

# MIKROBIELLE HYDRIERUNG DES AROMATISCHEN SYSTEMS VON 17 $\alpha$ -ÄTHINYLÖSTRADIOL

K. SCHUBERT, G. ROSE und CLÄRE HÖRHOLO

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin.  
Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena, DDR

(Received 18 September 1972)

## SUMMARY

The first enzymatic hydrogenation of an aromatic system of steroids is described. 17 $\alpha$ -Ethinyl-estradiol (17 $\alpha$ -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 $\beta$ -diol) has been transformed by *Aspergillus flavus* to 10 $\beta$ -Hydroxyl-19-nor-ethisterone (17 $\alpha$ -Ethinyl-10 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-estren-3-one).

## EINLEITUNG

DIE ENZYMATISCHE Hydrierung des aromatischen Systems bei Steroiden wurde bisher nicht beschrieben. Bekannt sind Konjugatbildung, Hydroxylierungs- und Abbaureaktionen am aromatischen Ring A [1-6]. Da eine Hydrierung des aromatischen Systems als Stoffwechselreaktion nicht erwartet wurde, war es für uns um so erstaunlicher, in Fermentationskulturen von *Aspergillus flavus* mit 17 $\alpha$ -Äthinylöstradiol ein 4-en-3-Keton aufzufinden. Im nachfolgenden soll über Bildung, Isolierung und Identifizierung des neuen Metaboliten berichtet werden.

## MATERIAL UND METHODEN

### Steroide

Zur Fermentation wurden folgende Steroide verwendet: 17 $\alpha$ -Äthinylöstradiol (17 $\alpha$ -Äthinyl-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol) VEB Jenapharm, Noräthisteron (17 $\alpha$ -Äthinyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-östren-3-on) VEB Jenapharm, Lynestrenol (17 $\alpha$ -Äthinyl-4-östren-17 $\beta$ -ol) Upjohn und Norethynodrel (17 $\alpha$ -Äthinyl-17 $\beta$ -hydroxy-5(10)-östren-3-on) Searle.

### Fermentation

*Aspergillus flavus* 98/13 wurde 3 Tage bei 28°C auf Malzagarschrägröhrchen angezüchtet. Mit je einem Röhrchen wurden zwei 500 ml-Rundkolben, die 100 ml Malzwasser enthielten, beimpft und weitere zwei Tage bei 28°C auf einem Rundschwingtisch kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 mg Steroid, gelöst in 0,5 ml Aceton, je Kolben. Die Fermentation verlief in weiteren 2 Tagen ebenfalls bei 28°C auf dem Rundschwingtisch. Die gesamte Fermentationskultur wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert, die vereinigten Extrakte im Vakuum eingengt und zur Trockne gebracht.

### Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurden 80 × 20 cm große Glasplatten verwendet, die mit einer 1 mm dicken Schicht Kieselgel D (VEB Chemiewerk Greiz-Dölau) beschichtet wurden. Das Kieselgel enthielt 3% Leuchtstoff N 40 grün (VEB Leuchtstoffwerk Bad Liebenstein) zur Sichtbarmachung UV-positiver Substanzen bei 254 nm. Zur Identifizierung der Metaboliten wurden Platten mit Schichtdicken von 0,25 mm verwendet.

Zur Lokalisierung der Substanzen dienten neben der UV-Fluoreszenz verschiedene Anfärbeverfahren: Besprühen der Platten mit 10%iger alkoholischer Phosphorwolframsäurelösung und nachfolgende Erhitzung auf ca. 130°C und die Turnbullsblau-Reaktion mit 1%igen wäßrigen Lösungen von  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  für phenolische Substanzen.

#### *Verfahren zur Identifizierung*

Zum Vergleich des Schmelzpunktes, des dünn- und gaschromatographischen Verhaltens, der UV- und IR-Spektren wurde synthetisch hergestelltes  $17\alpha$ -Äthinyl- $10\beta$ ,  $17\beta$ -dihydroxy-4-östren-3-on verwendet. Außerdem wurden von der isolierten Substanz NMR- und Massenspektren angefertigt.

Zur Schmelzpunktbestimmung diente ein Mikroheiztisch der Firma Küstner-KG (Dresden). Die Messung der UV-Absorption in Äthanol erfolgte mit einem Unicam SP-700-Spektralphotometer. Die Infrarotspektren wurden unter Anwendung der Mikrotechnik (KBr-Pellets, Querschnitt 2 mm<sup>2</sup>, Schichtdicke 1 mm) mit einem UR10-Spektralphotometer (VEB Carl Zeiss, Jena) registriert. Die NMR-Aufnahmen wurden mit den Spektrometern HA-100 (Varian) und ZKR 60 (VEB Carl Zeiss, Jena) aufgenommen; Lösungsmittel  $\text{CDCl}_3$ , interner Standard Tetramethylsilan. Die Massenspektrometrie mit positiver und negativer Ionisierung wurde mit einem Gerät des Forschungsinstituts "Manfred von Ardenne" Dresden ausgeführt. Für die gaschromatographischen Bestimmungen wurde ein Aerograph 1520 unter folgenden Bedingungen verwendet: Glassäule, spiralförmig, 2000 × 2,5 mm (ID); 5% SE 30 auf Gaschrom Q (60–80 mesh); Flammenionisationsdetektor; Trägergas Argon, Säulentemperatur: 200°C, Detektor: 290°C, Injektor: 280°C.

#### *Ergebnisse*

Umwandlung von  $17\alpha$ -Äthinylöstradiol zu  $10\beta$ -Hydroxy- $19$ -noräthisteron ( $17\alpha$ -Äthinyl- $10\beta$ ,  $17\beta$ -dihydroxy-4-östren-3-on). Aus der Fermentationskultur von *Aspergillus flavus* mit  $17\alpha$ -Äthinylöstradiol wurden nach mehrmaliger Extraktion mit Chloroform und dünn- und gaschromatographischer Auftrennung 4 UV-positive Metaboliten aufgefunden, wovon drei als 4-, 6 $\alpha$ - und 6 $\beta$ -Monohydroxylierungsprodukte des  $17\alpha$ -Äthinylöstradiols identifiziert wurden (Publikation in Vorbereitung). Im System Cyclohexan/Butanol (v/v 10:3) konnte der 4. Metabolit mit dem Rf-Wert 0,46 durch ziegelrote Färbung mit Phosphorwolframsäure nachgewiesen werden. Durch präparative Dünn- und gaschromatographische Auftrennung wurden in 30% Ausbeute, bezogen auf eingesetztes  $17\alpha$ -Äthinylöstradiol, 14 mg dieses Metaboliten für die Identifizierung in reiner Form als rhombische Kristalle mit dem Schmelzpunkt 265–268°C (Aceton) isoliert. Bemerkenswerterweise war im UV-Spektrum die für phenolische Steroide charakteristische Bande bei 282 nm nicht zu beobachten; dagegen trat ein Absorptionsmaximum bei 235 nm auf, welches für eine 4-en-3-Ketogruppierung spricht. Die ausgeprägten Banden bei 1622 und 1670 cm<sup>-1</sup> im IR-Spektrum bestätigten diesen Befund. Eine 1,4-dien-3-Ketogruppierung konnte durch Vergleich mit IR-Aufnahmen entsprechender Verbindungen ausgeschlossen werden. Aus dem Massenspektrum mit positiver Ionisierung wurde ein Molekulargewicht von 314 ermittelt. Davon läßt sich die molekulare Zusammensetzung von  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$  (314,4) ableiten. Weitere charakteristische Banden traten bei 313 (M-1), 296 (M-18, H<sub>2</sub>O-Abspaltung) und 124 (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, Spaltung des Moleküls zwischen

C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> und C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>) auf. Im Massenspektrum mit negativer Ionisierung wurden 2 ausgeprägte Banden bei 312 (M-2) und 294 (M-2-18, H<sub>2</sub>O-Abspaltung) gefunden. Das Molgewicht des Metaboliten läßt gegenüber der Ausgangssubstanz eine zusätzliche Sauerstoff-Funktion und die Aufnahme von 2 Wasserstoffatomen erkennen. Da die Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin und die Oxydation mit Chromsäure in Eisessig zu keinem Derivat führten, war anzunehmen, daß es sich bei der eingeführten Sauerstoff-Funktion um eine tertiäre Hydroxylgruppe handelt, die durch das NMR-Spektrum bewiesen werden konnte. Gegenüber der Vergleichssubstanz Noräthisteron zeigt das Singulett bei 5,011 ppm diese zusätzliche tertiäre Hydroxylgruppe an, da kein Signal eines weiteren zugehörigen Protons auftritt. Die Lage des 18-CH<sub>3</sub>-Signals blieb unbeeinflusst, so daß die Positionen 8 $\beta$  und 14 $\alpha$  ausgeschlossen werden konnten; als mögliche Positionen verblieben 9 $\alpha$  und 10 $\beta$ . Da die Dehydratisierung mit p-Toluolsulfonsäure in Benzol wieder zum phenolischen Ring A führte, wurde die 10 $\beta$ -Stellung wahrscheinlich gemacht. Der endgültige Beweis, daß es sich bei dem mikrobiell gebildeten Metaboliten tatsächlich um 10 $\beta$ -Hydroxy-19-nor-äthisteron handelt, wurde durch Vergleich mit der synthetisch hergestellten Verbindung[7] erbracht. Die Identität beider Verbindungen wurde durch Prüfung des Mischschmelzpunktes ( $F = 265-267,5^{\circ}\text{C}$ ), Vergleich der IR-Spektren, die in allen Einzelheiten übereinstimmten und der Retentionszeiten bei der Gaschromatographie (26,8 min) bewiesen.

Umwandlung von Noräthisteron, Lynestrenol und Norethynodrel zu 10 $\beta$ -Hydroxy-19-noräthisteron.

Die Fermentation von *Aspergillus flavus* mit drei nichtaromatischen 17 $\alpha$ -Äthinyl-19-norsteroiden mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen im Ring A führte übereinstimmend zu 10 $\beta$ -Hydroxy-19-noräthisteron (V). Im Falle des Noräthisterons (II) verlief die 10 $\beta$ -Hydroxylierung in 25%iger Ausbeute. Der 10 $\beta$ -Metabolit (V) konnte in gleicher Ausbeute auch aus Lynestrenol (III) erhalten werden, wobei hier eine zusätzliche Sauerstoff-Funktion in 3-Stellung eingeführt wird. Dagegen beträgt die Ausbeute bei Einsatz von Norethynodrel (IV) nur 5%. Offenbar ist hier die Isomerisierung der Doppelbindung von 5(10) nach 4(5) der begrenzende Schritt.

#### Weitere Umwandlungsversuche

Um die Strukturabhängigkeit der Hydrierungs- und Hydroxylierungsreaktion

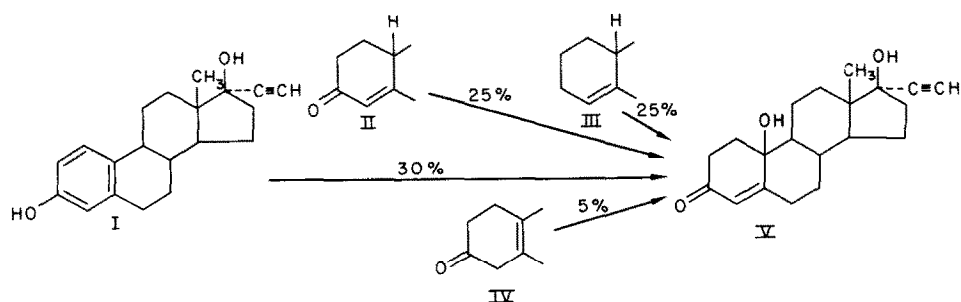


Abb. 1. Bildung von 17 $\alpha$ -Äthinyl-10 $\beta$ , 17 $\beta$ -dihydroxy-4-östren-3-on durch *Aspergillus flavus*. I 17 $\alpha$ -Äthinyl-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol, II 17 $\alpha$ -Äthinyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-östren-3-on, III 17 $\alpha$ -Äthinyl-4-östren-17 $\beta$ -ol, IV 17 $\alpha$ -Äthinyl-17 $\beta$ -hydroxy-5(10)-östren-3-on, V 17 $\alpha$ -Äthinyl-10 $\beta$ , 17 $\beta$ -dihydroxy-4-östren-3-on.

sowie den Einfluß von Luftsauerstoff zu prüfen, wurden Versuche zur Umwandlung der in der Tabelle angegebenen Steroide mit *Aspergillus flavus* unter aeroben und anaeroben Bedingungen (Evakuieren, Argonatmosphäre) durchgeführt.

Es zeigte sich, daß sowohl die Hydrierung des aromatischen Ringes A als auch die  $10\beta$ -Hydroxylierung die Anwesenheit der  $17\alpha$ -Äthynylgruppe voraussetzt. Auch die  $17\alpha$ -Methylgruppe bewirkt in geringem Maße die Ausbildung eines entsprechenden Reaktionsproduktes.

Tabelle 1

Aerobe Umwandlung		
	Hydrierung	$10\beta$ -Hydroxylierung
Östradiol <sup>(1)</sup>	—	—
19-Nortestosteron <sup>(2)</sup>	—	—
3-Desoxytestosteron <sup>(3)</sup>	—	—
$17\alpha$ -Methylöstradiol <sup>(4)</sup>	+	+
19-Nor-1-androsten-3,17-dion	+	?
1,4-Androstadien-3,17-dion	+	—
Norgestrel <sup>(5)</sup>	—	—
Anaerobe Umwandlung		
Äthynlöstradiol	+	—
Östradiol	—	—
Noräthisteron	—	—

<sup>(1)</sup> 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 $\beta$ -diol.

<sup>(2)</sup> 19-Nor-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-on.

<sup>(3)</sup> 3-Desoxy-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-on.

<sup>(4)</sup>  $17\alpha$ -Methyl-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol.

<sup>(5)</sup> 19-Nor-17 $\alpha$ -äthynyl-17 $\beta$ -hydroxy-18-methyl-4-androsten-3-on.

#### DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die enzymatische Umwandlung eines Ring A aromatisierten Steroids zu einem 4-en-3-Ketosteroid möglich ist. Gleichzeitig wurde eine  $10\beta$ -Hydroxygruppe eingeführt. Für die Bildung von  $10\beta$ -Hydroxy-19-noräthisteron (V) aus  $17\alpha$ -Äthynlöstradiol (I) können zwei Wege in Betracht gezogen werden. Voraussetzung für beide Wege dürfte die Umkehrbarkeit der Dienon-Phenol-Umlagerung zum 1,4-dien-3-Keton sein. Der Pilz besitzt u.a. die Fähigkeit der Hydrierung der 1-en-Doppelbindung und der  $10\beta$ -Hydroxylierung. So konnten wir, ausgehend von  $17\alpha$ -Äthynlöstradiol, unter Sauerstoffausschluß in etwa 3%iger Ausbeute 19-Nor-äthisteron erhalten. Die 1-en-Doppelbindung des 19-Nor-1-androsten-3,17-dions wurde auch unter aeroben Bedingungen hydriert. Die  $10\beta$ -Hydroxylierung beobachteten wir jedoch nicht nur ausgehend von  $17\alpha$ -Äthynlöstradiol, sondern wie oben beschrieben, auch ausgehend von Noräthisteron. Daraus ergibt sich, daß der Reaktionsablauf über die 1-Hydrierung und die nachfolgende  $10\beta$ -Hydroxylierung möglich ist. Die Klärung, ob durch eine  $10\beta$ -Hydroxylierung das 1,4-dien-3-Keton aus dem Tautomerie-Gleichgewicht entfernt und anschließend die 1-en-Doppelbindung hydriert werden kann, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die Bildung eines p-Chinols aus Östradiol durch Pilztyrosinase wurde bereits 1940 von Westerfeld[8] gefunden und als Inaktivierungsschritt

des Hormons postuliert. Hecker und Mitarbeiter[9–11] fanden das gleiche p-Chinol, ausgehend von Östron und Östradiol, mit Rattenlebermikrosomen. Eine Hydrierung zum 4-en-3-Keton wurde nicht beobachtet. In unseren Versuchen mit *Aspergillus flavus* beobachteten wir mit Östradiol als Substrat weder eine 10 $\beta$ -Hydroxylierung noch eine Hydrierung. Bei Einsatz von 19-Nortestosteron konnte ebenfalls keine 10 $\beta$ -Hydroxylierung gefunden werden. Das bedeutet, daß die oben beschriebene Hydrierung und Hydroxylierung von der Anwesenheit des 17 $\alpha$ -Substituenten abhängt. Der Einfluß der 17 $\alpha$ -Äthinylgruppe erscheint besonders ausgeprägt (Umwandlung bis zu 30%), während eine 17 $\alpha$ -Methylgruppe nur einen geringen Einfluß ausübt (Umwandlung ca. 3%). Auch die Einführung der 10 $\beta$ -Hydroxygruppe in 4-en-3-Keto-19-norverbindungen ist mit *Aspergillus flavus* an das Vorhandensein der 17 $\alpha$ -Äthinylgruppe gebunden, denn mit 19-Nortestosteron konnte keine 10 $\beta$ -Hydroxylierung erhalten werden. Diese Eigenschaft scheint jedoch stammspezifisch zu sein, denn J. de Flines u. Mitarbeiter[12] konnten mit *Botrytis paeoniae* eine 10 $\beta$ -Hydroxygruppe in 19-Nortestosteron einführen.

Das Enzymmuster von *Aspergillus flavus* zur Umwandlung von Steroiden ist sehr vielfältig. Es umfaßt induzierbare Enzyme zum Abbau von Steroiden[13] und ein bisher nicht zellfrei erhaltenes Hydroxylasesystem, das in Abhängigkeit von der Struktur des Steroidsubstrats in verschiedene Positionen des Moleküls Hydroxylgruppen einführen kann[14]. Auch die hier beschriebene Hydrierung des aromatischen Systems in Verbindung mit der 10 $\beta$ -Hydroxylierung konnte nicht zellfrei erhalten werden. Als besondere Leistung des Stammes ist die Sulfokonjugierung von Östron und Östradiol in 3-Stellung, die bisher nur beim Säugetier beobachtet wurde, zu erwähnen[5].

Die stammspezifischen Leistungen von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Struktur des Substrats sind natürlich nicht verallgemeinerungsfähig für den Stoffwechsel von Steroiden beim Menschen. Sie geben jedoch eine Aussage über biologisch mögliche Struktur-Stoffwechsel-Beziehungen. Am Beispiel von *Aspergillus flavus* wird aufgezeigt, daß eine 17 $\alpha$ -Äthinylgruppe, wie sie in zahlreichen Pharmaka enthalten ist, einen völlig veränderten Stoffwechsel bewirken kann. Die hier erstmals beobachtete enzymatische Hydrierung eines aromatischen Systems eröffnet eine bisher unbekannte Stoffwechselrichtung.

Da in ausgewählten Fällen Mikroorganismen als Modelle für das Studium enzymatischer Reaktionen verwendet werden können, die auch im Säugetierorganismus ablaufen, stellt sich die Frage, ob der hier beschriebene Reaktionstyp unter bestimmten Bedingungen im Steroidstoffwechsel vorkommt.

#### DANKSAGUNG

Für die präparative Herstellung der Verbindung 17 $\alpha$ -Äthinyl-10 $\beta$ , 17 $\beta$ -dihydroxy-4-östren-3-on danken wir Herrn Dr. W. Schade aus der Abteilung Steroidsynthese (Leiter: Prof. Dr. K. Ponsold) unseres Instituts.

#### LITERATUR

1. Breuer H. und Knuppen R.: *Meth. Enzym.* XV (1969) 691.
2. Marks F. und Hecker E.: *Meth. Enzym.* XV (1969) 736.
3. Coombe R. G., Tsong Y. Y., Hamilton P. B. und Sih Ch.: *J. biol. Chem.* 241 (1966) 1587.
4. Groh, H.: Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (1972) 45.
5. Schubert K. und Groh H.: *J. steroid Biochem.* 2 (1971) 387.
6. Schubert K., Groh H. und Hörhold Cläre: *J. steroid Biochem.* 2 (1971) 281.
7. Perez Ruelas J., Iriarte J., Kincl F. und Djerassi C.: *J. org. Chem.* 23 (1958) 1744.

8. Westerfeld W. W.: *Biochem. J.* **34** (1940) 51.
9. Hecker E. und Zayed S. M. A. D.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **325** (1961) 209.
10. Hecker E. und Marks F.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **340** (1965) 229.
11. Marks F. und Hecker E.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350** (1969) 69.
12. Flines J. de und Van der Waard W. F.: *Rec. Chim. Pays-Bas* **82** (1963) 129.
13. Schubert K., Böhme K.-H., Ritter F. u. Hörhold Cläre: *J. steroid Biochem.* **2** (1971) 245.
14. Schubert K., Schlegel J., Groh H., Rose G. und Hörhold Cläre: *Endokrinologie* **59** (1972) 99.