

# ABBAU VON STEROIDEN:—XV. BILDUNG VON 9,10-SECO-VERBINDUNGEN AUS 4-CHLORSUBSTITUIERTEN STEROIDEN DURCH *NOCARDIA OPACA*

C. HÖRHOLD, G. ROSE, E. HÜLLER und K. SCHUBERT

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und  
Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll), Bereich Steroidforschung

(Received 7 March 1975)

## SUMMARY

4-Chlortestosteron (V), the corresponding 17 $\alpha$ -methylsubstituted steroid (II) and the compound with an additional double bond in position 1 (I) have been transformed to 9,10-Seco-compounds (IV and VII) by 9 $\alpha$ -hydroxylation and 1-dehydrogenation in fermentation cultures of *Nocardia opaca*. Compound I has been hydrogenated in position 1 to compound II. The metabolism of compound V could be markedly increased by addition of estrone.

## EINLEITUNG

Die mikrobielle Bildung von 9,10-Seco-Verbindungen wurde von Dodson und Muir\*1958[1] erstmalig aus 4-Androsten-3,17-dion und später von Schubert und Mitarbeitern[2], ausgehend von Progesteron, beschrieben. Zwei enzymatische Reaktionsschritte sind dafür erforderlich: die 9 $\alpha$ -Hydroxylierung und die Dehydrierung in 1-Stellung des Steroidmoleküls. Steroide mit einem Chlor-Substituenten in 4-Stellung sind keine Substrate der 1-Dehydrogenase von *Arthrobacter simplex* und *Nocardia opaca* [3, 4] und sollten deshalb auch keine 9,10-Seco-Verbindungen bei der mikrobiellen Umwandlung ergeben. Laskin und Mitarbeiter fanden, ausgehend von einer 4,4'-Dimethylverbindung der Eburicosäure, in der Fermentationskultur mit *Glomerella fusarioides* durch oxydative Ringspaltung zwischen C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> eine Hydroxysäure [5]. Bei der Fermentation von drei 4-chlorsubstituierten Steroiden (I, II und V) mit *N. opaca* fanden wir nun als Hauptprodukte 9 $\alpha$ -Hydroxyverbindungen, doch konnten in jedem Fall auch die entsprechenden 9,10-Seco-Verbindungen isoliert werden.

## EXPERIMENTELLER TEIL

**Material.** Die verwendeten Steroide wurden vom VEB Jenapharm bezogen; 16 $\alpha$ -Cyanopregnenolon wurde von der Abteilung Steroidsynthese (Prof. Dr. K. Ponsold) des Institutes zur Verfügung gestellt.

**Folgende Trivialnamen wurden verwendet.** Oral-Turinabol: 4-Chlor-17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-1,4-androstadien-3-on; 4-Chlormethyltestosteron: 4-Chlor-17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-on; 4-Chlortestosteron: 4-Chlor-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-on; 16 $\alpha$ -Cyanopregnenolon: 16 $\alpha$ -Cyano-3 $\beta$ -hydroxy-5-pregnen-20-on.

*Nocardia opaca*, Stamm IMET 7030, wurde aus der Sammlung des Institutes und *Pseudomonas testosteronei*, Stamm H 252, aus der Tschechoslowakischen Sammlung von Mikroorganismen, Brno, mit der Stammbezeichnung CCM 1931 (ATCC 11996) erhalten.

## Methoden

**Wachstum und Fermentation.** Die Mikroorganismen wurden 24 h bei 28°C auf Schrägröhrchen mit Nähragar 79 [6] angezüchtet. Mit je einem Röhrchen wurde ein 500 ml-Rundkolben, der 50 ml Nährlösung 79 enthielt, beimpft und 28 h bei 28°C auf einem Rundschtwingtisch kultiviert. Mit dieser Kultur wurden 500 ml-Rundkolben mit je 50 ml Induktionsnährlösung [7] beimpft. Die photometrisch ermittelte Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^6$  Keime/ml Induktionsnährlösung eingestellt. Gleichzeitig mit dem Beimpfen erfolgte die Zugabe von 20 mg Steroid, gelöst in 0,5 ml Aceton, je Rundkolben. Die Fermentation wurde nach 24 h bei 28°C auf dem Rundschtwingtisch beendet.

**Beeinflussung der Metabolisierung.** Auf jeweils 50 ml Bakterienkultur wurden gleichzeitig mit dem umzuwandelnden Steroid folgende Verbindungen in einer Konzentration von 5 mg, gelöst in 0,25 ml Aceton, zugesetzt: Östron, Östradiol, Östriol, Progesteron, Testosteron und 16 $\alpha$ -Cyanopregnenolon. Na-Barbital und Na-Phenobarbital wurden in der gleichen Konzentration, gelöst in aqua dest, der Kultur zugegeben.

**Extraktion, Auftrennung und Identifizierung der Metaboliten:** Die gesamte Fermentationskultur wurde 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt, die vereinten Extraktionslösungen mit Wasser gewaschen und zur Trockne gebracht. Die Trennung der gebildeten Metaboliten erfolgte dünnschichtchromatogra-

phisch auf Kieselgelplatten (VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau; 0,25 mm Schichtdicke) mit 3% Leuchtstoff N 40 grün (VEB Leuchtstoffwerk Bad Liebenstein) in einem System Benzol-Essigsäureäthylester (1:1 v/v). Die Lage der Metaboliten III und VI wurde sowohl durch Fluoreszenz unter der U.V.-Lampe (254 nm) als auch durch Besprühen mit einer 10%igen äthanolischen Phosphorwolframsäurelösung und anschließendes Erwärmen auf ca. 120°C und die der Metaboliten IV und VII durch die Turnbollsblau-Reaktion  $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe(CN)}_6$  (1:1 v/v) ermittelt. Die präparative Trennung der Metaboliten erfolgte auf Dünnschichtplatten von 20 × 100 cm. mit einer Schichtdicke von 1 mm Kieselgel. Die Metaboliten III und VI enthaltenden Zonen wurden unter der U.V.-Lampe markiert, mit dem Spatel abgekratzt und mit einem Gemisch von Chloroform-Methanol (12:1 v/v) eluiert. Nach Einengen der Lösungen wurden die getrockneten Rückstände in Methanol bzw. Essigsäureäthylester aufgenommen und zur Kristallisation gebracht.

Für die präparative Trennung der Metaboliten IV und VII wurde die Lage auf den Dünnschichtplatten durch Anfärben eines Randstreifens mit der Turnbollsblau-Reaktion festgestellt. Die aus dem Chloroform-Methanol-Extrakt gewonnenen Rückstände wurden in Äther gelöst und mehrmals mit 1 M Natronlauge ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge wurden mit Salzsäure angesäuert und mit Natriumbicarbonat auf pH 7,0 gebracht. Durch anschließende Ätherextraktion konnten die phenolischen Produkte erhalten werden. Die Schmelzpunktbestimmungen wurden mit einem Mikroheiztisch HMK der Firma Küstner KG (Dresden) durchgeführt. Mit einem Unicam SP 700-Spektrophotometer erfolgte die Messung der U.V.-Adsorption in Äthanol. Die Infrarotspektren wurden mit einem UR 20-Spektrophotometer (VEB Carl Zeiss, Jena) unter Anwendung der Mikrotechnik (KBr-Pellets, Querschnitt 2 mm, Schichtdicke 1 mm) registriert. Die NMR-Spektren (60 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) wurden mit einem Spektrometer ZKR 60 (VEB Carl

Zeiss, Jena) aufgenommen. Die Massenspektrometrie mit positiver und negativer Ionisierung wurde mit einem Gerät des Forschungsinstitutes "Manfred von Ardenne", Dresden, und mit dem Gerät MS-902 S der Firma AEL, Großbritannien, (pos.: Temp. 150°C; 70 eV), ausgeführt.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurde ein Aerograph 1520 B (Varian) unter folgenden Bedingungen verwendet: Glassäule, spiralförmig, 2000 × 2,5 mm (ID); 2%, SE 30 auf Gaschrom Q (80-100 mesh); Flammenionisationsdetektor; Trägergas Argon (2 at); Säulentemperatur 220°C.

#### Ergebnisse.

*Umwandlung von Oral-Turinabol und 4-Chlormethyltestosteron.* Aus den Fermentationskulturen von *Nocardia opaca* mit Oral-Turinabol (I) und 4-Chlormethyltestosteron (II) konnten die gleichen Metaboliten (III und IV) isoliert werden (Abb. 1). Die Ausbeuten lagen nach 24-stündiger Inkubation, ausgehend von 4-Chlormethyltestosteron (II), mit 40-50% etwa doppelt so hoch wie bei Oral-Turinabol (I). Nach 16 Std. war aus Oral-Turinabol zu ca. 10% 4-Chlormethyltestosteron und bei Einsatz von 4-Chlormethyltestosteron nach 24 Std. zu ca. 10% Oral-Turinabol gebildet worden. Der isolierte Metabolit III wurde durch *N. opaca* zu 20% und durch *Pseudomonas testosteroni* zu 30% in Metabolit IV umgewandelt. Dieser Metabolit lag in Fermentationskulturen mit Oral-Turinabol zu ca. 10% und ausgehend von 4-Chlormethyltestosteron zu ca. 10-20% vor.

*Identifizierung von Metabolit III (4-Chlor-17 $\alpha$ -methyl-9 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androsten-3-on).* Der aus Oral-Turinabol und 4-Chlormethyltestosteron erhaltene stärker polare Metabolit zeigte gleiches dünnschichtchromatographisches Verhalten. Alle weiteren angewandten Identifizierungsmethoden erwiesen die Identität der isolierten Produkte. Die aus Essigsäureäthylester erhaltenen rhombischen Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 123-126°C. Bei weiterem

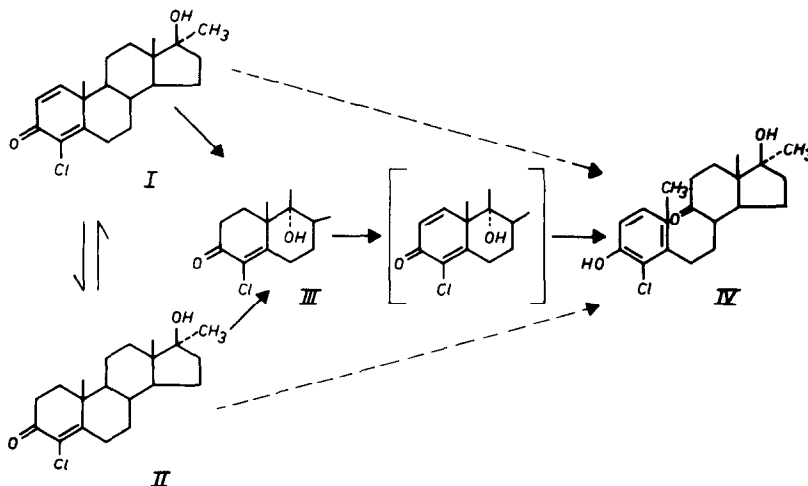


Fig. 1. Mikrobielle Umwandlung von Oral-Turinabol (I) und 4-Chlormethyltestosteron (II).

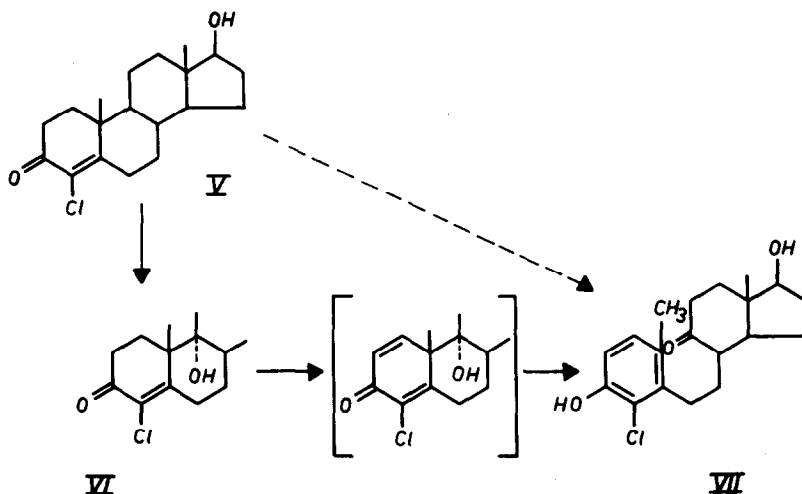


Fig. 2. Mikrobielle Umwandlung von 4-Chlortestosteron.

Erhitzen bildeten sich bei ca. 130°C Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 185–188°C. Mit dem U.V.-Spektralphotometer wurde das für 4-Chlor-4-en-3-Ketosteroide charakteristische Maximum bei 256 nm gemessen.

Das Infrarotspektrum wies durch die Banden bei 1585 und 1685  $\text{cm}^{-1}$  die 4-Chlor-4-en-3-on-Gruppierung und eine Bande bei 1150  $\text{cm}^{-1}$  aus, welche charakteristisch ist für tertiäre Hydroxygruppen. Die bei der Gaschromatographie auftretenden Zersetzungsprodukte hatten die gleichen Retentionszeiten [16,8/16,8; 23,3/23,3; 24,7/24,7; 46,6/48,4 min]—ein weiterer Beweis für die Identität des aus Oral-Turinabol [Retentionszeit 32,9 min] und 4-Chlormethyltestosteron [Retentionszeit 27,1 min] entstandenen Metaboliten. Die in den Massenspektren aufgetretenen Massenzahlen der beiden Produkte erwiesen sich ebenfalls als identisch. Es wurde ein Molekulargewicht von 352 ermittelt. Daraus war zu schließen, daß es sich bei Metabolit III um ein hydroxyliertes 4-Chlormethyltestosteron handelt. Zur Charakterisierung der eingeführten Hydroxygruppe wurde eine Mikrooxydation nach Jones sowie eine Acetylierung durchgeführt. Das negative Ergebnis sprach für das Vorliegen einer tertiären Hydroxygruppe. Dieser Befund konnte durch das NMR-Spektrum bestätigt werden. Hier trat ein Multiplett auf, welches dem geminalen H einer CHOH- oder CH<sub>2</sub>OH-Gruppierung zuzuordnen wäre. Demzufolge konnte die eingeführte Hydroxygruppe nur tertiär vorliegen. Gegenüber der Ausgangssubstanz II waren die Signale der 17 $\alpha$ - und 18-Methylgruppen kaum verändert, das Signal der 19-Methylgruppe dagegen um 0,11 ppm nach tieferem Feld verschoben. Nach den von Zürcher [8] tabellierten Werten kamen somit für eine OH-Gruppe die Positionen 8 $\beta$ - und 14 $\alpha$  nicht in Betracht; die chemischen Verschiebungen wiesen vielmehr auf das Vorliegen einer 9 $\alpha$ -Hydroxygruppe hin.

Identifizierung von Metabolit IV (4-Chlor-10,17 $\alpha$ -dimethyl-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-östratrien-9-on). Stämme mit ausgeprägter 1-Dehydrogena-

seaktivität, wie *Nocardia opaca* und *Pseudomonas testosteronei*, wandelten Metabolit III in 30%iger Ausbeute zu Metabolit IV um. Es war zu erwarten, daß durch das Vorliegen der 9 $\alpha$ -Hydroxygruppe bei Metabolit III über ein instabiles, 1-dehydriertes Intermediärprodukt durch Dienon-Phenol-Umlagerung eine 9,10-Seco-Verbindung mit aromatischem Ring A (IV) entsteht [1, 2]. Die aus Äther-Hexan erhaltenen Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 149–151°C zeigten ein für das aromatische System charakteristisches U.V.-Maximum bei 282 nm und charakteristische Banden bei 1582 und 1620  $\text{cm}^{-1}$  im Infrarotspektrum. Das Massenspektrum (Molgewicht 350) steht im Einklang mit Struktur IV.

Molpeak (M)	Chemical Formula	berechnet	gefunden
M	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> Cl O <sub>3</sub>	350,2821	350,2830
M-Cl	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>3</sub>	315,1960	315,1949
M-HCl	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	314,1882	314,1877
Fragment 1	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> Cl O	155,1436	155,1429
Fragment 2	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	195,1385	195,1371

Die Fragmente 1 und 2 sind durch Spaltung des Metaboliten IV zwischen C<sub>6</sub> und C<sub>7</sub> entstanden.

Umwandlung von 4-Chlortestosteron. Bei Anwendung der Umwandlungsbedingungen, die für die Versuche mit Oral-Turinabol und 4-Chlormethyltestosteron beschrieben wurden, konnten bei Einsatz von 4-Chlortestosteron nur Spuren eines polaren Metaboliten (VI) aufgefunden werden. Die Zugabe von Östradiol bewirkte jedoch eine gesteigerte Bildung von Metabolit VI (ca. 30%) und außerdem das Auftreten eines weiteren Umwandlungsproduktes VII (ca. 10%). Dabei wurde Östradiol zu etwa 80% in Östron umgewandelt. Wurde den Fermentationskulturen Östron zugesetzt, so konnte der gleiche steigernde Effekt beobachtet werden, während eine Zugabe von Östriol keinen Einfluß hatte. Durch Zugabe von Progesteron bzw. Testosteron wurden geringe Ausbeute-steigerungen erzielt. Bei Zugabe der Natriumsalze von

Barbital und Phenobarbital sowie von 16 $\alpha$ -Cyanopregnenolon, welche in der Säugetierleber die Hydroxylierung von Steroiden steigern, wurde keine Umwandlung von 4-Chlortestosteron zu Metabolit IV festgestellt. Der isolierte Metabolit VI wurde durch *N. opaca* zu 5% und durch *P. testosteroni* zu 20% in Metabolit VII umgewandelt.

*Identifizierung von Metabolit VI (4-Chlor-9 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-4-androsten-3-on)*. Die aus Methanol erhaltenen säulenförmigen Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 202–205°C. Die U.V.- und I.R.-Spektren zeigten die gleichen Charakteristika, welche für Metabolit III festgestellt wurden. Die im Massenspektrum aufgetretenen Massenzahlen liegen, bedingt durch das Fehlen der 17 $\alpha$ -Methylgruppe, jeweils um 14 Massenzahlen niedriger als bei Metabolit III. Diese Daten und die mikrobielle Umwandlung zu Metabolit VII sprechen für ein 9 $\alpha$ -hydroxyliertes 4-Chlortestosteron.

*Identifizierung von Metabolit VII (4-Chlor-10-methyl-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-östratrien-9-on)*. Das I.R.-Spektrum bestätigte durch das Vorliegen der Banden bei 1581 und 1620 cm<sup>-1</sup> das aromatische System. Die Verbindung stellt damit die durch 1-Dehydrierung mit *N. opaca* und *P. testosteroni* aus dem 9 $\alpha$ -Hydroxymetaboliten (VI) entstandene Seco-Verbindung VII dar.

#### DISKUSSION UND ERGEBNISSE

*Nocardia*-Spezies wandeln Testosteron und 17 $\alpha$ -Methyltestosteron durch Abspaltung eines Ring A-Fragmentes in entsprechende Perhydroindansäuren um [9, 10]. Als Intermediärprodukte entstehen durch 9 $\alpha$ -Hydroxylierung und 1-Dehydrierung 9,10-Seco-Verbindungen. Bei Steroiden mit Chlor-Substituenten in 4-Stellung dagegen, wie sie bei einer Reihe von Pharmaka vorliegen, war bisher weder eine 1-Dehydrierung noch eine 9 $\alpha$ -Hydroxylierung und damit auch kein weiterer Abbau bekannt. Bei Einsatz von 4-Chlortestosteron (V) konnte von uns keine 1-Dehydrierung beobachtet werden, die Verbindung wurde lediglich in geringer Ausbeute (unter 5%) in 9 $\alpha$ -Stellung hydroxyliert (VI). Durch Zugabe von Östradiol bzw. Östron konnte die Bildung des Hydroxylierungsproduktes (VI) auf 30% gesteigert werden, außerdem entstand durch nachfolgende 1-Dehydrierung und Dienon-Phenol-Umlagerung die Seco-Verbindung VII. Da Östradiol während der Fermentation zu 80% in Östron umgewandelt wird, ist anzunehmen, daß die erhöhte Metabolisierung auf Östron zurückzuführen ist. Ob eine Enzyminduktion vorliegt, bleibt zu klären.

Bei der Fermentation der 17 $\alpha$ -methylsubstituierten Verbindungen, Oral-Turinabol (I) und 4-Chlormethyltestosteron (II), wurde ohne Zugabe von Östron

eine Ausbeute (20-bzw. 40–50 %ige) des 9 $\alpha$ -Hydroxymetaboliten (III) erzielt. Die Ausbeute dieses Metaboliten bzw. der Seco-Verbindung (IV) konnte durch Zugabe von Östron nicht gesteigert werden. Der 17 $\alpha$ -Methylsubstituent begünstigt offenbar die Umwandlungsreaktionen bzw. die Induktion der entsprechenden Enzyme. Die Versuchsanordnung erlaubt nicht die Entscheidung, ob ausgehend von Oral-Turinabol (I) eine direkte Einführung der 9 $\alpha$ -Hydroxygruppe erfolgen kann oder zunächst eine 1-Hydrierung erforderlich ist. In der Fermentationslösung liegen neben der Seco-Verbindung (IV) die 1-hydrierten Metaboliten II und III vor. Das hierbei als Metabolit auftretende 4-Chlormethyltestosteron (II) wird gegenüber Oral-Turinabol (I) bevorzugt in 9 $\alpha$ -Stellung hydroxyliert. Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen 1-Hydrierung und Hydroxylierung in den Nachbarpositionen bei 17 $\alpha$ -substituierten Steroiden weisen auch Ergebnisse der mikrobiellen Hydrierung des aromatischen Systems von 17 $\alpha$ -Äthinylostradiol durch *Aspergillus flavus* hin [11]. Begünstigt durch die 17 $\alpha$ -Äthinygruppe wurde hierbei gleichzeitig mit einer Hydrierung in 1-Stellung eine Hydroxygruppe in 10 $\beta$ -Stellung eingeführt. Der Abbau der 4-chlorsubstituierten 9,10-Seco-Verbindungen ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Trotz umfangreicher Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umwandlung von Steroiden durch Mikroorganismen, die im wesentlichen praktische Aspekte betreffen, ist bis jetzt wenig über die biologischen Grundlagen bekannt. Die dargestellten Ergebnisse weisen auf Beziehungen zwischen Steroidstruktur, der induktiven Bildung, den Aktivitäten und dem Zusammenwirken mikrobieller Enzymsysteme bei der Umwandlung und dem Abbau von Steroiden hin.

#### LITERATUR

1. Dodson R. M. und Muir R. D.: *J. Am. chem. Soc.* **80** (1958) 5004.
2. Schubert K., Böhme K.-H. und Hörhold C.: *Z. Naturforschung* **15b** (1960) 584.
3. Penasse I. und Nomine G.: *Eur. J. Biochem.* **47** (1974) 555.
4. Hörhold C., Schubert B., Naumann H. und Schubert K.: (in Vorbereitung).
5. Laskin A. I., Grabowich P., de Lisle Meyers C. und Fried J.: *J. med. Chem.* **7** (1964) 406.
6. Prauser H. und Falta R.: *Z. allg. Microbiol.* **8** (1968) 39.
7. Marcus P. J. und Talalay P.: *J. biol. Chem.* **218** (1956) 661.
8. Zürcher R. F.: *Helv. chim. Acta.* **40** (1961) 1380.
9. Sih Ch. J. und Wang K. C.: *J. Am. chem. Soc.* **85** (1963) 2135.
10. Schubert K., Böhme K.-H. und Hörhold C.: Patent DDR Nr. 76014 (1970).
11. Schubert K., Rose G. und Hörhold C.: *J. steroid. Biochem.* **4** (1973) 283.