Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten, II¹

Hydroxylierung von Östradiol-(17 β) zu 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) und Östriol in der Leber von Amphibien*

Von

René Ozon und Heinz Breuer**

Aus der Chemischen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Bonn
(Direktor: Prof. Dr. A. Gütgemann)

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. März 1963)

Während über die Biogenese und den Stoffwechsel von Corticosteroiden bei niederen Vertebraten (Fische, Amphibien, Reptilien) bereits mehrere Angaben vorliegen², sind entsprechende Untersuchungen mit Sexualhormonen bisher nicht durchgeführt worden. Kürzlich haben wir über das Vorkommen von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bei Fischen und Amphibien berichtet¹; in der vorliegenden Arbeit beschäftigen wir uns mit der Frage, ob die Leber von niederen Vertebraten in ähnlicher Weise zur Hydroxylierung von Sexualhormonen befähigt ist wie die Säugetierleber.

Methodik

Steroide: Östradiol-(17 β) und Östriol waren Handelspräparate, 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β), 6 α -Hydroxy-östron und 6-Oxo-östradiol-(17 β) waren Laborpräparate. Alle Steroide wurden papierchromatographisch und durch Bestimmung der Schmelzpunkte auf ihre Reinheit geprüft.

Tiere: Als Versuchstiere dienten Regenbogenforellen (*Salmo iridens*), Tritonen (*Pleurodeles Waltii* Michah) und Grasfrösche (*Rana temporaria*). Weitere Einzelheiten siehe l. c.¹.

Gewebe: Die Lebern wurden unmittelbar nach dem Töten der Tiere entnommen, gewogen und entweder nach Deutsch³ zu Gewebeschnitten verarbeitet oder in 0,25m Rohrzucker-Lösung homogenisiert.

* Verwendete Abkürzungen: NADPH = reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, bisher bekannt als Triphosphopyridin-nucleotid.

** Ständige Adresse: Laboratoire d'Embryologie, Faculté des Sciences, Paris.

¹ I. Mitteil.: H. Breuer, R. Ozon u. C. Mittermayer, diese Z. **333**, 272 [1963], voranstehend.

² J. G. Phillips u. P. J. Mulrow, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **101**, 262 [1959]; J. Nandi u. H. A. Bern, Endocrinology **66**, 295 [1960]; S. Ulick u. S. Solomon, J. Amer. chem. Soc. **82**, 249 [1960]; H. Carstensen, A. C. J. Burgers u. C. H. Li, Gen. Comp. Endocrin. **1**, 37 [1961]; J. G. Phillips, I. Chester Jones u. D. Bellamy, J. Endocrinology **25**, 233 [1962].

³ W. Deutsch, J. Physiology **87**, 56P [1936].

Zellfraktionierung: Das 12proz. Homogenat wurde in einer Spinco-Zentrifuge L für 45 Min. bei $23000 \times g$ und der Überstand für 60 Min. bei $100000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,25m Rohrzucker-Lösung resuspendiert und die Lösung erneut für 60 Min. bei $100000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment (Mikrosomenfraktion) wurde in 0,25m Rohrzucker-Lösung aufgenommen, so daß 1 ml der Lösung die Mikrosomen aus 2 g Lebergewebe enthielt.

Inkubationen: Alle Versuche wurden für 60 Min. bei 30° unter Sauerstoff im Schüttelthermostaten durchgeführt. **Schnittversuche:** 200 μ g Östradiol-(17 β) wurden in 3,0 ml Krebs-Phosphat-Puffer (enthaltend 20 mMol Glucose/l), pH 7,4, mit 200 mg Gewebeschnitten inkubiert. — Versuche mit Mikrosomen: 200 μ g Östradiol-(17 β) wurden mit 1 ml der Mikrosomen-Lösung, 3 μ Mol NADPH und 2,0 ml Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4, inkubiert.

Einzelheiten über die Aufarbeitung und die Papierchromatographie sind früher mitgeteilt worden¹.

Ergebnisse

1. Schnittversuche

Nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit Leberschnitten des Frosches ergaben sich chromatographische Hinweise für die Bildung von Östriol und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β). Versuche mit den Mitochondrien-, Mikrosomen- und löslichen Fraktionen zeigten, daß hydroxylierte Metaboliten von Östradiol-(17 β) nur in der Mikrosomen-Fraktion bei Anwesenheit von NADPH auftraten.

2. Versuche mit Mikrosomen-Fractionen

Nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit Lebermikrosomen der Forelle wurde ein Metabolit nachgewiesen, dessen Wanderungsgeschwindigkeit in Chloroform* etwas geringer war als diejenige von Östriol. Die Substanz ergab eine schwache Blaufärbung mit Folin-Ciocalteus-Reagenz und zeigte im UV zwei Maxima bei 205–210 $m\mu$ und 255 $m\mu$. Eine Identität des Metaboliten mit 2-, 6 α -, 6 β -, 7 α -, 7 β -, 11 β - bzw. 18-Hydroxy-östradiol-(17 β) oder Östriol, 16-*epi*-Östriol bzw. Östra-*p*-chinol konnte ausgeschlossen werden.

Die Inkubation von Östradiol-(17 β) mit Lebermikrosomen des Tritons führte zur Bildung von 2 Verbindungen, die sich bei der Papierchromatographie im System* Chloroform/Äthylacetat 5:1 wie Östriol und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) verhielten. Da die Metaboliten nur in sehr geringer Menge entstanden, konnte eine weitergehende Identifizierung nicht vorgenommen werden.

Auch nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit Lebermikrosomen des Frosches wurde das Auftreten von 2 Verbindungen beobachtet, die sich papierchromatographisch wie Östriol (F₁) und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) (F₂) verhielten. Nach Elution vom Papierchromatogramm zeigte F₁ ein Maximum im UV bei 280 $m\mu$. Ein Teil von F₁ wurde mit Dimethylsulfat behandelt und anschließend an Al₂O₃ chromatographiert⁴. Das Verhalten der methylierten Verbindung bei der Elution entsprach

* Auf formamidimprägniertem Papier.

⁴ J. B. Brown, *Biochem. J.* **60**, 185 [1955].

dem des 3-Methyläthers von Östriol; die eluierte Verbindung ergab bei der Kober-Reaktion⁵ ein Maximum bei 518 m μ . Ein weiterer Teil von F₁ wurde unter atmosphärischem Druck sublimiert; die sublimierten Kristalle hatten einen Schmp. von 280°, der mit dem von authentischem Östriol übereinstimmte.

Substanz F₂ zeigte im UV ein Maximum bei 280 m μ . Nach Reinkubation von F₂ mit Leberschnitten der Ratte entstanden zwei phenolische Metaboliten, die im System* Monochlorbenzol/Äthylacetat 3:1 die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten wie 6 α -Hydroxy-östron und 6-Oxo-östradiol-(17 β) aufwiesen; demnach verhält sich F₂ ähnlich wie 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β), das nach Inkubation mit Rattenleberschnitten ebenfalls 6 α -Hydroxy-östron und 6-Oxo-östradiol-(17 β) liefert⁶. Nach Papierchromatographie an einer Celite-Säule (System: Benzol/Methanol/Äthylacetat/Wasser 9:5:1:5) wurde F₂ in der gleichen Fraktion (16–24 ml) eluiert wie authentisches 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β); bei der anschließenden Papierchromatographie im System* Chloroform/Äthylacetat 5:1 stimmte die Wanderungsgeschwindigkeit der eluierten Substanz mit der von 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) überein.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis erbracht, daß die Leber des Grasfrosches Östradiol-(17 β) zu den gleichen Metaboliten — nämlich Östriol und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) — hydroxyliert wie die Leber des Menschen⁷ und der Ratte⁸; allerdings ist das Ausmaß dieser Umwandlung mit etwa 1% beim Frosch deutlich kleiner als bei den Säugetieren. Wie die Steroidhydroxylasen der Ratte sind auch die Hydroxylasen des Frosches in der Mikrosomenfraktion lokalisiert und benötigen NADPH und O₂ als Cofaktoren.

Die Lebermikrosomen des Tritons können ebenfalls Östriol und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) bilden, während die Mikrosomen der Forellenleber zu diesen Reaktionen offenbar nicht befähigt sind; der bei der Forelle nachgewiesene Metabolit von Östradiol-(17 β) war mit keinem der bekannten Hydroxylierungsprodukte identisch. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Fähigkeit, aromatische und verwandte Fremdstoffe zu hydroxylieren, im Laufe der Phylogenese erst von den auf dem Lande lebenden Tieren erworben wurde; Mikrosomen aus Fischeleber können lipophile Fremdstoffe nicht hydroxylieren⁹. Nach unseren

* auf formamidimprägniertem Papier.

⁵ W. Nocke, *Biochem. J.* **78**, 593 [1961].

⁶ H. Breuer, L. Nocke u. R. Knuppen, *diese Z.* **315**, 72 [1959].

⁷ H. Breuer, R. Knuppen, R. Ortlepp, G. Pangels u. A. Puck, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **40**, 560 [1960].

⁸ H. Breuer u. R. Knuppen, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **39**, 408 [1960].

⁹ B. B. Brodie, J. R. Gillette u. B. N. LaDu, *Annu. Rev. Biochem.* **27**, 427 [1958]; K. Leybold u. H. J. Staudinger, *Dtsch. Med. Wschr.* **87**, 1989 [1962].

Befunden scheint diese Einschränkung auch für die phenolischen Steroide zuzutreffen, sofern es sich um die bei anderen Vertebraten nachgewiesenen Hydroxylierungsprodukte handelt.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. R. Ozon dankt Herrn Prof. L. Gallien, Direktor des Laboratoire d'Embryologie, Faculté des Sciences, Paris, für sein Interesse und dem Centre National de la Recherche Scientifique (C. N. R. S.) für ein Stipendium.

Zusammenfassung

Nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit der Mikrosomenfraktion der Leber des Grasfrosches (*Rana temporaria*) in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff wurden Östriol und 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) als Metaboliten mit Hilfe mikrochemischer Reaktionen identifiziert. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnte keine 6 α - oder 16 α -Hydroxylierung von Östradiol-(17 β) durch Lebermikrosomen der Regenbogenforelle (*Salmo iridens*) nachgewiesen werden.

Summary

Oestriol and 6 α -hydroxyoestradiol-(17 β) were identified as metabolites after incubation of oestradiol-(17 β) with the microsomal fraction of the liver of frog (*Rana temporaria*) in the presence of NADPH and oxygen. Under similar experimental conditions, no 6 α - or 16 α -hydroxylation of oestradiol-(17 β) by the liver microsomes of rainbow trout (*Salmo iridens*) was observed.

Professor Dr. H. Breuer, Chemische Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik, 53 Bonn, Venusberg.