

STUDIUM PROGRESSUS

Über den Stoffwechsel
der Nebennierenrindenhormone

Von H. J. HÜBENER*

Es ist heute möglich, praktisch alle Ausfallserscheinungen der Nebennierenrindeninsuffizienz mit chemisch bekannten Stoffen¹ zu beseitigen, ohne dass hierbei der Blutdruck pathologisch ansteigt oder die Elektrolyte des Organismus in Unordnung geraten. Diese Tatsache macht es wahrscheinlich, dass die chemische Konstitution der wichtigsten Wirkstoffe der Nebennierenrinde (NNR) aufgeklärt ist. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich der Schwerpunkt des biochemischen Interesses in der letzten Zeit von der chemischen Aufklärung auf die enzymatischen Umsetzungen der NNR-Hormone verlagert hat. Über diesen Stoffwechsel der NNR-Hormone inner- und ausserhalb der endokrinen Drüsen wird im folgenden berichtet.

Beginnen wir mit der *Biosynthese*. Der Genius der Natur kommt mit sehr wenigen Enzymreaktionen aus, um Steroidhormone mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen zu bilden. Aus dem Progesteron entsteht durch eine 21-Hydroxylase das einfachste wirksame NNR-Hormon Desoxycorticosteron, durch die oxydative Abspaltung der Seitenkette vom Progesteron Testosteron und schliesslich durch Aromatisierung des A-Ringes Östradiol.

Die steroidhormonproduzierenden Drüsen sind qualitativ mit einem ähnlichen Enzymsatz ausgestattet. So können Testes, Ovarien und die NNR Östrogene und Androgene synthetisieren. Die charakteristische Eigenschaft einer jeden Drüse ist im wesentlichen nur durch quantitative Unterschiede ihrer Enzymausstattung bedingt.

Nur die NNR hat noch einige Enzymsysteme den Ovarien und Testes voraus, nämlich die Enzyme, die Steroide am C-Atom 11, 18 und 21 oxydieren. Diese sind durch fettgedruckte Pfeile in Abbildung 1 hervorgehoben.

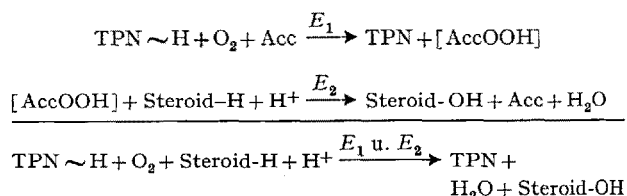
Ob die 17 α -Oxydation auch zu den nebennierenrindenspezifischen Enzymreaktionen gehört, ist noch nicht sicher. Einerseits wurden meines Wissens keine 17 α -Oxy-C₂₁-Steroide aus den Ovarien und Testes isoliert, andererseits scheint aber die Abspaltung der Seitenkette von C₂₁-Steroiden durch die Einführung einer 17 α -Oxy-Gruppe eingeleitet zu werden². Es sei noch erwähnt, dass die Plazenta vielleicht auch diese nebennierenrindenspezifischen Oxygenierungen vermitteln

kann, da gravide Frauen sehr hohe Mengen an 11- und 21-Stellung oxygenierter NNR-Hormone ausscheiden³. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind meines Wissens noch nicht in der Plazenta nachgewiesen worden.

Die 11 β -Oxydation. Zunächst darf ich auf die erste dieser für die NNR typischen Umwandlungen, nämlich die 11 β -Oxydation, näher eingehen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die 11 β -Oxydation von Steroiden durch die NNR-Mitochondrien vermittelt wird⁴. Kürzlich wurde nun von einer englischen und amerikanischen Arbeitsgruppe⁵ unabhängig voneinander überraschenderweise TPNH als Cofaktor bei dieser Oxydation entdeckt. Wenn nämlich NNR-Mitochondrien in Gegenwart von TPNH mit DOC bebrütet werden, so wird innerhalb einer Stunde praktisch alles DOC in Corticosteron überführt. TPN, DPNH und DPN allein sind unwirksam, dagegen ist die Kombination von TPN und DPNH ebenfalls wirksam, weil in der NNR eine Transhydrogenase enthalten ist, die den Wasserstoff von DPNH auf TPN überträgt.

Wie das reduzierte TPN in die 11 β -Oxydation eingreift, beginnt sich in letzter Zeit durch die Arbeiten von HAYANO *et al.*⁶ sowie von anderen Autoren⁷ abzuzeichnen.

Danach liefert TPNH lediglich die Energie, die nötig ist, um Sauerstoff an einen Akzeptor (Acc) anzulagern. Der Akzeptor gibt dann den aktivierten Sauerstoff an das Substrat weiter. Am Beispiel der Oxydation des Phenylalanins zu Tyrosin konnten schliesslich zwei Enzyme wahrscheinlich gemacht werden⁸.



Diese Formulierung erklärt am besten die experimentellen Befunde, wonach der Sauerstoff der Atmosphäre direkt zur 11 β -Oxydation verwendet wird⁹ und das reduzierte TPN obligater Cofaktor ist. Die Anlagerung von Wasser an eine Doppelbindung, wie wir sie bei der Umwandlung von Fumarsäure zur Apfelsäure beobachten, konnte für die 11 β -Oxydation ausgeschlossen werden¹⁰.

Auch die 17- und 21-Oxygenierungen verlaufen wahrscheinlich prinzipiell genau so wie die 11-Oxydation. Beide benötigen nach den neuesten Untersuchungen¹¹ ebenfalls molekularen Sauerstoff.

³ G. MEYERHEIM und H. J. HÜBENER, *Naturwissenschaften* **39**, 482 (1952). – H. J. STAUDINGER und M. SCHMEISSER, *Biochem. Z.* **321**, 83 (1950).

⁴ M. L. SWEAT, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 4056 (1951).

⁵ M. L. SWEAT und M. D. LIPSCOMB, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5185 (1955). – J. K. GRANT und A. C. BROWNIE, *Biochim. biophys. Acta* **18**, 433 (1955).

⁶ M. HAYANO, A. SAITO, D. STONE und R. I. DORFMAN, *Biochim. biophys. Acta* **21**, 380 (1956).

⁷ H. S. MASON und I. ONOPRIENKE, *Fed. Proc.* **15**, 310 (1956). – K. J. RYAN, *Fed. Proc.* **15**, 344 (1956). – W. S. LYNN und R. BROWN, *Biochim. biophys. Acta* **21**, 403 (1956).

⁸ C. MITOMA, *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 476 (1956).

⁹ M. E. SWEAT *et al.*, *Fed. Proc.* **15**, 1200 (1956).

¹⁰ M. HAYANO, M. C. LINDBERG, R. J. DORFMAN, J. E. H. HAUCK und W. E. DOERING, *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 529 (1955).

¹¹ G. ROSENFELD und W. D. BASCOM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **92**, 66 (1956).

* Institut für Vegetative Physiologie der Universität, Frankfurt a. M.

¹ R. S. MACH, J. FABRE, A. DUCKERT, R. BARTH und P. DUCOMMUN, *Schweiz. med. Wschr.* **84**, 407 (1954). – Zusammenfassende Darstellung: J. J. PFIFFNER, *Advances in Enzymology* **2**, 325 (1943). – T. REICHSTEIN und C. W. SHOPPEE, *Vitamins and Hormones* **1**, 346 (1943). – E. C. KENDALL, *Proc. Staff. Meeting Mayo Clin.* **12**, 136 (1937). – T. REICHSTEIN, *Erg. Vitamin-Hormonforsch.* **1**, 334 (1938). – T. REICHSTEIN und J. V. EUW, *Helv. chim. Acta* **21**, 1197 (1938). – O. WINTERSTEINER und J. J. PFIFFNER, *J. biol. Chem.* **116**, 291 (1936). – S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **37**, 1163 (1954).

² W. R. SLAUNWHITE, jr. und L. T. SAMUELS, *J. biol. Chem.* **220**, 341 (1956).

Hormonsynthese in der Nebennierenrinde.

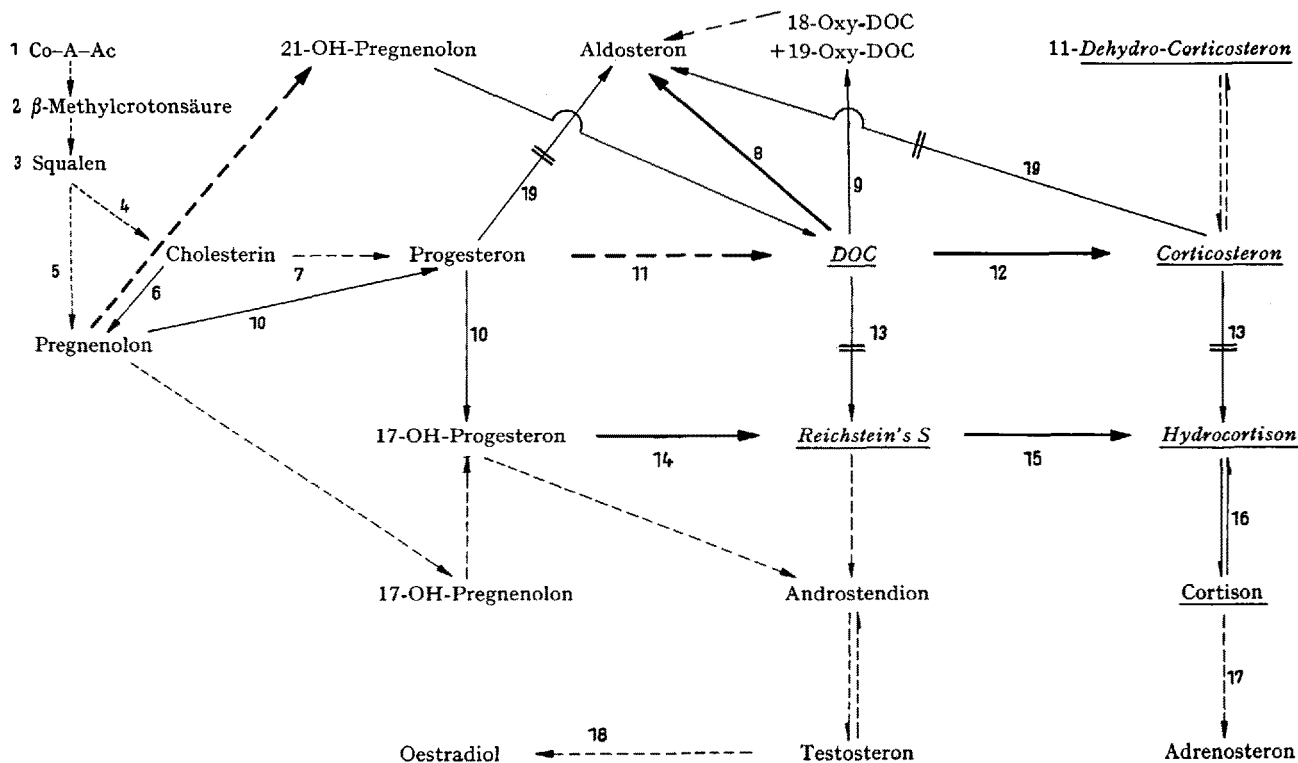


Abb. 1. Die ausgezogenen Pfeile stellen gesicherte, die gestrichelten wahrscheinliche Umwandlungen dar. Die fetten Pfeile geben NNR-spezifische Oxygenierungen an.

Literatur zu Figur 1 (die mit einem Stern gekennzeichneten Umwandlungen wurden in der Nebenniere selbst beobachtet):

- ¹ F. LIPMANN, *Science* **120**, 855 (1954).
- ² J. BONNER, A. B. ARREGUIN, *Arch. Biochem.* **21**, 109 (1949). – K. BLOCH, L. C. CARK und I. HARARY, *J. biol. Chem.* **211**, 687 (1954).
- ³ M. TSUJIMOTO, *J. Ind. and Engin. Chem.* **8**, 889 (1916). – J. M. HEILBRON, E. D. KAMM und W. M. OWENS, *J. Amer. chem. Soc.* **48**, 1630, 3131 (1926). – R. ROBINSON, *J. Soc. chem. Ind.* **52**, 1062 (1934). – R. G. LANGDON, K. BLOCH, *J. biol. Chem.* **200**, 129 (1953).
- ⁴ R. G. LANGDON und K. BLOCH, *J. biol. Chem.* **200**, 135 (1953). – J. W. CORNFORTH, G. D. HUNTER und G. POPJAK, *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 181 (1953).
- ⁵ Ein direkter Weg vom Squalen zu den C_{21} -Steroiden ist deswegen wahrscheinlich, weil nach Gaben von radioaktivem Azetat die spezifische Aktivität der NNR-Hormone grösser ist als die des Cholesterins. O. HECHTER, M. M. SOLOMON, A. ZAFFARONI und G. PINCUS, *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 201 (1953).
- ⁶ E. STAPLE, W. S. LYNN und S. GURIN, *J. biol. Chem.* **219**, 845 (1956).
- ⁷ Nach Gaben von radioaktivem Cholesterin an schwangere Frauen wurde markiertes Pregnandiol gefunden, ein typisches Umwandlungsprodukt des Progesterons: K. BLOCH, *J. biol. Chem.* **157**, 661 (1945).
- ⁸ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Exper.* **11**, 446 (1955).
- ⁹ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **38**, 1237 (1955).
- ¹⁰ H. LEVY, R. W. JEANLOZ, R. P. JACOBSON, O. HECHTER, V. SCHENKER und G. PINCUS, *J. biol. Chem.* **211**, 867 (1954).
- ¹¹ M. HAYANO und R. I. DORFMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **36**, 237 (1952).
- ¹² O. HECHTER, R. P. JACOBSON, R. W. JEANLOZ, H. LEVY, C. W. MARSHALL, G. PINCUS und V. SCHENKER, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 3261 (1949).
- ¹³ O. HECHTER, R. P. JACOBSON, R. W. JEANLOZ, H. LEVY, G. PINCUS und V. SCHENKER, *J. clin. Endocrin.* **10**, 827 (1950). – H. J. HÜBNER und D. AMELUNG, *Hoppe Seylers Z.* **293**, 126 (1953).
- ¹⁴ J. E. PLAGER und L. T. SAMUELS, *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 477 (1953).
- ¹⁵ O. HECHTER, V. SCHENKER und G. PINCUS, *Abstr. 118th Meeting, Amer. chem. Soc.* **29 C** (1950). – O. HECHTER, A. ZAFFARONI, R. P. JACOBSON, H. LEVY, R. M. JEANLOZ, V. SCHENKER und G. PINCUS, *Rec. Prog. Hor. Res.* **6**, 215 (1951) (Academic Press, N.Y.).
- ¹⁶ H. J. HÜBNER und D. AMELUNG, *Hoppe Seylers Z.* **293**, 126 (1953).
- ¹⁷ A. S. MEYER, *J. biol. Chem.* **203**, 469 (1953).
- ¹⁸ I. T. NATHANSON, L. L. ENGEL, B. J. KENNEDY und R. M. KELLEY, *Symposium on Steroids in experimental and clinical Practice* (Blakiston & Co., Philadelphia 1951). – B. BAGGETT, L. L. ENGEL, K. SAVARD und R. J. DORFMAN, *Fed. Proc.* **14**, 175 (1955).
- ¹⁹ A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT und R. NEHER, *Ciba Found. Coll. Endocrin.* **8**, 170 (1955).

Schliesslich sei noch ein Wort über die 11 β -Oxydation in der Leber gesagt. Auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen¹² wurde von verschiedenen Autoren vermutet, dass die Leber Steroide am C-Atom 11

oxydieren könnte. Inzwischen wurden jedoch die vermeintlichen 11-Oxy-Steroide als 20-Oxy-Steroide auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens, des Schmelzpunktes und des Infrarotspektrums identifiziert¹³. Eine Oxydation von Steroiden am C-Atom-11 ist demnach in der Leber nicht möglich und wahrscheinlich nur der NNR vorbehalten.

¹³ H. J. HÜBNER und J. SCHMIDT-THOMÉ, *Hoppe Seylers Z.* **299**, 240 (1955).

Folgende Abkürzungen wurden benutzt:

ATP für Adenosintriphosphat,

DPN für Diphosphopyridinnucleotid,

TPN für Triphosphopyridinnucleotid,

DPNH und TPNH für die hydrierten Kofaktoren;

DOC für Δ^4 -Pregnen-ol-(21)-dion-(3,20) (11-Desoxycorticosteron);

Corticosteron für Δ^4 -Pregnen-diol-(11 β ,21)-dion-(3,20);

Cortison für Δ^4 -Pregnen-diol-(17 α ,21)-trion-(3,11,20);

Hydrocortison für Δ^4 -Pregnen-triol-(11 β ,17 α ,21)-dion-(3,20);

Dihydrocortison für Pregnen-diol-(17 α ,21)-trion-(3,11,20);

Tetrahydrocortison für Pregnen-triol-(3 α ,17 α ,21)-trion-(11,20).

Die Oxydation der angulären Methylgruppe. Als weitere nebennierenrindenspezifische enzymatische Leistung sei die C₁₈-Oxydation kurz besprochen. Nach Arbeiten von WETTSTEIN *et al.* ist wahrscheinlich, dass die C₁₈-Methylgruppe nur dann zum Aldehyd oxydiert werden kann, wenn am C-Atom-11 keine Hydroxylgruppe steht, da NNR-Homogenate nur DOC, nicht jedoch Corticosteron zu Aldosteron oxydierten¹⁴. Zu anderen Ergebnissen gelangten kürzlich DORFMAN *et al.*¹⁵ bei Durchströmungsexperimenten mit Kälbernebennieren. Bei diesen Untersuchungen wurde lediglich Progesteron, nicht dagegen DOC und Corticosteron in Aldosteron umgewandelt.

In diesem Zusammenhang scheint mir wichtig zu erwähnen, dass die Aldosteronbildung im Gegensatz zur Corticosteronsynthese ACTH-unabhängig ist¹⁶. Das ist schwer zu verstehen, da beide Hormone vom Progesteron abstammen und das ACTH jedenfalls nicht die 11 β - und die 21-Oxydation verbessert. Beide Hormone werden nun in zwei verschiedenen Arealen der NNR gebildet¹⁷; vielleicht ist eines dieser Areale ACTH-unabhängig.

In letzter Zeit ist nun beschrieben worden, dass die NNR nicht nur die C-18-Methylgruppe, sondern auch diejenige des C-19 oxydieren kann¹⁸. Obgleich das Enzym, das die C-19-Methylgruppe oxydiert, wahrscheinlich nicht spezifisch für die NNR ist¹⁹, möchte ich doch an dieser Stelle darauf eingehen, da die NNR durch diese Oxydation neutrale Steroide in Östrogene überführen kann. Dieser Weg ist im einzelnen in Abbildung 2 dargestellt.

Aus 19-Oxy-Androsten-dion konnten Ovarien und Plazenta Östron synthetisieren. Der erste Schritt hierbei dürfte die oxydative Decarboxylierung am C-Atom-10 sein. Danach ergeben sich zwei Wege; entweder es wird direkt eine Δ^{10-1} -Doppelbindung eingeführt, oder es entsteht bei der Decarboxylierung eine Hydroxylgruppe am C-Atom-10, die durch Wasserabspaltung in eine Doppelbindung übergeht. Mikroorganismen können übrigens eine 10- ξ -Hydroxylgruppe in 19-Nor-Testo-

steron einführen²⁰. In beiden Fällen entsteht das gleiche Umwandlungsprodukt, ein $\Delta^{1-10,4}$ -3-Keto-Östron-Derivat, das durch einfache Umlagerung in ein Östrogen übergeführt werden kann (Abb. 2). Beide Methylgruppen oxydierenden Fermente sind im Gesamthomogenat am aktivsten, sie werden jedoch auch im Überstand von 5000 g beobachtet¹⁸.

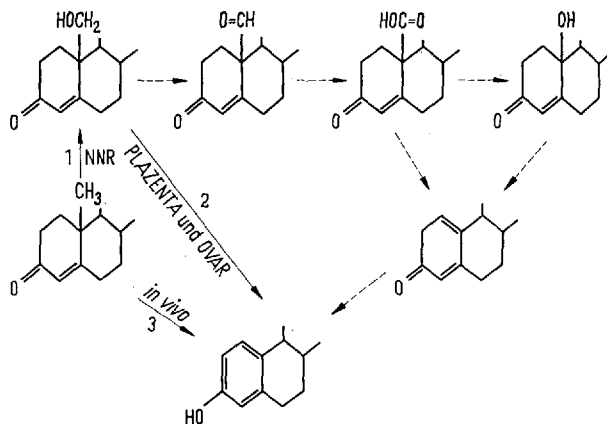


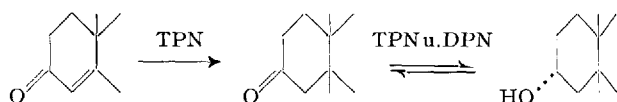
Abb. 2.

¹ A. S. MEYER, Exper. 11, 99 (1955). – F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 38, 1237 (1955). – A. ZAFFARONI, V. TRONCOSO und M. GARCIA, Chem. Ind. 1955, 534. – H. LEVY, S. KUSHUSKY, Arch. Biochem. Biophys. 55, 290 (1955). – M. HAYANO und R. J. DORFMAN, Arch. Biochem. Biophys. 55, 289 (1955).

² A. S. MEYER, Biochim. biophys. Acta 17, 441 (1955).

³ C. D. WEST, B. L. DAMAST, S. D. SARRO und O. H. PEARSON, J. biol. Chem. 218, 409 (1956). – J. NATHANSON *et al.*, zitiert nach R. J. DORFMAN und F. UNGAR, Metabolism of Steroid Hormones (Burgess Publ. Co.). – B. BAGGETT, L. L. ENGEL, K. SAVARD und R. J. DORFMAN, Fed. Proc. 14, 175 (1955). Der Weg 3 wurde soeben auch *in vitro* an menschlichen Ovarialschnitten demonstriert. B. BAGGETT, L. L. ENGEL, K. SAVARD und R. I. DORFMAN, J. biol. Chem. 221, 931 (1956).

Die in Abbildung 3 dargestellte Umwandlung von Androgenen in Östrogene könnte vielleicht der Grund dafür sein, dass sich bei gonadektomierten Karzinomatpatientinnen mitunter eine Resistenz gegen Androgentherapie herausbildet, wenn nämlich diese Androgene zum Teil in der NNR in Östrogene umgewandelt werden. Vielleicht kann diese Umwandlung aber auch ausserhalb der steroidhormonproduzierenden Drüsen stattfinden²¹.



Δ^4 -3-keto-Steroid ges. 3-keto-Steroid 3 α -hydroxy-Steroid

Abb. 3. Reduktion der Δ^4 -3-on-Gruppe durch Enzyme aus dem Zytoplasma der Leberzelle.

Die 21-Hydroxylgruppe kann schliesslich (genau so übrigens die 17 α -Hydroxylgruppe) durch das Zytoplasma und die Mikrosomen der NNR-Zelle in Gegen-

¹⁴ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, Exper. 11, 446 (1955).

¹⁵ E. ROSENBERG, G. ROSENFELD, F. UNGAR und R. I. DORFMAN, Endocrinol. 58, 708 (1956).

¹⁶ S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, Recent Progr. Hormone Res. 11, 183 (1955). – E. H. VENNING, B. SINGER, A. CARBALLEIRA, J. DYRENFURTH, J. BECK und C. J. GIROUD, Ciba Found. Coll. Endocrin. 8, 190 (1955).

¹⁷ P. J. AYRES, R. P. GOULD, J. D. SIMPSON und J. F. TAIT, Biochem. J. 63, 190 (1956). – E. H. VENNING, C. J. GIROUD, M. SAFRAN und A. V. SCHALLY, Proc. Canad. Physiol. Soc., 90th meeting 1955; Conn; J. Lab. clin. Med. (im Druck).

¹⁸ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 38, 1237 (1955).

¹⁹ R. D. H. HEARD, Laurentian Hormone Conference, Estes Park Col. (1955).

²⁰ R. L. PEDERSON, J. A. CAMPBELL, C. BABCOCK, S. H. EPPSTEIN, H. C. MURRAY, A. WEINTRAUB, R. C. MEECS, P. MEISTER, L. M. REINICKE und D. H. PETERSON, J. Amer. chem. Soc. 78, 1512 (1956).

²¹ C. D. WEST, B. L. DAMAST, S. D. DAMAST, S. D. SARRO und O. H. PEARSON, J. biol. Chem. 218, 409 (1956).

wart von TPN²² (oder ATP, DPN und Nikotinsäureamid²³) eingeführt werden.

Die der Biosynthese übergeordneten Proteohormone der Hypophyse zeigten sich in den hier besprochenen zellfreien Systemen unwirksam²⁴, sie werden daher in diesem Rahmen nicht besprochen.

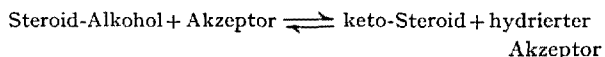
Der extraadrenale Stoffwechsel der NNR-Hormone. Ich möchte im folgenden von der grossen Zahl der Veränderungen, die die NNR-Hormone ausserhalb der endokrinen Drüsen erleiden, nur vier herausgreifen; nämlich die Reduktion der 11-Keto-Gruppe, der 20-Keto-Gruppe und der Δ^4 -3-on-Gruppe sowie die Konjugation der NNR-Hormone mit Glucuronsäure (vgl. Tab.). Ausser der letztgenannten Konjugation handelt es sich also ausschliesslich um reduktive Veränderungen der NNR-Hormone. Diese vier extraglandulären Hormonumwandlungen übertreffen quantitativ bei weitem alle übrigen. Sie lassen sich mit Leberhomogenaten im Reagenzglas mit einer Ausbeute von 50 bis 100% durchführen, und *in vivo* laufen sie praktisch quantitativ ab.

Demgegenüber verlaufen alle übrigen extraglandulären Steroidumwandlungen *in vivo* und *in vitro* mit viel geringerer Ausbeute, meist weniger als 1%; so zum Beispiel die 2 α -²⁵, die 2 β -²⁶ und die 16 α -Oxygenierung²⁷ sowie die Umwandlung von 21-Oxy-Steroiden in 21-Methyl-Steroide. Die Umwandlungsprodukte dieser Reaktionen sind, soweit dies bisher geprüft wurde, biologisch inaktiv. Man kann sie daher wohl als Nebenreaktionen betrachten.

Die Berichte über die enzymatische *in vitro*-Abspaltung der Seitenkette von NNR-Hormonen ausserhalb der endokrinen Drüsen sind bisher nicht überzeugend, da die Ausbeute hierbei immer kleiner war als 1% und diese geringe Menge auch leicht als Kunstprodukt zum Beispiel durch Peroxyde im Äther oder Adsorbentien entstehen kann. Wir konnten die Abspaltung in Leberhomogenaten nicht beobachten²⁸. *In vivo* läuft sie dagegen mit grösserer Ausbeute ab. So konnten STAUDINGER *et al.*²⁹ an gonadektomierten und adrenaletomierten Frauen eine Umwandlung von Cortison in 17-keto-Steroide sicher nachweisen. Immerhin scheint uns noch möglich, dass ein Teil dieser 17-keto-Steroide als Artefakt an der Aluminiumoxydsäule entstehen.

Enzyme, die die 11- und 20-keto-Gruppe reduzieren. Besprechen wir nun die vier oben erwähnten Hauptreaktionen, und beginnen wir mit den von uns im hiesigen Institut untersuchten Enzymen, die die NNR-Hormone am C-Atom-11 und -20 reduzieren³⁰. Die hierfür verant-

wortlichen Enzyme sind Dehydrogenasen, die folgende Reaktion vermitteln:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist, wie bei den meisten Dehydrogenasen, weit nach der alkoholischen Seite hin verschoben. Um möglichst grosse enzymatische Umwandlungen beobachten zu können, haben wir daher die Reaktionen von rechts nach links verfolgt; das heisst, wir haben keto-Steroide eingesetzt und anschliessend analysiert, wieviel von dem keto-Steroid in das entsprechende alkoholische Steroid umgewandelt wurde.

Die Enzyme, die die 11- und 20-keto-Gruppe von Steroiden reduzieren, weisen auffallend ähnliche Eigenschaften auf. Beide Dehydrogenasen sind in den Mikrosomen der Leber lokalisiert und können mit sehr geringen Mengen *p*-Chlormercuribenzoat (10^{-4} m) vergiftet werden. Glutathion und Zystein verhindern die Vergiftung, was dafür spricht, dass freie Sulfhydrylgruppen des Enzyms bei der Umwandlung beteiligt sind. Die bekannten Kofaktoren für Dehydrogenasen, die Pyridinnukleotide und die Zytochrome konnten wir für unsere Enzyme ausschliessen.

Kürzlich wurde von RECKNAGEL *et al.*³¹ sowie von DE CURCY *et al.*³² mit einer indirekten Methode unsere frühere Beobachtung³³ bestätigt, dass die Enzymsysteme, die die 20-keto-Gruppe reduzieren, in den Mikrosomen der Leberzelle lokalisiert sind. Im Gegensatz zu uns vermuten diese Autoren, dass TPNH³¹ beziehungsweise DPNH und TPNH³² Kofaktoren der 20-keto-Reduktion sind; diese Angaben sind aber aus methodischen Gründen nicht gesichert. Unseren Befunden entsprechen auch die Beobachtungen von EISENSTEIN³⁴ und CASPI *et al.*³⁵, nach denen DPNH und TPNH praktisch unwirksam bei der Reduktion der Seitenkette sind.

Beide Enzyme zeigten auffallende Substratspezifität. So wurde die 11-keto-Gruppe nur von den Steroiden reduziert, die die Δ^4 -3-on-Gruppe besitzen³⁶, nicht dagegen von im A-Ring gesättigten Steroiden³⁷. Es ist daher wahrscheinlich, dass das Steroid erst mit der Δ^4 -3-on-Gruppe an die besprochene Dehydrogenase gebunden wird, bevor es in 11-Stellung reduziert werden kann. Bei der enzymatischen 20-keto-Reduktion andererseits beeinflusst die Substitution am C-Atom-11 den sterischen Verlauf der Umwandlung: 11 β -Oxy-Steroide werden nämlich zu 20 β -, 11-desoxy- und 11-keto-Steroide zu 20 α -Derivaten reduziert³⁷ (Tabelle 1). Es sind daher wahrscheinlich zwei Gruppen von Enzymen in den

²² R. I. DORFMAN, M. HAYANO, R. HAYNES und K. SAVARD, Ciba Found. Coll. Endocrin. 7, 191 (1953). – J. R. KENNETH und L. L. ENGEL, J. Amer. chem. Soc. 78, 2654 (1956).

²³ J. E. PLAGER und L. T. SAMUELS, Fed. Proc. 11, 383 (1952). – K. J. RYON, Fed. Proc. 15, Ref. Nr. 1125 (1956).

²⁴ M. SAFFRAN und M. J. BAYLISS, Endocrinol. 52, 140 (1953). – F. G. HOFFMANN und C. DAVIDSON, Endocrinol. 54, 580 (1954). – H. J. HÜBENER und D. AMELUNG, Hoppe Seylers Z. 293, 126 (1953).

²⁵ S. BURSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 78, 1769 (1956).

²⁶ L. R. AXELROD, L. L. MILLER und F. HERLING, J. biol. Chem. 219, 455 (1956).

²⁷ J. J. SCHNEIDER und H. L. MASON, J. biol. Chem. 172, 771 (1948).

²⁸ K. W. BRÜCKEL, H. J. HÜBENER, G. MEYERHEIM und G. LIERSCH, Klin. Wschr. 32, 21 (1954).

²⁹ H. J. STAUDINGER, M. TAUGNER und W. WEISS, Klin. Wschr. 32, 1082 (1954).

³⁰ H. J. HÜBENER und D. AMELUNG, Hoppe Seylers Z. 293, 126 (1953). – H. J. HÜBENER und J. SCHMIDT-THOMÉ, Hoppe Seylers Z. 299, 240 (1955).

³¹ R. O. RECKNAGEL und E. M. GLENN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 156 (1955).

³² C. DE COURCY und J. J. SCHNEIDER, J. biol. Chem. 223, 865 (1956).

³³ H. J. HÜBENER, V. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, April 1954 (Springer-Verlag, Heidelberg). – H. J. HÜBENER und D. AMELUNG, Z. physiol. Chem. 293, 126 (1953). – H. J. HÜBENER, Z. physiol. Chem. 298, 283 (1954).

³⁴ A. B. EISENSTEIN, J. biol. Chem. 215, 585 (1955).

³⁵ E. CASPI, M. C. LINDBERG, M. HAYANO, J. L. COHEN, M. MATSUBA, H. ROSENKRANTZ und R. I. DORFMAN, Arch. Biochem. Biophys. 61, 267 (1956).

³⁶ H. J. HÜBENER und D. AMELUNG, Hoppe Seylers Z. 293, 126 (1953). – C. A. FISH, M. HAYANO und G. PINCUS, Arch. Biochem. Biophys. 42, 480 (1953). – A. B. EISENSTEIN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 83, 27 (1953).

³⁷ H. J. HÜBENER, D. F. FUKUSHIMA und T. G. GALLACHER, J. biol. Chem. 220, 499 (1956).

Hauptreaktionen des Steroid-Stoffwechsels ausserhalb der endokrinen Drüsen

Enzym-Reaktion	Name des Enzyms	Reinste Enzym-aufarbeitung	Kofaktor	MK	Untersuchte Steroide	Substrat-Spezifität	Lit.
11-Keto-Reduktion (reversibel)	11 β -Oxy-Dehydrogenase	Mikrosomen der Leber	unbekannt*	2·10 ⁻⁵	KENDALLS, E. u. A. REICHSTEINS U. 11-Keto-Progesteron Andrenosteron	spezifisch für Δ^4 -3-Keto-Steroide	1
20-Keto-Reduktion der Dioxazeton-Seitenkette (irreversibel)	20-Keto-Hydrogenase	Mikrosomen der Leber	unbekannt*	5·10 ⁻⁵	REICHSTEINS S \rightarrow 20 α Tetrahydro E \rightarrow 20 α Tetrahydro F \rightarrow 20 β KENDALLS F \rightarrow 20 β	11-Oxy-Steroide \rightarrow 20 β 11-Keto und 11-Desoxy-Steroide \rightarrow 20 α	1
Δ^4 -Reduktion von Δ^4 -3-Keto-Steroiden (irreversibel)	Δ^4 -Hydrogenase	Ammoniumsulfat-Präzipitat der Leber-Proteinfraktion (55–70%)	TPNH		Cortison zu Dihydro-Cortison	grosse Substrat-Spezifität	2
3-Keto-Reduktion (reversibel)	3 α -Oxy-Dehydrogenase	Ammoniumsulfat-Präzipitat der Leber-Proteinfraktion (55–70%), anschliessend Äthanol-Fällung (20–30 Vol%), 100fache Anreicherung; das Enzym kommt auch in der Niere und den Testes vor	DPNH und TPNH	10 ⁻⁵	Dihydrocortison, Pregnan-triol-(11 β , 17 α , 21)-dion-(3,20) Ätiocholon-dion-(3,17) Androstan-dion-(3,17) Androstan-ol-(17 β)-on(3)	Steroide mit Iso-octylseitenkette sowie α - β -ungesättigte 3-Keto-Steroide werden nicht umgesetzt	2
Glucuronid-Bildung	Steroid-Glycosidase	Mikrosomen	Uridin-Diphosphat		Tetrahydro-Cortison	3 α -Glucuronid von Tetrahydro-Cortison	3

¹ H. J. HÜBENER, D. K. FUKUSHIMA und T. F. GALLAGHER, J. biol. Chem. 220, 499 (1956). – H. J. HÜBENER, V. Coll. Mosbach (Springer, Berlin 1954).

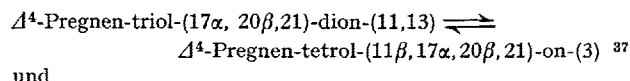
² G. M. TOMKINS, J. biol. Chem. 218, 437 (1956); *Laurentian Hormone Conference* (Estes Park, Col. 1956).

³ K. J. ISSELBACHER und J. AXELROD, J. Amer. chem. Soc. 77, 1070 (1955).

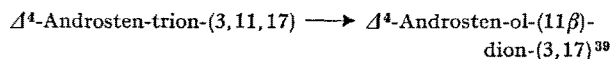
* Wahrscheinlich ein Flavin (H. J. HÜBENER, unveröffentlicht).

Mikrosomen vorhanden, die die 20-keto-Gruppe reduzieren. Die eine Gruppe setzt vorwiegend 11 β -oxy-, die andere 11-desoxy- und 11-keto-Steroide um.

In letzter Zeit wurde erwogen³⁸, ob die Oxydoreduktion am C-Atom-11 mit dem Wirkungsmechanismus der 11-oxygenierten NNR-Hormone verknüpft sei. Obgleich dies bei dem heutigen Stand des Wissens³⁸ nicht sicher ausgeschlossen werden kann, spricht doch dagegen, dass im Überlebenstest unwirksame 11-Oxy-Steroide auch an 11-Stellung zum Teil reversibel oxydiert und reduziert werden können, zum Beispiel:



und



Die Suche nach Kofaktoren der 11- und 20-keto-Reduktion wird dadurch erschwert, dass diese Enzyme

in den Mikrosomen ausserordentlich labil sind. Sedimentieren und Rehomogenisieren der Mikrosomen, sowie Austauschchromatographie des Enzymsystems an Dowex I zerstört den grössten Teil der Aktivität, auch wenn man danach wieder das Zytoplasma oder Kochsaft zusetzt. Es handelt sich also um eine mechanische Zerstörung und nicht um das Auswaschen oder Adsorbieren eines Kofaktors.

Um einfachere Enzymmodelle für diese Umwandlungen zu finden, haben wir gemeinsam mit Herrn Professor SCHMIDT-THOMÉ die 20-keto-Reduktion durch Enzyme von Mikroorganismen⁴⁰ untersucht. Diese Enzyme verhielten sich jedoch in allem gegensätzlich zu den entsprechenden Säugetierenzymen. Sie sind pyridinnukleotidabhängig und zwar in gleichem Masse von DPNH und TPNH, sie reduzieren 20-keto-Steroide ausschliesslich zu 20 β -Derivaten und sind im Zytoplasma lokalisiert, also nicht strukturgebunden. Steroidumwandelnde Enzyme von Mikroorganismen eignen sich also nicht als Modelle der entsprechenden Säugetierenzyme. Dies steht zum Beispiel im Gegensatz zu den Enzymen der Gly-

³⁸ J. E. BUSH, Exper. 12, 325 (1956).

³⁹ H. J. HÜBENER, Hoppe Seylers Z. 298, 283 (1954).

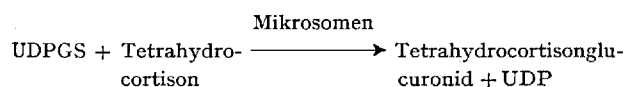
⁴⁰ S. A. SZPILFOGEL, M. S. DE WINTER und W. Y. ALSCHÉ, Rec. trav. chim. 75, 402 (1956). – A. WETTSTEIN, Exper. 11, 465 (1955).

kolyse. Wahrscheinlich deshalb, weil die NNR-Hormone keine physiologischen Bestandteile der Mikroorganismen sind und es daher dem Zufall überlassen bleibt, wie diese Hormone von den Mikroorganismen durch adaptive Enzyymbildung umgesetzt werden.

Die Reduktion der Δ^4 -3-on-Gruppe. Wenden wir uns nun der Reduktion der Δ^4 -3-on-Gruppe zu. Sie verläuft in zwei Schritten⁴¹ (Abb. 3).

Der erste Schritt der Reduktion ist die Hydrierung der Doppelbindung. Das Enzym hierfür ist im Zytoplasma der Leberzelle lokalisiert. Es lässt sich zwischen 55 und 70% Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällen und ist TPNH-abhängig⁴¹. Die Reaktion ist irreversibel. Bei dem zweiten Schritt sind DPNH und TPNH gleich wirksam. Ferner ist dieser Schritt im Gegensatz zum ersten reversibel, das heisst 3α -Oxy-Steroide können durch die Leber zu 3-keto-Steroiden reduziert werden. Das Enzym, die 3α -Oxy-Dehydrogenase weist keine strenge Substratspezifität auf⁴². Die meisten untersuchten 3-keto-Steroide wurden von ihm reduziert, lediglich Steroide mit konjugierter Doppelbindung (Cortison oder Hydrocortison) und Steroide mit Iso-Octylseitenkette (Cholestanon und Coprostanon) werden von dem Enzym nicht umgesetzt. Da die eben besprochene Δ^4 -Dehydrogenase jedoch nur 5β H-Derivate bildet, bleibt noch ungeklärt, wie die aus dem Harn isolierten 5α H-Derivate aus Δ^4 -Steroiden entstehen.

Die Glucuronidbildung. Als letzte der extraadrenalen Umwandlungen möchte ich noch die Glucuronidbildung von NNR-Hormonen in der Leber besprechen. Die Leber verknüpft fast ausschliesslich nur 3-oxy-Steroide mit Glucuronsäure. Das bedeutet, dass die NNR-Hormone schon durch das zuletzt besprochene Enzymsystem im A-Ring reduziert sein müssen, bevor sie in ein Glucuronidderivat überführt werden. Das konjugierende Enzym ist genau so wie die Enzyme, die die 11-keto- und 20-keto-Gruppe reduzieren, in den Mikrosomen lokalisiert⁴³. Der Kofaktor für diese Konjugation ist Uridindiphosphat (UDP), das an seiner freien Phosphorgruppe mit Glucuronsäure verknüpft ist. Das Enzym überträgt nun die Glucuronsäure von dem Kofaktor auf das 3-oxy-Steroid. Hierbei hebt das Uridindiphosphat die Glucuronsäure auf ein höheres Energieniveau, ähnlich wie das ATP die Phosphorsäure.



Von den gleichen Autoren, die diese Reaktion entdeckten⁴³, wurde auch gezeigt, dass dieses Enzymsystem auch Phenolphthalein und Thyroxin in die entsprechenden Glucuronide überführt.

Über die biologische Aktivität. Wie steht es nun mit der biologischen Aktivität der extraadrenalen Umwandlungsprodukte? Beginnen wir wieder bei der enzymatischen 11-keto-Reduktion. Cortison wird in der Leber zu Hydrocortison reduziert, das im Muskeltest und im Glykogenspeicherungstest dem Cortison etwas überlegen ist und intraartikulär injiziert, im Gegensatz zum Cortison, entzündungshemmend wirkt⁴⁴. Hier liegt also eine

Aktivierung des Hormons durch die Leber vor. Wie wir an den folgenden Beispielen sehen werden, handelt es sich hierbei jedoch um eine Ausnahme. Die 20-keto-Reduktion von NNR-Hormonen führt, wie oben erwähnt, zu 20α - und 20β -oxy-Derivaten in der Leber. Diese 20-oxy-Steroide können adrenaletomierte Tiere nicht am Leben erhalten. Das 20β -oxy-Derivat von Hydrocortison, REICHSTEINS Substanz E, behält jedoch etwas von seiner glykogenspeichernden Wirkung⁴⁵. Wie weit dies auch für andere 20-oxy-Derivate zutrifft, ist meines Wissens noch nicht untersucht. Auch die Reduktion der Δ^4 -3-on-Gruppe von NNR-Hormonen führt zum Verlust der lebenserhaltenden und glykogenspeichernden Wirkung. Nur bei den 3α -Alloprognan-Derivaten von Cortison und Hydrocortison bleibt ein Teil der Mineralstoffwechselwirkung zurück⁴⁶. Es ist durchaus denkbar, dass die Mineralstoffwechselwirkung einiger NNR-Hormone ein Attribut ihrer enzymatischen Reduktion in der Leber ist. Die in letzter Zeit mikrobiologisch synthetisierten $\Delta^{1,4}$ -NNR-Hormone können wahrscheinlich nicht von der Leber am A-Ring reduziert werden⁴⁷ und haben vielleicht deswegen geringere Mineralstoffwechselwirkung. Die Glucuronidderivate von NNR-Steroiden sind vollständig inaktiv, soweit dies bisher geprüft wurde. Die Konjugation findet wahrscheinlich statt, um die Steroide harnfähig zu machen. Durch drei dieser vier Hauptreaktionen verlieren die NNR-Hormone also ihre wesentlichste, nämlich ihre lebenserhaltende Wirkung.

Um einen Anhalt dafür zu bekommen, in welchem Ausmass diese Umwandlungen in der Leber ablaufen, wollen wir folgenden Überschlag anstellen: innerhalb einer halben Stunde werden nach unseren Untersuchungen von 200 mg Rattenleberhomogenat etwa 10–20 γ REICHSTEINS Substanz S in 20-Stellung reduziert. Wenn sich diese Experimente auf den Menschen übertragen lassen, so würde die 1400 g schwere Leber eines Erwachsenen 70–140 mg Steroid in dieser Zeit am C-Atom-20 reduzieren. Das Zytoplasma einer entsprechenden Lebermenge der Ratte reduziert in Gegenwart von TPNH und Nikotinsäureamid etwa 50–100 γ Cortison zu Tetrahydrocortison im gleichen Zeitraum. Auf den Menschen übertragen, entspräche das 350–700 mg Cortison, die in dieser Zeit durch Reduktion des A-Ringes inaktiviert werden. Auch bei Durchströmungsversuchen inaktivierte die Rattenleber NNR-Hormone sehr rasch⁴⁸. Bei einem Durchlauf wurden etwa 11 mg Hydrocortison inaktiviert. Auf die menschliche Leber übertragen, entspräche das etwa 1,5 g Hydrocortison, die bereits beim ersten Durchlauf inaktiv werden können. Der Überschlag lässt schon erkennen, dass wahrscheinlich nach peroraler Gabe von klinisch üblichen Dosen, zum Beispiel 200 mg Cortison, der überwiegende Teil des Hormons innerhalb kürzester Zeit von der Leber inaktiviert wird. Experimente am Hund bestätigen dies. Nach oraler Gabe von radioaktivem Cortison wurden nämlich weniger als 4% des verabreichten Cortisons in der Vena hepatica als Cortison oder Hydrocortison wiedergefunden⁴⁹. Dabei ist sicher, dass

⁴¹ G. TOMKINS und K. J. ISSELBACHER, J. Amer. chem. Soc. 76, 3100 (1954).

⁴² G. TOMKINS, J. biol. Chem. 218, 437 (1956).

⁴³ K. J. ISSELBACHER und J. AXELROD, J. Amer. chem. Soc. 77, 1070 (1955).

⁴⁴ J. L. HOLLANDER, E. M. BROWN jr. und R. A. JSSEK, J. Amer. med. Assoc. 147, 1629 (1951).

⁴⁵ D. ABELSON, F. ULRICH und C. N. H. LONG, Proc. Soc. exp. Biol. med. 89, 386 (1955).

⁴⁶ E. CASPI, H. LEVY und O. HECHTER, Arch. Biochem. Biophys. 45, 169 (1953).

⁴⁷ G. H. GRAY und M. A. S. GREEN, Lancet 1955, 1067. – R. S. ELY, A. K. DONE und V. C. KELLEY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 503 (1956).

⁴⁸ E. CASPI und O. HECHTER, Arch. Biochem. Biophys. 61, 299 (1956).

⁴⁹ O. HECHTER, Vitamins and Hormones 13, 318 (1955).

die Steroidhormone nicht über den *Ductus lymphaticus* direkt in den grossen Kreislauf gelangen⁵⁰.

Über den Wirkungsort. Das Schicksal, von der Leber inaktiviert zu werden, teilen die NNR-Hormone also mit den anderen Steroidhormonen. Überraschend ist nun, dass die NNR-Hormone (im Gegensatz zu den Östrogenen, den Androgenen und dem Progesteron) trotz dieser fast vollständigen Inaktivierung durch die Leber peroral, das heisst nach Leberpassage, gut wirksam sind und zwar fast genau so wirksam wie intramuskulär appliziert. Um diesen Widerspruch zu erklären, diskutiert HECHTER⁴⁹, dass die NNR-Hormone erst in der Leber zu den eigentlich aktiven Wirkstoffen umgewandelt werden könnten, ähnlich wie zum Beispiel unter geeigneten Bedingungen Pepsinogen in Pepsin, Trypsinogen in Trypsin oder Prothrombin in Thrombin verwandelt werden. Auf Grund der besprochenen Untersuchungen stehen jedoch in der Leber die enzymatischen Umwandlungen im Vordergrund, die NNR-Hormone inaktivieren. Da die NNR-Hormone trotzdem peroral ausgezeichnet wirksam sind, müssen sie daher schon in der Leber einen wesentlichen Teil ihrer Wirkung entfaltet haben, bevor sie dort inaktiviert werden. Die bekannten Wirkungen in der Peripherie könnten zum grossen Teil durch die Leber vermittelt sein.

Es liegt meines Erachtens kein Widerspruch darin, dass die NNR-Hormone am Ort ihrer Wirkung auch inaktiviert werden, ist doch die Inaktivierung eine wesentliche Voraussetzung ihrer regulativen Leistung.

Diese Untersuchungen geben also einen Anhalt dafür, dass die Leber ein wesentlicher Wirkungsort der NNR-Hormone ist und die Leber somit ein lohnendes Objekt zum Studium des Wirkungsmechanismus der NNR-Hormone sein dürfte.

Herrn Professor FELIX danke ich für Gewährung eines Arbeitsplatzes und wertvolle Ratschläge und Herrn Professor SCHMIDT-THOMÉ für zahlreiche Literaturhinweise.

Summary

Three reactions, the 11 β - and the 21-hydroxylation as well as the oxydation of the angular carbon 18, are specific for the adrenals. All other enzymatic steps in the biosynthesis of steroidhormones have been demonstrated in some other tissues also. Cofactors for the hydroxylation of steroids are reduced pyridinenucleotides. They seem to be necessary to activate molecular oxygen.

The extra-adrenal metabolism of adrenal hormones occurs mainly in the liver. Four principal reactions are known: the reduction of the Δ^4 -3-on-, the 11-keto-, and the 20-keto-group as well as the conjugation of steroids with glucuronid acid. Evidence is given that the liver is the main target of corticosteroid action.

⁵⁰ E. H. KASS, O. HECHTER, E. CASPI und R. AYCOCK, J. clin. Endocrin. Metab. 15, 167 (1955).

CONGRESSUS

BRASIL

International Symposium on Curare and Curare-like Agents

Rio de Janeiro (Brasil)

5–7 August, 1957

Sponsored by the President of the United States of Brasil, organised under the Auspices of Unesco the Conselho Nacional de Pesquisas, the Academia Brasileira de Ciencias and the Universidade do Brasil, a Symposium on Curare and Curare-like substances in the following problems is going to take place. The ethnographical problems concerning South-American Curare, the botanical origin of the active principle of Curare, the chemistry of Curare-like alkaloids, synthetic Curare, the physiology of the neuromuscular transmission and the mechanism of curarisation, pharmacological properties, the clinic of Curare.

The lectures will be held in the first week of August from 5th to 10th. Official languages are Portuguese, next Spanish, French, and English.

Correspondence for Brasil should be sent to Prof. C. CHAGAS, Instituto de Biofisica, Universidade do Brasil, 458 Avenida Pasteur, Rio de Janeiro; for Europe, to Prof. D. BOVET, Istituto Superiore di Sanità, 299 Viale Regina Elena, Rome, and to Prof. P. B. CARNEIRO, Délégation du Brésil, Unesco, 19, Av. Kléber, Paris (XVI^e).

CONGRESSUS

GREAT BRITAIN

XVth International Congress of Zoology

London 16th to 23rd July, 1958

The XVth International Congress of Zoology will take place in London from 16th to 23rd July, 1958, under the Presidency of Sir GAVIN DE BEER, F.R.S., Director of the British Museum (Natural History).

If you have not received the preliminary invitation, please inform the Registrar of the Congress: c/o British Museum (Natural History), London, S.W.7, England.

H. R. HEWER

Secretary-General