

ABBAU VON STEROIDEN

XIII. HYDROXYLIERUNG VON 17 α -METHYLÖSTRADIOL IN 2-, 4- UND 6 α -STELLUNG DURCH *ASPERGILLUS FLAVUS*

K. SCHUBERT, H. GROH und CLÄRE HÖRHOLO

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

2-, 4- and 6 α -Monohydroxylation products of 17 α -methyl-*estradiol** have been obtained from fermentation cultures of *Aspergillus flavus*. The physical properties and the kinetical investigation of the microbiological metabolites are discussed.

EINLEITUNG

ÜBER DIE mikrobielle Hydroxylierung von Östrogenen ist relativ wenig bekannt geworden. 1964 fanden Fried *et al.*, daß Östrogene durch Pilze der Gattung *Aspergillus* in 7 α -bzw. 15 α -Stellung hydroxyliert werden [1, 2]. Bei Untersuchungen in der Reihe der C₁₉-Steroide fanden wir, daß *Aspergillus flavus* ebenfalls in 7 α -Stellung hydroxyliert, während ein in 17 α -Stellung methylsubstituiertes Testosteron in die 15 α -Hydroxyverbindung umgewandelt wird. Die 17 α -Methylgruppe verursachte also eine Verschiebung der Hydroxylierung von 7 α nach 15 α [3, 4]. In der C₁₈-Reihe gelang es uns nicht, ausgehend von Östradiol bei der Fermentation mit diesem Stamm, Hydroxylierungsprodukte zu fassen. Die mikrobielle Umwandlung des 17 α -methylsubstituierten Östradiols führte dagegen zu drei bei Östratrienen noch nicht beschriebenen mikrobiellen Hydroxylierungsprodukten. Der Strukturbeweis für die Positionen 2, 4 und 6 sowie die Untersuchung der physikalischen Eigenschaften der Monohydroxylierungsprodukte ist Gegenstand vorliegender Arbeit. Da in ortho-Stellung hydroxylierte Steroide als Vorstufen des biologischen Abbaues von Steroiden betrachtet werden müssen [5], wurde mit [³H]-17 α -Methylöstradiol** die Kinetik des Umwandlungsverlaufes untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

17 α -Methylöstradiol wurde aus Östron durch Umsetzung mit Lithiummethyl in Tetrahydrofuran/Diäthyläther hergestellt [6], F 192°–193°C. Mit Tritium markiertes 17 α -Methylöstradiol wurde ebenfalls aus Östron gewonnen, das zuvor nach Wilzbach [7] tritiiert worden war. Nach chromatographischer Reinigung erwies sich das markierte Produkt als einheitlich (spezifische Aktivität: 3.4 mC/mM). Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroheiztisch HMK Küstner-KG gemessen, die UV-Spektren mit einem Unicam SP 700, die IR-Spektren nach einer Mikromethode [8] mit einem UR 10 VEB Carl Zeiss, Jena, registriert. Die NMR-Aufnahmen der orthohydroxylierten Östrogene wurden mit einem

* 17 α -Methyl-1.3.5(10)-*estratrien*-3.17 β -diol.

** 17 α -Methyl-1.3.5(10)-*östratrien*-3.17 β -diol.

Varian HA-100 Spektrometer, die übrigen mit einem ZKR 60 VEB Carl Zeiss, Jena, aufgenommen.

Die radioaktiven Proben wurden in einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3375 in Toluol/Alkohol unter Verwendung von POP und POPOP gemessen, die radioaktiven Dünnschicht-Platten auf einem Berthold-Dünnschicht-Scanner ausgewertet.

Aspergillus flavus wurde 4 Tage bei 28°C auf Malzagar-Schrägröhrchen angezüchtet. Mit einem Schrägröhrchen wurden zwei 500 ml – Rundkolben mit je 100 ml Malzwasser beimpft. Nach zweitägiger Schüttelkultur bei 28°C wurden pro Kolben 10 mg Steroid, gelöst in 1,5 ml Aceton, zugegeben und unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Das mit Essigsäure auf pH 3–4 angesäuerte Kulturfiltrat wurde 5 mal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert, der Extrakt im Vakuum zur Trockene gebracht und die Hydroxylierungsprodukte durch mehrmalige präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Merck) isoliert. Zur Anfärbung der Östrogene auf der Dünnschicht wurde mit einer 10% igen alkoholischen Phosphorwolframsäure-Lösung besprüht und anschließend 15 Minuten auf 130°C erhitzt.

ERGEBNISSE

Aus dem Rohextrakt der *Aspergillus flavus*-Kultur nach zwei- bis dreitägiger Fermentation von 17 α -Methylöstradiol (I) konnte durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel im System Cyclohexan/Äthylacetat (1 : 1) ein polares, mit Phosphorwolframsäure braun anfärbares Umwandlungsprodukt II (R_f 0,45) von zwei weniger polaren Metaboliten VII (R_f 0,7) und VIII (R_f 0,85) und dem nichtumgesetzten Substrat I (R_f 1) abgetrennt werden. Dieses polare Umwandlungsprodukt II kristallisierte aus Chloroform und zeigte im Massenspektrum (s.u.) den Molmassenwert eines Monohydroxyproduktes des 17 α -Methylöstradiols. Mit Chrom-Schwefelsäure in Aceton [9] konnte II zur entsprechenden 6-Keto-Verbindung IV (Schema 1) oxydiert werden. Damit in Übereinstimmung waren das UV-Spektrum: λ Äthanol max 224, 258 (und 330) nm und das IR-Spektrum, das lediglich eine CO-Absorption bei 1670 cm^{-1} aufwies. Nach Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe (V) mußte eine Natriumborhydrid-Reduktion in Analogie zur Reduktion von 3,17 β -Diacetoxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on (10) zum 6 α -Hydroxy-Epimeren VI führen [11, 17], das nach Verseifung mit II oder nach Acetylierung der 6 α -Hydroxy-Gruppe mit dem Diacetat III der Grundverbindung II identisch war.

17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,6 α , 17 β -triol (II)

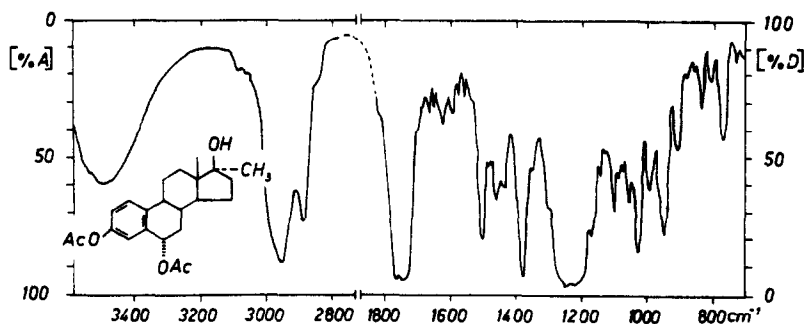
F 226°C; UV-Spektrum (Äthanol): λ_{max} 222, 285, 287 (Schulter) nm;

Massenspektrum (Tv 80°C): M/e⁻ 301 (M-1), 283 (301–18, H₂O-Abspaltung),
265 (301–2·18, Abspaltung von 2H₂O)

(Tv 90°C): M/e⁺ 302 (M), 284 (M-18, H₂O-Abspaltung),
266 (M-2·18, Abspaltung von 2H₂O).

3,6 α -Diacetat (III). UV-Spektrum (Äthanol): λ_{max} 269, 276 nm; NMR-Spektrum (CDCl₃) δ_{TMS} 0.90 (18-CH₃), 1.28 (17 α -Methyl), 2.14 und 2.29 (3-O-CO-CH₃ und 6 α -O-CO-CH₃), 6.10(m, 6 β -H), 6.90(4-H) ppm.

Die beiden Umwandlungsprodukte VII und VIII ließen sich dünnschichtchromatographisch im System Cyclohexan/Chloroform/Äthanol (46:46:8)



IR 1. IR-Spektrum von 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,6 α ,17 β -triol-3,6 α -diacetat (III).

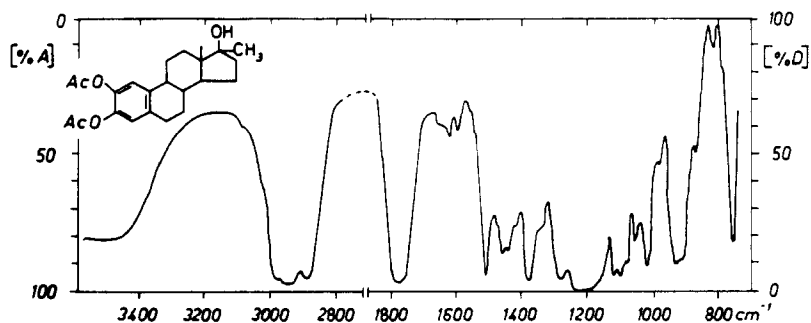
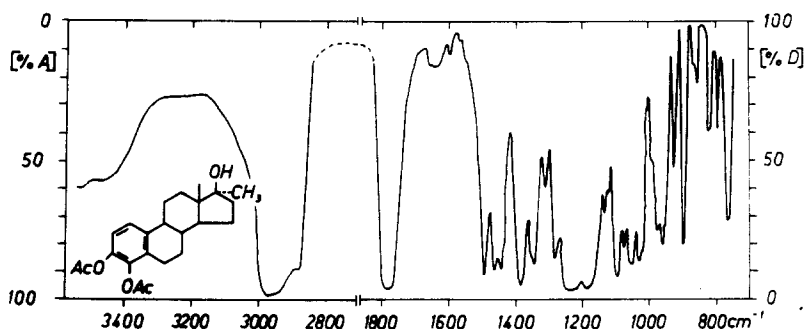
an Kieselgel präparativ trennen und mit Chloroform/Methanol (9:1) extrahieren. VII färbte sich mit Phosphorwolframsäure rot. VIII orange. Beide Produkte erwiesen sich als äußerst empfindlich gegenüber Alkalien, so daß sie nach der üblichen alkalischen Extraktion der Phenole und anschließenden Reextraktion aus dem angesäuerten Auszug nicht zu erhalten waren. Bei strengem Sauerstoffausschluß während der Alkali-Behandlung konnten die Produkte aber unverändert zurückgewonnen werden. Die Massenspektren der Acetate von VII und VIII (IX und X) lieferten Molmassenwerte, die in beiden Fällen eine Monohydroxylierung anzeigten. Die Alkaliempfindlichkeit der Verbindungen ist nur mit einer ortho-Dioxybenzol-Struktur erklärbar, so daß es sich bei diesen Metaboliten um 2- bzw. 4-Hydroxy-17 α -methylöstradiol handeln mußte. Zur weiteren Differenzierung wurden die charakteristischen Verschiebungen der UV-Absorption beider Verbindungen im Vergleich zu 2-Hydroxy-östradiol-17 β und 4-Hydroxy-östron im alkalischen Milieu gemessen. Dazu wurde 1 ml einer 10⁻⁴M alkoholischen Lösung des Steroides mit 5 Vol. % 1/100 N bzw. 1 N KOH versetzt und die Extinktion nach 3 und 10 Minuten mit einem UV-Spektrographen gemessen (Abb. 1).

17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-2,3,17 β -triol (VII)

UV-Spektrum (Äthanol): λ_{\max} 287 nm. 2,3-Diacetat (IX): F 149°–150°C; UV-Spektrum (Äthanol): λ_{\max} 270, 278 nm; NMR-Spektrum (CDCl₃): δ_{TMS} 0,88 (s, 18-CH₃), 1,26 (s, 17 α -Methyl), 2,27 (s, 2- und 3-O-CO-CH₃), 6,86 (s, 4-H), 7,06 (s, 1-H), (siehe Abb. 2). Massenspektrum (Tv 150–180°C): M/e⁺ 386 (M), 368 (M-18, H₂O-Abspaltg.), 344 (M-42, CH₂CO-Abspaltung; Acetat!), 326 (M-18-42), 302 (M-2·42, Abspaltung von 2CH₂CO; Diacetat!), 284 (302–18 bzw. 368–2·42).

17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,4,17 β -triol (VIII)

F 250°–256°C; UV-Spektrum (Äthanol): λ_{\max} 282 nm. 3,4-Diacetat (X): F 183°C; UV-Spektrum (Äthanol): λ_{\max} 263, (272) nm; NMR-Spektrum (CDCl₃): δ_{TMS} 0,87 (s, 18-CH₃), 1,27 (s, 17 α -Methyl), 2,26 (s) und 2,29 (s, 3- und 4-O-CO-CH₃). 6,97 (d, J = 8,5 Hz, 2-H), 7,20 (d, J = 8,5 Hz, 1-H), (siehe Abb. 2); Massenspektrum (Tv 120°C): M/e⁺ 386 (M), 344 (M-42, CH₂CO-Abspaltung; Acetat!), 302 (M-2·42, Abspaltung von 2CH₂CO; Diacetat!), 284 (302–18, H₂O-Abspaltung).

IR 2. IR-Spektrum von 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-2,3,17 β -triol-2,3-diacetat (IX).IR 3. IR-Spektrum von 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,4,17 β -triol-3,4-diacetat (X).

Durch den Einsatz von 100 μ C radioaktiv markiertem 17 α -Methylöstradiol, das – mit inaktivem Material auf 10 mg verdünnt – in üblicher Weise fermentiert wurde, war es möglich, den Substratumsatz quantitativ zu verfolgen (Abb. 3). Die Radioaktivität der nach Dünnschichtchromatographie getrennten Metaboliten und des Substrates sind zur jeweiligen Gesamt-Radioaktivität des Chloroformextraktes des Kulturfiltrates ins Verhältnis gesetzt. Danach stellt die 6-Hydroxyverbindung das Hauptprodukt dar, während die 2- und 4-Hydroxyverbindungen nur intermediär gebildet werden. Mit der Zeit nimmt der Anteil hochpolarer und saurer Metaboliten im Chloroformextrakt des Kulturfiltrates zu.

DISKUSSION

Die Auffindung der mikrobiellen 2-, 4- und 6-Hydroxylierung von Östrogenen ermöglichte die Herstellung der bisher nicht beschriebenen Verbindungen II, VII und VIII. Die Identifizierung dieser Transformationsprodukte des 17 α -Methylöstradiols wurde erleichtert durch den Vergleich mit den publizierten Daten von auf anderem Wege hergestellten Analogen ohne Methylgruppe in 17 α -Stellung [10, 12, 13] (Tabelle 1).

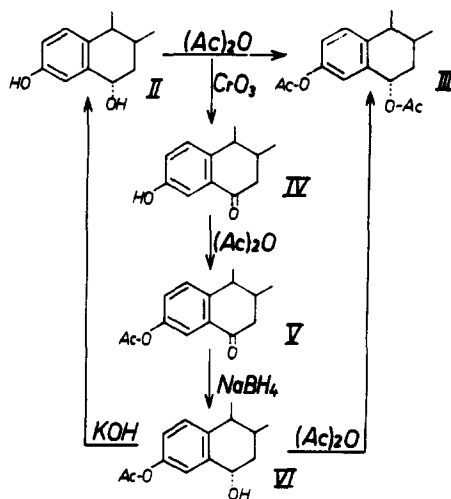
Die 6-Stellung der OH-Gruppe in II ist durch die Überführung in das 6-Keton hinreichend bewiesen, das sich auf Grund der Nähe zu dem aromatischen Ring A durch den niedrigen Wert von 1670 cm^{-1} der CO-Bande im IR-Spektrum und eine charakteristische Verschiebung im UV-Spektrum auszeichnet [14]. Das weiter entfernte 11-Keton würde eine Keto-Bande von über 1700 cm^{-1} liefern [15]. Die 6 α -Konfiguration der eingeführten OH-Gruppe konnte auf dem in

Tabelle 1. Vergleich der UV-Absorptionsmaxima der Hydroxylierungsprodukte des 17 α -Methylöstradiols mit Literaturwerten entsprechender Hydroxylierungsprodukte von Östron bzw. Östradiol-17 β

Stellung der OH-Gruppen in den Ringen A u. B	UV-Absorptionsmaxima	
	Typ 17 α -Methylöstradiol	Typ Östron/Östradiol
3	282	282
(Acetat)	(269, 276)	(269, 276)
2,3	287	289
(Diacetat)	(270, 278)	(271, 277)
3,4	282	282
(Diacetat)	(263, 272 s)	(263)
3,6	222, 285, 287 s	222, 282, 287 s
(Diacetat)	(269, 276)	(270, 276)

Schema 1 dargestellten Wege bewiesen werden. Von den beiden 6-epimeren 3,6-Diacetaten sind Unterschiede in den IR-Spektren zwischen 800 und 1200 cm^{-1} zu erwarten [10]. Da die Reduktion eines 6-Ketons mit Natriumborhydrid in die 6 α -Reihe führt [10, 11, 17] und das Diacetat des Reduktionsproduktes mit dem Diacetat von II infrarot-spectrographisch identisch war, muß es sich bei II um das 6 α -Epimere handeln (Schema 1).

Die Verbindungen VII und VIII ließen sich schon mit geringsten Mengen (30 μg) anhand der in Abb. 1 dargestellten UV-Absorptionsmessungen dem 2- bzw. 4-Hydroxy-Derivat des 17 α -Methylöstradiols zuordnen. Im Verlaufe der Alkali-Behandlung tritt bei beiden ortho-Dioxybenzol-Typen zunächst eine bathochrome Verschiebung um etwa 10 nm auf. Während aber bei den 2,3-Dihydroxyverbindungen die Extinktion im gesamten Absorptionsbereich mit



Schema 1. Schema zum Strukturbeweis des 6 α -Produktes. II: 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,6 α ,17 β -triol; III: 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,6 α ,17 β -triol-3,6 α -diacetat; IV: 17 α -Methyl-3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on; V: 17 α -Methyl-3-acetoxy-17 β -hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on; VI: 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,6 α ,17 β -triol-3-monoacetat.

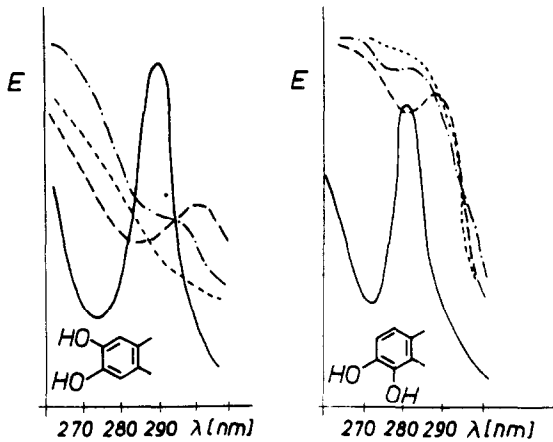


Abb. 1. Charakteristische Änderungen der UV-Spektren von 2,3- und 3,4-Dihydroxyöstratrienen in alkalischem Medium. — Extinktion in Äthanol. ----- Extinktion 3 Min. nach Zugabe von 5% 1/100 N KOH. - - - - - Extinktion 10 Min. nach Zugabe von 5% 1/100 N KOH, Extinktion 10 Min. nach Zugabe von 5% 1 N KOH.

fortschreitender Reaktion abnimmt, wird bei den 3,4-Dihydroxyverbindungen die Extinktion bis zu 280 nm zunehmend angehoben.

Besonders anschaulich für die Unterscheidung der 2,3- und 3,4-Dihydroxyverbindungen sind die NMR-Signale der Protonen des aromatischen Systems (Abb. 2). Für IX erhält man die beiden isolierten Signale des 1- und 4-Protons, während bei X die Kopplung der nachbarständigen Protonen am C1 und C2

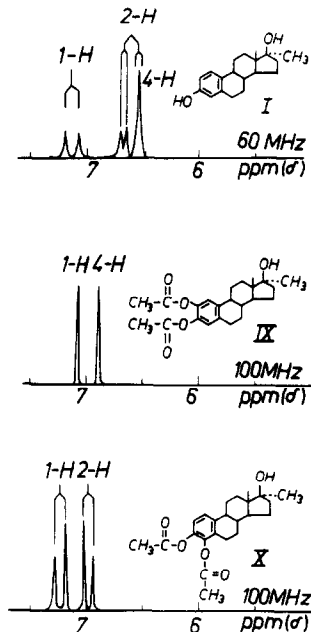


Abb. 2. NMR-Signale der Protonen am aromatischen Ring A von 17 α -Methylöstradiol (I), 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-2,3,17 β -triol-2,3-diacetat (IX) und 17 α -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,4,17 β -triol-3,4-diacetat (X).

sichtbar wird. Die im Gegensatz zu X vorhandene symmetrische Anordnung der Sauerstoff-Funktionen am Ring A in IX kommt noch darin zum Ausdruck, daß die Methylsignale der beiden Acetylgruppen von IX gemeinsam bei δ 2,27 ppm liegen, bei X dagegen bei 2,26 und 2,29.

Die kinetische Untersuchung des Umwandlungsverlaufes wurde mit einem nach Wilzbach markierten ^3H -17 α -Methylöstradiol als Ausgangssubstanz durchgeführt. Ein Teil der Radioaktivität geht bei der Hydroxylierung als tritiiertes Wasser verloren, so daß die quantitativen Untersuchungen mit einem Fehler behaftet sind. Dieser Fehler kann ungünstigstenfalls die Metaboliten II und III mit +100% behaften, wenn man als extremen Fall annimmt, daß die Markierung des Östrogens fast ausnahmslos in den Stellungen 2 und 4 erfolgt sei. Aber auch dann bleibt das Gesamtbild (Abb. 3) erhalten, nämlich daß die 2- und 4-Hydroxyprodukte gegenüber dem 6 α -Hydroxyprodukt und den weiteren Umwandlungsprodukten nur Durchgangsstufen darstellen. Das ist auch deshalb wahrscheinlich, weil einerseits die Autoxydations tendenz dieser Verbindungen sehr groß ist, zum anderen aber alle bisher aufgefundenen biologischen Abbaureaktionen von Phenolen und phenolischen Steroiden über ortho-Dihydroxy-Verbindungen verlaufen [5].

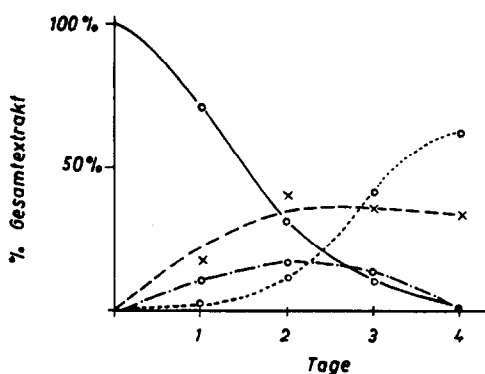


Abb. 3. Quantitativer Verlauf der Umwandlung von ^3H -17 α -Methylöstradiol durch *A. flavus*. — 17 α -Methylöstradiol, ——— 6 α -Hydroxy-Produkt, - - - - 2- und 4-Hydroxy-Produkte, polare Produkte.

Die Aufklärung des mikrobiellen Abbaues des Östradiol-17 β mit *A. flavus* ist Gegenstand einer weiteren Arbeit. Eine von uns dabei isolierte Abbausäure ist nicht identisch mit einem von Sih *et al.* [18] beschriebenen mikrobiellen Abbauprodukt des Östradiol-17 β , weist aber ebenfalls auf eine ortho-Hydroxylierung hin. Die mit *A. flavus* mit Östradiol-17 β erhaltenen Konjugate [19] sind aber keine Glutathion-Konjugate, wie sie von Jellinck *et al.* [20, 21], Kuss [22] sowie Marks und Hecker [23] mit Lebermikrosomen oder mikrobiellen Enzymen erhalten wurden.

Viele Untersuchungen [24–27] haben gezeigt, daß 2-Hydroxyöstrogene auch im Steroidmetabolismus des Säugetieres eine wichtige Rolle spielen.

ANERKENNUNG

Für die Unterstützung bei der Interpretation der NMR-Spektren danken wir Herrn Dr. G. Kaufmann.

LITERATUR

1. A. J. Laskin und J. Fried: *Bacteriol. Proc.* (1963) 106.
2. A. J. Laskin, B. Grabowich, B. Junta, C. Meyers und J. Fried: *J. org. Chem.* **29** (1964) 1333.
3. K. Schubert, J. Schlegel, H. Groh, G. Rose und C. Hörhold: *J. steroid Biochem.* **1** (1970) 237.
4. K. Schubert, J. Schlegel, H. Groh, G. Rose und C. Hörhold: *Endokrinologie* (in Vorbereitung).
5. K. Schubert, C. Hörhold, K.-H. Böhme, H. Groh, F. Ritter und W. Schumann: Mechanismen des Steroidabbaues. *Steroidologia* **1** (1970) 201.
6. E. Haack, G. Stoeck und H. Voigt: *Naturwissenschaften* **41** (1954) 429.
7. K. E. Wilzbach: *J. Am. chem. Soc.* **79** (1957) 1013.
8. K. Wehrberger: *Chem. Techn.* **10** (1958) 686.
9. C. Djerassi, R. R. Engle und A. Bowers: *J. Org. Chem.* **21** (1956) 1547.
10. O. Wintersteiner und M. Moore: *J. Am. chem. Soc.* **81** (1959) 442.
11. H. Breuer, R. Knuppen und G. Pangels: *Nature* **190** (1961) 720.
12. J. Fishman, M. Tomasz und R. Lehman: *J. org. Chem.* **25** (1960) 585.
13. L. L. Engel: *Physical Properties of the Steroid Hormones*. Pergamon Press, New York (1963).
14. R. Y. Kirdani und W. R. Slaunwhite, Jr.: *J. org. Chem.* **26** (1961) 2148.
15. B. Gadsby, M. R. G. Leeming, G. Greenspan und H. Smith: *J. chem. Soc. (C)* (1968) 2647.
16. S. Dagley, P. J. Chapman, D. T. Gibson und J. M. Wood: *Nature* **202** (1964) 775.
17. Th. Wolff und H. Dannenberg: *Chem. Ber.* **103** (1970) 917.
18. R. G. Coombe, Y. Y. Tsong, P. B. Hamilton und Ch. J. Sih: *J. biol. Chem.* **241** (1966) 1587.
19. K. Schubert und H. Groh: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 387.
20. P. H. Jellinck, J. Lewis und F. Boston: *Steroids* **10** (1967) 329.
21. P. H. Jellinck und J. S. Elce: *Steroids* **13** (1969) 711.
22. E. Kuss: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **349** (1968) 1234.
23. F. Marks und E. Hecker: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350** (1969) 69.
24. F. Marks und E. Hecker: *Biochim. biophys. Acta* **187** (1969) 250.
25. J. S. Elce: *Biochem. J.* **116** (1970) 915.
26. J. Fishman, H. Guzik und L. Hellman: *Biochemistry* **9** (1970) 1593.
27. T. Thorsen und K. F. Støa: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 43.