

### 131. Über die Steroidoxydase von *Fusarium lini* (BOLLEY)

9. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen<sup>1)</sup>

von E. WEISS-BERG und Ch. TAMM

(6. IV. 63)

An zahlreichen Beispielen ist gezeigt worden, dass das oxydierende Enzym-System von *Fusarium lini* (BOLLEY)  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide, deren Ringe C und D transständig miteinander verknüpft sind (Androstan- und Pregnan-Derivate), in  $15\alpha$ -Stellung hydroxyliert<sup>2)</sup>. Bei Substraten mit *cis*-verknüpften Ringen C und D (Cardenolide und Bufadienolide) erfolgte hingegen die Hydroxylierung immer in  $12\beta$ -Stellung<sup>3)</sup>. Die chemische Natur der an C-17 haftenden Substituenten und die Raumfüllung benachbarter Hydroxylgruppen in  $14\alpha$ - und  $17\alpha$ -Stellung beeinflussten diese stereospezifisch verlaufenden Reaktionen nicht. Es stellte sich damit die Frage, ob der Mikroorganismus zwei spezifisch hydroxylierende Enzyme, eine  $12\beta$ - und eine  $15\alpha$ -Hydroxylase bildet, deren Wirkung durch die beiden Substrattypen angeregt wird, oder ob es sich um eine einzige, relativ unspezifische Steroidoxydase handelt. Um dies abzuklären, haben wir die folgenden Versuche unternommen.

Wir gingen von der Hypothese der Enzym-Induktion aus und nahmen zunächst willkürlich an, dass die wachsenden Kulturen von *F. lini* zwei Hydroxylasen enthalten. In der Zeitspanne, in welcher die eine Hydroxylase durch den einen Substratyp voll aktiviert war, wurde der zweite Substratyp zur Kultur des Pilzes zugegeben und hierauf Ort und Geschwindigkeit der Hydroxylierung festgestellt. Zu diesem Zweck wurden periodisch Kulturproben aufgearbeitet und papierchromatographisch analysiert. Der Gehalt an Edukt und Produkt liess sich mit Hilfe von parallel laufenden Verdünnungsreihen semiquantitativ ermitteln. Als Substrate wählten wir Cortexon (Desoxycorticosteron) (C/D-*trans*-Typ) und Digitoxigenin (C/D-*cis*-Typ); beide werden in einer sauberen, eindeutig verlaufenden Reaktion monohydroxyliert (in  $15\alpha$ - bzw.  $12\beta$ -Stellung). Es trat weder beim Cortexon eine  $12\beta$ -Hydroxylierung noch beim Digitoxigenin eine  $15\alpha$ -Hydroxylierung ein. Beide Reaktionen verliefen normal; ihr Verlauf ist in den Figuren 1 und 2 graphisch dargestellt. Aus ihnen ist ersichtlich, dass bei Cortexon die Reaktionsgeschwindigkeit viel grösser als bei Digitoxigenin ist<sup>4)</sup>. Die Gegenwart von Cortexon im Digitoxigenin-Ansatz beschleunigte sogar die  $12\beta$ -Hydroxylierung des Digitoxigenins zu Digoxigenin (vgl. Kurven 1 und 2 in Fig. 2)<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> 8. Mitteilung: CH. TAMM, A. GUBLER, G. JUHASZ, E. WEISS-BERG & W. ZÜRCHER, Helv. 46, 889 (1963).

<sup>2)</sup> A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. 41, 301 (1958); CH. TAMM *et al.*<sup>1)</sup>.

<sup>3)</sup> A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. 41, 297 (1958); CH. TAMM & A. GUBLER, Helv. 41, 1762 (1958); 42, 239, 473 (1959).

<sup>4)</sup> Dies gilt ganz allgemein für die mikrobiologische Umwandlung der von uns bisher untersuchten Cardenolide und Bufadienolide; die Reaktion verläuft wesentlich träger als in der Androstan- und Pregnan-Reihe.

<sup>5)</sup> Y. NOZAKI, E. MASUO & D. SATOH, Agric. biol. Chemistry (Japan) 26, 399 (1962), beobachteten eine analoge Beschleunigung der  $7\beta$ - bzw.  $1\beta, 5\beta$ -Hydroxylierungen von Digitoxigenin durch *Absidia orchidis* bei Zusatz von Cortexon oder REICHSTEIN's Substanz S.

In einem weiteren Experiment (vgl. Fig. 3) gaben wir Digitoxigenin und Cortexon gleichzeitig zur wachsenden Kultur des Pilzes zu. In Cortexon wurde wieder die  $15\alpha$ -Stellung und in Digitoxigenin die  $12\beta$ -Stellung hydroxyliert. Ein Vergleich mit Kontrollen zeigte, dass das Einsetzen der Oxygenierung von Cortexon (Kurve 1a) in Gegenwart von Digitoxigenin verzögert wurde (Kurve 1b), während die Anwesenheit von Cortexon die viel langsamere Reaktion von Digitoxigenin (Kurve 2b)

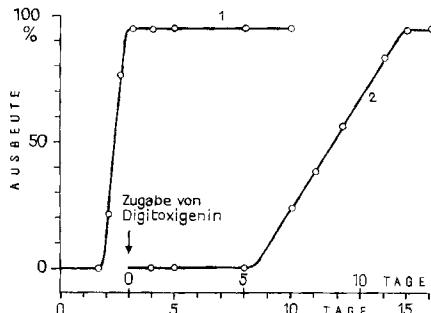


Fig. 1. Versuch zur Substratspezifität der Steroidoxydase von *F. lini*: Inkubation mit Cortexon und späterer Zugabe von Digitoxigenin

Kurve 1: Bildung von  $15\alpha$ -Hydroxycortexon

Kurve 2: Bildung von Digoxigenin ( $12\beta$ -Hydroxylierung)

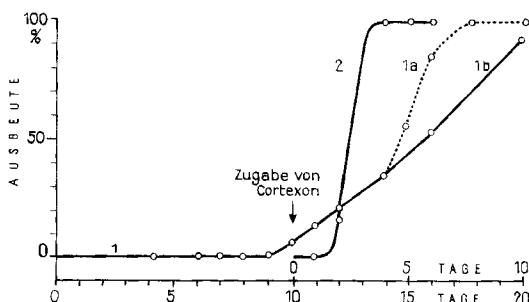


Fig. 2. Versuch zur Substratspezifität der Steroidoxydase von *F. lini*: Inkubation mit Digitoxigenin und späterer Zugabe von Cortexon

Kurve 1: Bildung von Digoxigenin ( $12\beta$ -Hydroxylierung)

1a: in Gegenwart von Cortexon; 1b: in Abwesenheit von Cortexon

Kurve 2: Bildung von  $15\alpha$ -Hydroxycortexon

merklich beschleunigte (Kurve 2a). Aus diesen Versuchen muss man schliessen, dass *F. lini* nur eine einzige Oxydase bildet, die sowohl für die  $12\beta$ - als auch für die  $15\alpha$ -Hydroxylierung verantwortlich ist. Der Ort des Angriffes dieses Enzyms wird offenbar einzig durch die Stereochemie des Substrats kontrolliert. Dies wird aus der Betrachtung der Raummodelle klar, indem bei den  $\Delta^4$ -3-Ketosteroïden mit C/D-trans-Verknüpfung das Steroidskelett nahezu planar und die  $15$ -Stellung, besonders das pseudoäquatoriale  $15\alpha$ -H-Atom, sterisch kaum behindert ist. Bei den Cardenoliden und Bufadienoliden wird durch die cis-Verknüpfung der Ringe A/B und C/D die Moleköl beidseitig stark verbogen und dadurch die  $15\alpha$ -Stellung, besonders durch die Wasserstoffatome in  $4\alpha$ -,  $7\alpha$ - und  $9\alpha$ -Stellung, stark gehindert. Das äquatoriale  $12\beta$ -H-Atom ist hingegen sterisch wenig beeinflusst. Warum die Steroid-

oxydase *F. lini* im einen Fall ausgerechnet die  $15\alpha$ - und im anderen die  $12\beta$ -Stellung angreift, können wir zur Zeit nicht erklären. – Bei verschiedenen Substraten mit gleichartigem Grundgerüst können die Reaktionsgeschwindigkeiten beträchtlich variieren. So werden z. B.  $14\alpha$ -Hydroxycortexon und  $17\alpha$ -Hydroxycortexon (REICHSTEIN's Substanz S) wesentlich langsamer hydroxyliert als Cortexon. Das gleiche gilt für Gitoxigenin ( $16\beta$ -Hydroxydigitoxigenin) und Periplogenin ( $5\beta$ -Hydroxydigitoxigenin) bezüglich Digitoxigenin. – Betrachtet man die Kurven der Figuren 1–3,

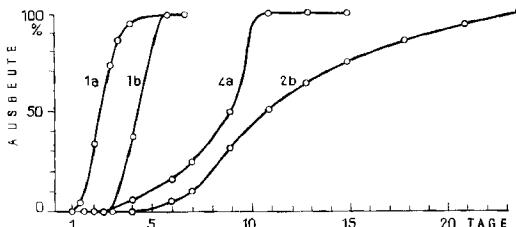


Fig. 3. Versuche zur Substratspezifität der Steroidoxydase von *F. lini*: Cortexon und Digitoxigenin zusammen inkubiert

Kurven 1: Bildung von  $15\alpha$ -Hydroxycortexon

Kurven 1: Bildung von  $15\alpha$ -Hydroxycortexon

1a: in Abwesenheit von Digitoxigenin; 1b: in Gegenwart von Digitoxigenin

Kurven 2: Bildung von Digoxigenin ( $12\beta$ -Hydroxylierung)

2a: in Gegenwart von Cortexon; 2b: in Abwesenheit von Cortexon

so fällt auf, dass die Hydroxylierung der Substrate nicht mit der Inkubation, sondern erst nach einer gewissen Zeit einsetzt. Während dieser sog. *Latenzzeit*, die wir auch bei Umwandlungen mit anderen Mikroorganismen beobachtet haben, tritt in der Regel ein Stillstand im Wachstum des Pilzes ein. Erst wenn die Umsetzung des Substrats beginnt, erholt er sich wieder. Während der Transformation kann der Sauerstoffverbrauch des Organismus stark gehemmt werden<sup>6)</sup>. Diese Befunde sprechen sehr für die Hypothese, dass es sich bei der Hydroxylierung, ähnlich wie im tierischen Organismus, um eine Detoxikationsreaktion des Pilzes handelt. Durch die Hydroxylierung wird die Fremdstoff wasserlöslicher und kann so rascher aus dem engeren Lebensbereich des Organismus entfernt werden<sup>7)</sup>.

Die Beobachtung der Latenzzeit veranlasste uns, den *Einfluss des Alters der Pilzkulturen* auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierung des Substrats zu untersuchen<sup>8)</sup>. Zu diesem Zweck fügten wir den Kulturen von *F. lini* das Substrat, wieder Cortexon und Digitoxigenin, einerseits sofort und andererseits erst nach 1 bis 8 Tagen nach der Beimpfung der Nährösung mit den Sporen zu und bestimmten die Geschwindigkeitskurven der beiden Versuchsreihen. Es traten dabei reproduzierbare signifikante Unterschiede auf. In Figur 4 ist der aus diesen Kurven ermittelte durchschnittliche prozentuale Umsatz (Hydroxylierung) pro Tag als Funktion des Alters der Kultur aufgetragen. Für Cortexon (Kurve 1) nimmt die Hydro-

<sup>6)</sup> Vgl. A. ČAPEK, H. PAVLŮ & O. HANČ, *Folia biol. (Tschechoslowakei)* 4, 337 (1958).

<sup>7)</sup> G. WIX & K. ALBRECHT, *Nature* 183, 1279 (1959), stellten fest, dass das Substrat in Mycel angereichert war, während das Produkt sich vorwiegend in der Nährösung befand.

<sup>8)</sup> Ähnliche Untersuchungen führten unabhängig von uns A. ČAPEK, O. HANČ, B. KAKÁČ & M. TADRA, *Folia Microbiol. (Tschechoslowakei)* 7, 175 (1962), über die Dehydrierung von Cortison zu Prednison mit Hilfe von *Mycobacterium flavum* durch.

xylase-Aktivität mit fortschreitendem Alter der Kultur zu, wobei sich zwischen 2 und 4 Tagen ein Maximum andeutet, während sie bei Digitoxigenin (Kurve 2) bei 2 Tage alten Kulturen ein Maximum erreicht, dann deutlich nach 5–6 Tagen

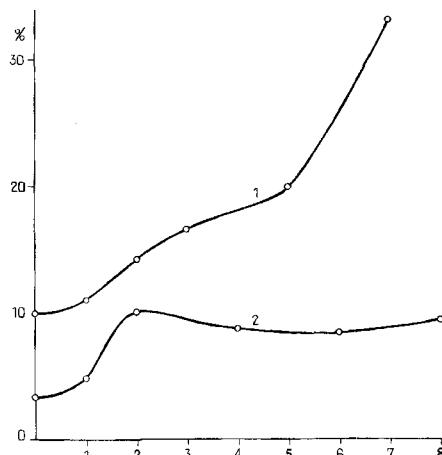


Fig. 4. Abhängigkeit der Hydroxylierungsgeschwindigkeit vom Alter der Kultur von *F. lini*  
Kurve 1: Cortexon; Kurve 2: Digitoxigenin  
Ordinate: Durchschnittlicher Umsatz pro Tag in Prozent  
Abzisse: Alter der Kultur in Tagen nach Beimpfung

ein Minimum durchläuft um nachher wieder etwas anzusteigen. Bei diesen Versuchen ist zu berücksichtigen, dass mit dem Alter der Kultur die Kulturflüssigkeit an Nährstoffen verarmt und der Organismus bei gleichbleibendem Volumen der Nährlösung durch sein Wachstum stark zugenommen hat. Die Versuchsdauer wird dadurch auf natürliche Weise limitiert.

Schliesslich wandten wir uns der Frage zu, ob sich die Steroidoxydase von *F. lini* spezifisch hemmen liesse. Wir fanden, dass Cyanid-Ionen in der Nährlösung zwar den Hydroxylierungsort in Cortexon und Digitoxigenin nicht beeinflussten, aber die Reaktionsgeschwindigkeit in signifikanter Weise veränderten. Die Resultate sind in den Kurven der Figuren 5 und 6 zusammengestellt.

Bei gemeinsamer Inkubation von Cortexon und Digitoxigenin war bei Digitoxigenin (vgl. Fig. 5)  $10^{-5}$ M KCN wirkungslos. Während  $10^{-4}$ M und  $10^{-3}$ M KCN die Hydroxylierung beschleunigten und  $10^{-2}$ M KCN die Reaktion nicht beeinflusste, hemmte  $10^{-1}$ M KCN die Bildung von Digoxigenin vollständig. Die letztere hohe KCN-Konzentration unterband das Pilzwachstum sehr rasch. Bei Cortexon (vgl. Fig. 7) wirkten  $10^{-5}$  bis  $10^{-3}$ M KCN nicht,  $10^{-2}$ M KCN war deutlich hemmend und mit  $10^{-1}$ M KCN unterblieb jegliche Hydroxylierung wie bei Digitoxigenin<sup>9</sup>). Es ist zur Zeit nicht möglich zu erklären, auf was diese Aktivierung bzw. Hemmung beruht.

<sup>9</sup>) K. ZETSCHÉ, Naturwiss. 47, 232 (1960), stellte interessanterweise den gleichen Einfluss von Cyanid-Ionen auf die Hydroxylierung von Progesteron durch *Curvularia lunata* fest:  $10^{-3}$ M NaCN hemmten und kleinere Konzentrationen förderten die Reaktion. C. J. SIH & F. L. WEISENBORN, J. Amer. chem. Soc. 82, 2653 (1960), beobachteten, dass Cyanid-Ionen die 1-Dehydrierung von Progesteron durch eine *Nocardia*-Spezies gänzlich unterdrücken und statt dessen eine  $9\alpha$ -Hydroxylierung eintreten liessen.

Eine befriedigende Interpretation dieser und vieler anderer Beobachtungen über die Hydroxylierung durch Mikroorganismen wird erst möglich sein, wenn es gelungen ist, die Hydroxylasen in zellfreier Form anzureichern oder gar rein zu isolieren.

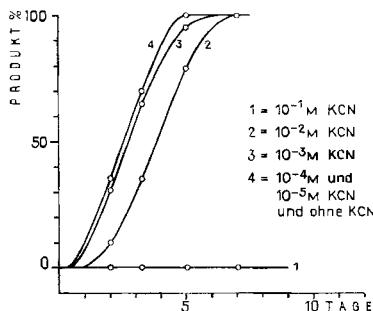


Fig. 5. Einfluss von KCN auf die Hydroxylierungsgeschwindigkeit von Digitoxigenin durch *F. lini*<sup>10)</sup>

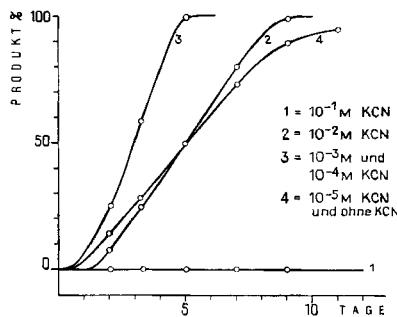


Fig. 6. Einfluss von KCN auf die Hydroxylierungsgeschwindigkeit von Cortexon durch *F. lini*<sup>10)</sup>

Der SANDOZ AG., Basel, danken wir für die finanzielle Unterstützung und die Gewährung eines Stipendiums an den einen von uns (E. W.-B.) bestens.

**Experimentelles.** — *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande) wurde wie früher beschrieben<sup>1,2)</sup> kultiviert. Die Umsetzungen wurden in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit je 20 ml Nährlösung (CZAPEK-DOX: 30 g Saccharose; 3 g NaNO<sub>3</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O; 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, dest. H<sub>2</sub>O ad 1 l) bei 27° auf der rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) aerob vorgenommen. Die Erlenmeyerkolben (20 Min. bei 120° im Dampfautoklaven sterilisiert), beimpft mit 1 ml wässriger Sporensuspension von einer Schrägagarkultur, wurden mit einer Lösung von je 4–5 mg Digitoxigenin bzw. Cortexon in 1 ml Aceton beschickt. Zur Aufarbeitung wurde die Nährlösung filtriert, das Mycel mit Methanol gründlich nachextrahiert und der Extrakt mit dem Filtrat vereinigt. Diese Lösung wurde hierauf im Vakuum vom Methanol weitgehend befreit, mit Chloroform ausgeschüttet, die Chloroformlösung mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wurde durch absteigende Chromatographie auf Papier WHATMAN Nr. 1 analysiert [stationäre Phase: Formamid (mit Formamid-Aceton-(1:3) imprägniert)<sup>11)</sup>; mobile Phase: Chloroform (gesättigt mit Formamid) für Digitoxigenin, und Benzol-Chloroform-(7:5) (gesättigt mit Formamid) für Cortexon]. Die Flecke von Digitoxigenin und

<sup>10)</sup> Digitoxigenin und Cortexon gemeinsam inkubiert.

<sup>11)</sup> O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 34, 108 (1951); H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. 36, 357 (1953).

Digoxigenin wurden mit KEDDE-Reagens<sup>12)</sup> und die von Cortexon und 15 $\alpha$ -Hydroxycortexon mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens<sup>13)</sup> sichtbar gemacht. Durch Vergleich der Flecke von Produkt und Edukt und mit denen von Gemischen bekannter Zusammensetzung liess sich das Mengenverhältnis zwischen den beiden leicht bestimmen und somit der prozentuale Umsatz feststellen. Fehlergrenze höchstens  $\pm$  5%.

#### SUMMARY

It has been shown that only a single, relatively unspecific steroid-oxydase is responsible for both the 12 $\beta$ -hydroxylation of digitoxigenin and the 15 $\alpha$ -hydroxylation of deoxycorticosterone by growing cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY). The position of the enzymatic attack is determined by the stereochemistry of the steroid skeleton of the substrate. The transformation of digitoxigenin is much slower than that of deoxycorticosterone. The presence of deoxycorticosterone enhances the oxygenation of digitoxigenin. On the other hand the hydroxylation of deoxycorticosterone is retarded by digitoxigenin.

The rate of reaction of both substrates is dependant upon the age of the cultures used.

At low concentrations KCN enhances the enzymatic activity of *F. lini*, while it inhibits it at higher concentrations.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

<sup>12)</sup> I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, Biochem. J. 52, 643 (1952).

<sup>13)</sup> L. R. AXELROD, J. biol. Chemistry 205, 173 (1953).

## 132. Welkstoffe und Antibiotika

27. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen II

von E. HARDEGGER, M. SCHELLENBAUM und H. CORRODI<sup>2)</sup>

(8. IV. 63)

*Biologische Grundlagen.* Unsere chemischen Arbeiten<sup>3)</sup> über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen basieren auf Untersuchungen, die der französische Botaniker N. BERNARD in den Jahren 1904–1911 veröffentlichte<sup>4)</sup>. BERNARD beobachtete, dass bei der relativ seltenen, vorzugsweise in den Jura-Felsenheiden gedeihenden Orchideenart *Loroglossum* (oder *Himantoglossum*) *hircinum* (L.) RICH. regelmässig die Wurzeln und etwas weniger häufig die Knollen von einer Infektionskrankheit befallen werden. Krankheitserreger ist der Mykorrhizenzpilz *Rhizoctonia repens* BERN. Die Krankheit kommt nach einiger Zeit infolge von Abwehrreaktionen der befallenen Orchideen-Gewebeteile zum Stillstand.

<sup>1)</sup> 26. Mitt., Helv. 46, 1065 (1963).

<sup>2)</sup> Z. Zt. in der Fa. HÄSSLE AB, Göteborg 6, Schweden.

<sup>3)</sup> Vgl. A. BOLLER, H. CORRODI, E. GÄUMANN, E. HARDEGGER, H. KERN & N. WINTERHALTER-WILD, Helv. 40, 1062 (1957).

<sup>4)</sup> N. BERNARD, Rev. gén. Bot. 16, 405 (1904); Ann. Sc. nat., I, Bot. [9] 9, 1 (1909), 14; 221 (1911).