lagen bei 25% (Ansatz 1) und 60%

Tabelle II. Umwandlung bzw. Abbau von Progesteron unter verschiedenen Fermentationsbedingungen: a = Malzwasserkultur, b = Mycel in Mineralsalzlösung, c = progesteroninduziertes Mycel in Mineralsalzlösung, + Umwandlung bzw. Abbau nach Abb. 1, — keine Umwandlung oder Abbau

Substrat	Fermentationsbedingung		
	a	b	c
Progesteron	+	+	+
Testololakton	+	+	+
Abbausäure VI	—	—	+
Abbausäure VII	—	—	+
Abbausäure VIII	—	—	+

(Ansatz 2) des sauren Anteils. Die  $R_f$ -Werte auf Dünnschicht- und Papierchromatogrammen, die Retentionszeit sowie der Schmelzpunkt stimmten mit den Werten der authentischen Abbausäure VII überein.

Aus Ansatz 2 wurden  $5 \mu\text{g}$  des Methylesters (ME) der Abbausäure VII einer Gaschromatographie unterzogen, der entsprechende Peak fraktioniert und die Radioaktivität gemessen. Es wurde ein Wert von 446 dpm über dem Nulleffekt ermittelt. Aus diesem Wert errechnet sich eine spezifische Aktivität von  $22,5 \times 10^6$  dpm/mol, die mit den oben angegebenen Werten übereinstimmt.

#### DISKUSSION

$C_{27}$ -,  $C_{24}$ -,  $C_{21}$ - und  $C_{19}$ -Steroide werden bei Bakterien nach einem einheitlichen Schema über eine Perhydroindansäure (VII) abgebaut. Bei Pilzen, z.B. bei *Aspergillus flavus*, gibt es Alternativwege des Steroidstoffwechsels und so interessiert die Frage, ob auch hier der gleiche Abbauweg beschrrieben wird. Die Auffindung der gleichen Perhydroindansäure als Abbauprodukt des Progesterons bei Bakterien und Pilzen weist erneut auf die prinzipielle Einheitlichkeit biochemischer Prozesse in der Natur hin. Der Abbau des Steranskeletts nach den bekannten Mechanismen beginnt mit einer Öffnung des Ringes B. Insofern war die Frage zu prüfen, ob über die bei *Aspergillus flavus* bekannte Öffnung des 5-Ringes zu einem Lakton ein weiterer Abbau möglich ist. Hier ergab sich nun die erstaunliche Feststellung, daß die aus dem Testololakton erhaltene Abbausäure VI unter Entfernung des Sauerstoffs aus Ring D in die Perhydroindansäure VII überführt wird. Es handelt sich hierbei um die Knüpfung einer C-C-Bindung zu einem carbocyclischen Ring aus einem heterocyclischen Ring. Für die enzymatische Transformation eines 6-Ring-Laktone in ein 5-Ring-Keton ist uns kein Beispiel bekannt. Bemerkenswert ist der Umstand, daß die Eliminierung des Sauerstoffs und der Abbau der Perhydroindansäure nur nach Induktion des *Aspergillus flavus* mit Progesteron erfolgt. Mit dem enzymatischen Schritt VI  $\rightarrow$  VII ist eine Verknüpfung von 2 Stoffwechselwegen gegeben.

#### LITERATUR

1. C. Hörhold, K.-H. Böhme und K. Schubert: *Z. allg. Mikrobiol.* **9** (1969) 235. Sammelbericht.
2. D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub und L. M. Reineke: *J. Am. chem. Soc.* **75** (1953) 5768.
3. J. Fried, R. W. Thoma und A. Klingsberg: *J. Am. chem. Soc.* **75** (1953) 5764.
4. K. Schubert, K.-H. Böhme und C. Hörhold: Patent (DDR) No. 76014.