

# Der Hydrierungsverlauf bei 17-Ketosteroiden mit Darmbakterien unter anaeroben Bedingungen

Von KURT SCHUBERT, JOSEF SCHLEGEL und CLÄRE HÖRHOLO

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin  
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. KNÖLL)

(Z. Naturforschg. 17 b, 84—86 [1962]; eingegangen am 17. August 1961)

Mit Mikroorganismen-Mischkulturen aus Faeces verschiedener Personen wurden  $C_{19}$ -Steroide unter anaeroben Bedingungen einheitlich hydriert. Die Absättigung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung von  $\Delta^4$ -3-Keto-steroiden führte zu  $5\beta$ -Verbindungen. Die Hydrierung der 3-Keto-Gruppe zur 3-OH-Gruppe ergab ein Verhältnis der Konfiguration axial zu äquatorial von 1 : 3 bis 1 : 4.

Im gleichen Verhältnis wurden  $C_{19}$ -Steroide mit einer axialen 3-OH-Gruppe epimerisiert. Aus einer Mischkultur wurden Keime isoliert, mit denen einzelne Stufen des Hydrierungsverlaufes reproduziert werden konnten.

Über die Bedeutung der Darmflora unter normalen und pathologischen Bedingungen ist viel diskutiert worden, ohne daß bisher eine Klärung erreicht werden konnte. Insbesondere ist unklar, welche Rolle die mikrobiellen Stoffwechselprodukte für den Intermediär-Stoffwechsel des Wirtes spielen. Von seiten der Steroide gibt es Hinweise für einen mehr oder weniger ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf bei verschiedenen Steroidgruppen. Es ist daher naheliegend, in diesem Zusammenhang eine Beteiligung der Darmflora am Steroidstoffwechsel zu vermuten. Interessant ist hier die Beobachtung von KELLIE, wonach bei rectaler Verabreichung von Cortisol der Anteil der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide im Harn 25–100-mal höher war als bei oraler Zufuhr<sup>1</sup>. Dieser verstärkte Abbau der Cortisol-Seitenkette zu 17-Ketosteroiden trat nicht ein, wenn die bakterielle Aktivität durch Neomycin reduziert war. Durch in vitro-Untersuchungen konnten NORMAN und BERGMAN zeigen, daß Darmbakterien der Ratte eine Umwandlung von Cholsäure in Desoxycholsäure bewirken<sup>2</sup>. MAMOLI und Mitarb. haben Hefe<sup>3</sup> und *Bac. putrificus*<sup>4</sup> für die Hydrierung verschiedener Steroide verwandt. Die Umwandlung von Cholesterin in Coprosterin wurde schon sehr früh beobachtet.

Es ist bekannt, daß im Dickdarm des Erwachsenen anaerobe Bakterien dominieren. Wir stellten

uns die Aufgabe, die bisher nur wenig untersuchten Möglichkeiten der Umwandlung von Steroiden durch Darmbakterien unter anaeroben Bedingungen näher zu definieren.

Es wurde zunächst mit Mischkulturen aus Faeces verschiedener gesunder Personen gearbeitet. Die Hydrierungsergebnisse bei  $C_{19}$ -Steroiden waren überraschend einheitlich. Später wurden auch Reinkulturen isolierter Keime eingesetzt, wobei Teile des mit Mischkulturen beobachteten gesamten Hydrierungsverlaufes reproduziert werden konnten.

In vorangegangenen Untersuchungen beschäftigten wir uns mit der oxydativen Umwandlung von  $C_{19}$ -Steroiden und  $C_{21}$ -Steroiden durch Mycobakterien<sup>5,6</sup>. Bei der nachfolgend zu behandelnden Umwandlung von  $C_{19}$ -Steroiden unter anaeroben Bedingungen stehen die Stereoisomerie der Ringe A/B und die Konfiguration der OH-Gruppe in 3-Stellung nach erfolgter Hydrierung im Vordergrund.

## Material und Methoden

### A. Bakteriologische Methoden

#### Nährmedien

Für die Steroidumwandlungs-Versuche fanden zwei Nährlösungen Verwendung: Gesamtanaeroben-Medium (I) nach HAENEL<sup>7</sup> und ein Nährboden (II) folgender

<sup>1</sup> A. P. WADE, I. D. H. SLATER, A. E. KELLIE u. M. E. HOLLIDAY, *J. clin. Endocrinol.* **19**, 444 [1959].

<sup>2</sup> S. NORMAN u. S. BERGMAN, *Acta chem. scand.* **14**, 1781 [1960].

<sup>3</sup> L. MAMOLI u. A. VERCELLONE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **245**, 93 [1937].

<sup>4</sup> L. MAMOLI, R. KOCH u. H. TESCHEN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **261**, 287 [1939].

<sup>5</sup> K. SCHUBERT, K.-H. BÖHME u. C. HÖRHOLO, *Z. Naturforschg.* **15b**, 584 [1960].

<sup>6</sup> K. SCHUBERT, K.-H. BÖHME u. C. HÖRHOLO, *Z. Naturforschg.* **16b**, 595 [1961].

<sup>7</sup> H. HAENEL u. Ch. KUNDE, *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig.* **165**, 107 [1956].

Zusammensetzung:  $\text{CaCO}_3$  8,0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25,  $\text{NaCl}$  0,005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0001, Nutrose (Carl Roth, Karlsruhe) 15,0, Glutaminsäure 2,0, Asparagin 2,0 g, 1 ccm Az.-Lösung nach Hoagland, ad 1000 ccm dest. Wasser. Die Nährlösung wurde mit Kalilauge auf  $p_{\text{H}}$  7,0 eingestellt und 15 min bei  $120^\circ$  im Autoklaven behandelt. Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10 ccm einer 10-proz., sterilfiltrierten Na-Ascorbinatlösung.

#### Anaerobe Mischkulturen

Faeces-Proben von 9 Personen wurden in Leberbouillon nach Tarozzi suspendiert (ca. 1 g Feuchtgewicht/10 ccm Bouillon) und 24 Stdn. bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet. Eine Identifizierung der angewachsenen Keime erfolgte nicht. Jeweils 10 ccm der so gewonnenen Mischkulturen dienten als Impfmateriale für 80 ccm Nährlösung in 100-ccm-Kölbchen. Die weitere Bebrütung erfolgte unter Stickstoff im Anaerobengefäß (VEB Jenaer Glaswerke Schott & Gen.). Die Abwesenheit von Sauerstoff wurde mit einem Indikator nach MARSHALL<sup>8</sup> kontrolliert.

#### Isolierte Stämme

Aus einer Mischkultur konnten 2 in bezug auf die Steroidumwandlung aktive Keime isoliert werden. Einer entsprach in seinen Merkmalen der in Bergey's Manual<sup>9</sup> gegebenen Beschreibung von *Clostridium paraputrificum* Snyder, der andere, ein *Bacillus sp.*, war nach Bergey's Manual nicht zu identifizieren. Zwei weitere Clostridien aus der gleichen Mischkultur, *Cl. bifermentans* und *Cl. sporogenes*, waren inaktiv.

Für die Fermentationsversuche wurden die isolierten Keime unter den gleichen Bedingungen wie die Mischkultur gezüchtet. Diese Kulturverfahren fanden auch für *E. coli* Verwendung, jedoch wurde statt Leberbouillon Fleischwasser-Bouillon benutzt.

#### Fermentation

Nach 24–48-stdg. Bebrütung fügten wir je Kölbchen 2,5 mg Steroid, gelöst in 0,25 ccm Aceton, unter sterilen Bedingungen zu. Die Kölbchen wurden anschließend noch weitere 10 Tage unter anaeroben Bedingungen bei  $37^\circ$  belassen. In verschiedenen Zeitintervallen erfolgte die Probenentnahme für die chemische Aufarbeitung. Handelte es sich um Reinkulturen, wurde gleichzeitig ein Gram-Präparat angelegt und die Abwesenheit aerober Keime in Kulturen von *Cl. paraputrificum* durch Ausstriche auf Blutplatten, die 72 Stdn. bei  $37^\circ$  gehalten wurden, kontrolliert.

#### B. Aufarbeitung

In bestimmter Zeitfolge wird den Kultur-Kolben eine 5-ml-Probe entnommen und mit Äther extrahiert.

Die erhaltenen Extrakte werden papierchromatographisch mit den Systemen Bush A und Bush B1 untersucht. Zum Nachweis der Steroide dienen die Zimmermann-Reaktion und die Kontaktphotographie. Die einzelnen Umwandlungsprodukte werden mit Testsubstanzen verglichen. Eine Unterscheidung zwischen Ätiocholanolon–Epiandrosteron, Epiätiocholanolon–Androsteron und Ätiocholanolon–Androstandion ist auf diesem Wege nicht möglich. Zur Isolierung, weiteren Identifizierung und Klärung der angeführten Zweifelsfälle werden der gesamte Ansatz oder mehrere Ansätze aufgearbeitet und der Extrakt an Aluminiumoxyd (Merck II–III) chromatographiert. Nach erneutem papierchromatographischen Vergleich der getrennten Steroide werden die IR-Spektren in  $\text{CS}_2$  unter Verwendung einer KBr-Mikroküvette<sup>10</sup> aufgenommen (UR 10-Spektralphotometer, Carl Zeiss, Jena). Zur quantitativen Bestimmung wird ein Anteil der durch die Säulenchromatographie getrennten Steroide verwendet. Sie erfolgt nach Zimmermann mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers (Filter Cd 509).

#### Ergebnisse

Es wurden 9 Mischkulturen aus den Faeces verschiedener Personen für die Umwandlung von 17-Ketosteroiden unter anaeroben Bedingungen herangezogen. Das mikroskopische Bild der Bakteriengemische war unterschiedlich. Bei Verwendung von Nährboden I und Einsatz von Dehydroepiandrosteron oder Androstendion zeigten alle Mischkulturen den gleichen Hydrierungsverlauf. Auf Nährboden II war hingegen nur mit 4 Mischkulturen eine Hydrierung zu erreichen. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert stieg hierbei auf etwa 8, während er mit Nährboden I im Verlauf der Steroidumwandlung auf 6 absank. Die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Ansätze war zwar unterschiedlich, doch verlief die Hydrierung stets über die gleichen Verbindungen und das Mengenverhältnis der nach der Inkubation erhaltenen 3-Hydroxysteroiden ließ eine bemerkenswerte Konstanz in der Hydrierungstendenz erkennen.

Bei Einsatz von Dehydroepiandrosteron ist nach 3 bis 4 Tagen als erster Umwandschritt eine Oxydation der 3-OH-Gruppe und eine Verschiebung der Doppelbindung in  $\Delta^5$  nach  $\Delta^4$  unter Bildung von Androstendion zu beobachten. Vom Androstendion aus setzt die reversibel verlaufende Hydrierung der 17-Ketosteroide ein. Bei Einsatz von Androstendion konnte Testosteron bereits nach

<sup>8</sup> I. H. MARSHALL, J. gen. Microbiol. **22**, 645 [1960].

<sup>9</sup> BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology — 7. Auflage, Baltimore 1957.

<sup>10</sup> K. WEHRBERGER u. K. SCHUBERT, Pharmazie **16**, 249 [1961].

12 Std. nachgewiesen werden. Nach 3 Tagen verschwinden Androstendion und Testosteron, während Ätiocholanolon, Ätiocholanolon und Epiätiocholanolon hervortreten. In einer insgesamt 10-tägigen Inkubationszeit bildet sich für Epiätiocholanolon/Ätiocholanolon ein Verhältnis von 1:3 bis 1:4 aus. Zur selben Gleichgewichtseinstellung kommt es, wenn Ätiocholanolon oder Epiätiocholanolon zur Umwandlung eingesetzt werden.

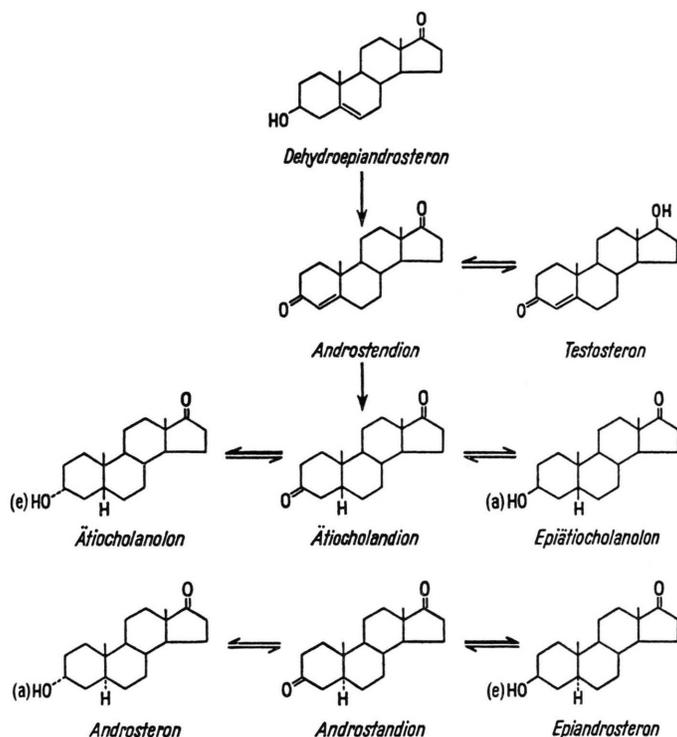


Abb. 1. Hydrierungsverlauf bei 17-Ketosteroiden mit Darmbakterien unter anaeroben Bedingungen.

Auch Androsteron und Epiandrosteron ergeben ein analoges Verhältnis zugunsten von Epiandrosteron.

Die dargestellten Ergebnisse lassen eine selektive Hydrierung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung zu  $5\beta$ , d. h. *cis*-Verknüpfung der Ringe A/B sowie eine ausgeprägte Bevorzugung der Ausbildung einer äquatorialen OH-Gruppe in 3-Stellung bei der Hydrierung der entsprechenden Diketone erkennen. Der Einsatz der 4-gesättigten 3-Hydroxy-Steroide führt in jedem Falle zu einer Epimerisierung der OH-Gruppe über die Diketone, wobei das Verhältnis der Konfiguration axial zu äquatorial bei 1:3 bis 1:4 liegt.

Die Bildung von 3.17-Diolen konnte nach Papierchromatographie der Extrakte im System Bush I und Oxydation mit Chromsäure<sup>11</sup> nachgewiesen werden. Ihr Anteil wird auf Grund der Gesamtbilanz der Umwandlungsprodukte auf 20 bis 30% geschätzt.

Auf Grund von Versuchen mit isolierten Stämmen aus einer Mischkultur kann man annehmen, daß an dem von uns gefundenen Hydrierungsverlauf verschiedene Bakterien-Species beteiligt sind. *Clostridium paraputrificum* bildete innerhalb von 18 Std. aus Androstendion Ätiocholanolon. Hierbei konnte auch Ätiocholanolon nachgewiesen werden, bemerkenswerterweise aber kein Epiätiocholanolon; Dehydroepiandrosteron und Androsteron wurden nicht verändert. Ein *Bacillus sp.* wandelte Dehydroepiandrosteron in Androstendion und Testosteron um. Aus Androstendion wurde Testosteron erhalten. *E. coli* bildete aus Dehydroepiandrosteron Androstendion. In einer Mischkultur sind sicher eine größere Anzahl Keime vorhanden, die eine prinzipiell gleichartige Hydrierungstendenz besitzen. Darüber hinaus wird es Keime geben, die auch zu anderen Reaktionen befähigt sind. Ihr Zusammenwirken in einer Mischkultur ist nur schwer zu erfassen.

<sup>11</sup> D. KUPFER, E. FORCHIELLI, M. STYLIANOU, R. I. DORFMAN, J. Chromatogr. 4, 500 [1960].