

Zum Stoffwechsel von Aromaten, III *

Spaltung von Oestratrien-derivaten zu Dicarbonsäuren
vom Typus der Muconsäure

On the Metabolism of Aromatic Compounds, III *

Scission of Estratrien Derivatives to Dicarboxylic Acids of the Muconic Acid Type

G. Walter ** und E. Hecker ***

Institut für Biochemie des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg
und Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Z. Naturforsch. 28 c, 675—684 [1973]; eingegangen am 5. Juni 1973)

Metabolism of estrogens, 6,7-dihydroxy-tetraline, bis-carboxymethylene-cyclohexane,
2-hydroxy-estradiol-(17 β)-acetate

By cleavage of the aromatic ring of 6,7-dihydroxy-tetraline (1) with peracetic acid 1,2-bis-carboxymethylene-cyclohexane (3 a) is obtained. The addition of one mole of water to 3 a leads to 1-hydroxy-1-carboxymethyl-2-carboxymethylene-cyclohexane (4), which is readily converted to the lactone 1-hydroxy-2-carboxymethylene-cyclohexane- γ -lactone-aceticacid-(1) (5). By melting of compound 4 or 5 1,2-dihydroxy-cyclohexane-diaceticacid-1 (1,2)-di- γ -lactone (6) is obtained.

1,2-bis-carboxymethylene-cyclohexane (3 a) shows a molecular asymmetry which is of a type similar as found in atropisomeric compounds. On the basis of conformational considerations it is demonstrated that in the dilactone 6 the cyclohexane ring is stabilized in the boat form.

Cleavage of the aromatic A-ring of 2-hydroxy-estradiol-(17 β)-acetate (7) with peracetic acid occurs in a manner analogous to that of compound 1, giving rise to 2,3-seco- $\Delta^{10(1)}$ -estrenediol-(5 ξ , 17 β)-diacid-(2,3)-lactone-(2 $\rightarrow$ 5)-17-acetate (8 a). 8 a is converted to the methylester 9 and further to the corresponding estrone derivative 11 a.

Estrone-[16- 14 C] was incubated with the 15 000 $\times$ g supernatant from rat liver homogenate in order to investigate the possibility if scission of the aromatic ring A of estrogens is a step in their katabolism. Substance 11 a was used as a carrier in these studies.

Einleitung

In Rattenlebermikrosomen entstehen aus Östradiol-(17 β) bzw. Östron^{1,2} die entsprechenden 2-Hydroxy-östratriene als mengenmäßig wichtigste Metaboliten. Durch Reaktion der Oxydationsprodukte dieser Brenzkatechinabkömmlinge mit SH-gruppenhaltigen Aminosäuren bzw. Peptiden können Thioäther entstehen, die einen neuen Typus wasserlöslicher Östrogenmetaboliten darstellen³⁻⁵. Bei diesen sowie allen anderen bisher bekannten Östrogenmetaboliten bleibt das tetracyclische Östratrienskelett erhalten. Es gibt aber verschiedene Hinweise dafür, daß Östrogene auch unter Spaltung von Ringen metabolisiert werden können^{6,7}.

So käme als ein neuer Reaktionstypus für den Abbau von Östrogenen z. B. eine Spaltung des aromatischen Ringes der 2-Hydroxy-östratriene zu ent-

sprechenden Derivaten der Muconsäure in Betracht. Es ist bekannt, daß Brenzcatechin und substituierte Brenzcatechine von bestimmten Mikroorganismen über *cis,cis*-Muconsäuren und deren Lactone abgebaut und dem Intermediärstoffwechsel letztlich als Acetyl-CoA zugeführt werden (vgl. z. B.^{8,9}). Spaltungen hydroaromatischer oder aromatischer Ringe bei Steroiden durch Mikroorganismen sind bei Derivaten des Progesterons¹⁰ und des Androsta-en-(4)-dion-(3.17)¹¹ beobachtet worden, wobei teilweise Lactonvorstufen¹⁰ entstehen.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, 6,7-Dihydroxy-tetralin und 2-Hydroxyöstradiol-17 β -acetat mit Peressigsäure zu Derivaten der Muconsäure zu spalten (vgl. dazu⁸). Die dabei entstehenden Muconsäuren bzw. ihre Lactone können als Trägermaterial für entsprechende Stoffwechselversuche mit radioaktiv markierten Östrogenen eingesetzt

* II. Mitt.: vgl. loc. cit.⁸.

** Neue Anschrift: Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, USA.

*** Herrn Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer in freundschaftlicher Verbundenheit zum 60. Geburtstag gewidmet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Hecker, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für Biochemie, D-6900 Heidelberg 1, Kirschnerstraße 6, Postfach 449.

werden. Sie sind außerdem als mögliche Carcinogene endogenen Ursprungs (vgl. ⁸) von Interesse.

Oxydation von 6,7-Dihydroxy-tetralin mit Peressigsäure

Versetzt man eine Lösung von 6,7-Dihydroxy-tetralin (**1**) in Essigester mit Peressigsäure bei 0 °C, so tritt spontan Rotfärbung der Reaktionslösung ein (*o*-Chinon **2**). Nach längerem Stehen in der Kälte kristallisiert aus der nur noch schwach gefärbten Lösung eine farblose Carbonsäure aus. Diese läßt sich durch Umkristallisieren nicht reinigen, weil sie sich dabei verändert (s. u.). Ihr IR-Spektrum zeigt die für Carboxylgruppen typischen

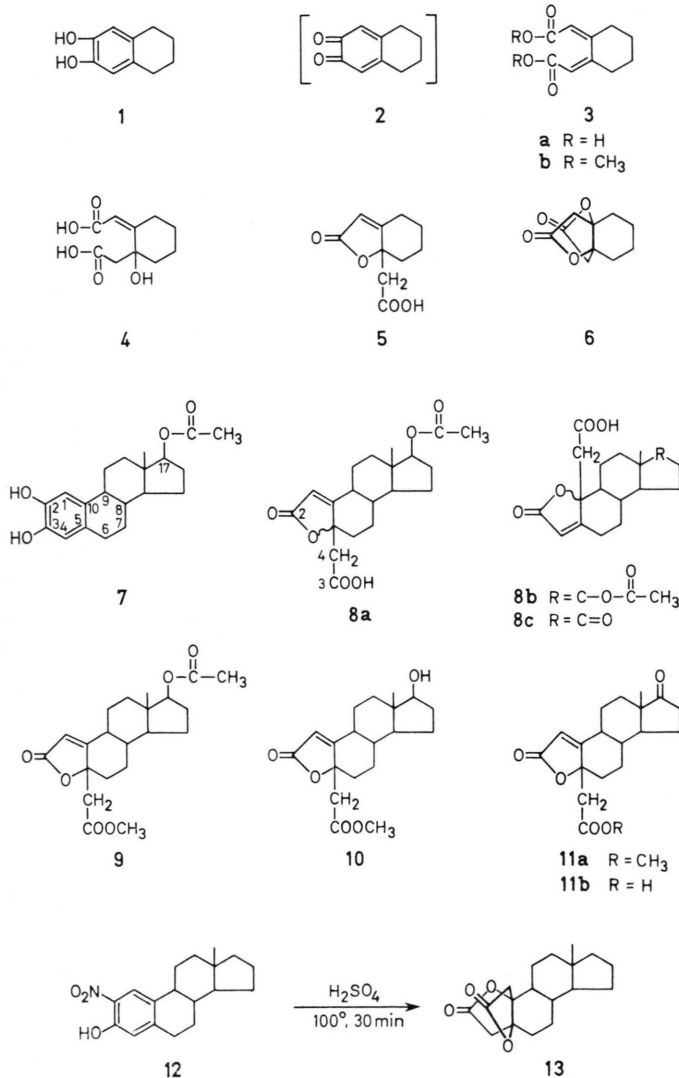
Banden im Bereich von 3 μ , die bei der Umsetzung mit Diazomethan verschwinden. Bei 5,90 μ sowie bei 6,01 μ und 6,16 μ sind die C=O-Valenz- und C=C-Valenzschwingungsbanden zu erkennen.

Die Umsetzung der rohen Carbonsäure mit Diazomethan in methanolischer Lösung führt zu einem kristallinen Dimethylester, dessen Analyse und IR-Spektrum mit der Struktur eines 1,2-Bis-carbomethoxymethylen-cyclohexans (**3b**) in Einklang stehen. Damit ist die aus dem Oxydationsansatz isolierte Säure als 1,2-Bis-carboxymethylen-cyclohexan (**3a**) charakterisiert. Die außergewöhnliche Lage der UV-Maxima im Diester und in der freien Säure wird im folgenden Abschnitt eingehend diskutiert.

Löst man die rohe Dicarbonsäure **3a** in Wasser durch Erwärmen, so kristallisiert beim Abkühlen eine neue Verbindung aus. Sie läßt im IR-Spektrum zwei scharfe Banden bei 2,85 μ und 2,92 μ erkennen, die auch im Lösungsmittelspektrum (CH₂Cl₂) erscheinen und für tertiäres Hydroxyl charakteristisch sind. Außerdem fällt die gegenüber der Ausgangssubstanz stark abgeschwächte Intensität einer C=C-Valenzschwingungsbande auf, während die zweite noch in voller Intensität vorhanden ist. Dieser Befund läßt vermuten, daß sich an eine der beiden Doppelbindungen im Sinne der Markownikowschen Regel ein Molekül Wasser addiert hat, so daß das 1-Hydroxy-1-carboxymethyl-2-carboxymethylen-cyclohexan (**4**) vorliegt. Die Verbindung wurde nicht genauer charakterisiert, weil sie schwer zu reinigen ist. Bei längerem Kochen einer Lösung der Substanz **4** in Wasser, besser in Benzol oder Pyridin, entsteht das Monolacton **5**, das durch Analyse und IR-Spektrum als 1-Hydroxy-2-carboxymethylen-cyclohexan- γ -lacton-essigsäure-(1) charakterisiert wird.

Im IR-Spektrum ist die Bande der tertiären OH-Gruppe verschwunden, es sind aber noch die C=C-Valenzschwingungen bei 6,08 μ und die für die Carboxylgruppe spezifischen Banden vorhanden. Die C=O-Valenzschwingungsbande des ungesättigten γ -Lactons ist bei 5,75 μ zu erkennen.

Während unter den milden Bedingungen des Erwärmens in wäßriger Lösung aus **3a** nur das Monolacton **5** entsteht, kristallisiert aus einer Schmelze der Verbindung **4** oder des Monolactons **5** spontan das Dilacton **6**, 1,2-Dihydroxycyclohexan-diessigsäure-(1,2)-di- γ -lacton, aus. Es kann leicht durch Sublimation gereinigt werden.



Sein IR-Spektrum enthält im Bereich zwischen 6,0 und 6,5 μ keine C=C-Valenzschwingung mehr und zeigt zwei C=O-Valenzschwingungsbanden in der für Lactone typischen Lage bei 5,62 und 5,68 μ .

Konfiguration und Konformation von Dicarbonsäure **3 a** und von Dilacton **6**

Die Verknüpfung einer *cis,cis*-Muconsäure mit einem Cyclohexanring, wie sie im 1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexan (**3 a**) vorliegt, war bisher unbekannt. Sie führt zu interessanten stereochemischen Effekten, die sich aus der Stereochemie des Cyclohexans und der *cis,cis*-Muconsäure ableiten lassen. Auch das Dilacton **6** stellt durch die Verknüpfung zweier γ -Lactonringe mit ein und derselben C—C-Bindung des Cyclohexanrings eine stereochemische Besonderheit dar.

Das UV-Absorptionsmaximum des 1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexans (**3 a**) liegt bei 211 nm und ist somit gegenüber dem der *cis,cis*-Muconsäure^{8, 12} stark hypsochrom verschoben. Die Extinktionskoeffizienten beider Verbindungen sind jedoch von derselben Größenordnung (Tab. I). Dar-

Tab. I. Vergleich der UV-Absorption von 1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexan (**3 a**) in Äthanol mit verwandten Verbindungen.

	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\max}$ (Äthanol)	Lit.
1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexan (3 a)	211	15 600	
<i>cis,cis</i> -Muconsäure	257	17 300	8, 12
Carboxymethylen-cyclohexan	220	14 000	13
1.2-Bis-methylen-cyclohexan	220	10 050	14
1.2-Bis-methylen-cyclopentan	243	keine Angabe	15

aus kann man schließen, daß die beiden exocyclischen Doppelbindungen praktisch nicht in Konjugation stehen. Da das UV-Maximum des bekannten Carboxymethylen-cyclohexans um 9 nm höher bei 220 nm (Tab. I) liegt, kann weiter geschlossen werden, daß auch die Konjugation der beiden Carbonylgruppen mit den C=C-Doppelbindungen in **3 a** gestört ist. Die gegenseitige sterische Hinderung der beteiligten Gruppen läßt sich an Kalottenmodellen nach Stuart-Briegleb deutlich erkennen.

In **3 a** verdrängen sich die Carboxylgruppen infolge ihrer großen Raumerfüllung gegenseitig aus der ebenen Anordnung mit der jeweiligen Doppelbindung (Abb. 1 a und b). Aber auch die Doppel-

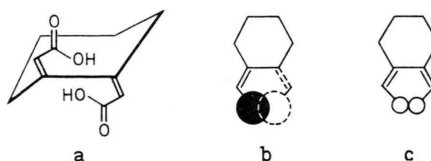


Abb. 1. a. Verbindung **3 a**, Verdrängung der Carboxymethylengruppen aus der Ringebene; b. Verbindung **3 a**, Überlappung der Carboxylgruppen (nach Stuart-Briegleb-Modell, schematisiert); c. 1.2-Bis-methylen-cyclohexan, schwache sterische Hinderung der Wasserstoffatome (nach Stuart-Briegleb-Modell, schematisiert).

bindungen bilden mit der 1.2-Bindung im Cyclohexanring kein ebenes System, d. h. keine reine *s-cis*-Form. Selbst in 1.2-Bismethylen-cyclohexan¹⁴ sind die Doppelbindungen wegen der Beweglichkeit des Cyclohexanrings und einer schwachen sterischen Hinderung der Wasserstoffatome (Abb. 1 c) nicht koplanar angeordnet, wie aus der Lage des UV-Maximums bei 220 nm (Tab. I) gegenüber einem nach den Regeln von Woodward¹⁶ berechneten Maximum bei 237 nm hervorgeht. Dagegen liegt das UV-Maximum von 1.2-Bismethylen-cyclopentan bei 243 nm (Tab. I). Dieser Wert kommt dem berechneten (237 nm) wesentlich näher und läßt sich zwanglos verstehen, weil das Diensystem durch die Starrheit des 5-Rings stärker zur Koplanarität gezwungen wird (reine *s-cis*-Form).

Auf Grund der Raumerfüllung der beiden Carboxylgruppen in **3 a** können die beiden Carboxymethylengruppen nicht aneinander vorbeibewegt werden. Daher lassen sich von Verbindung **3 a** spiegelbildliche Formen aufbauen, die nicht zur Deckung gebracht werden können (Abb. 2): Sie können als

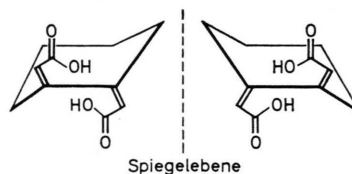


Abb. 2. Zur Atropisomerie des 1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexans (**3 a**).

Atropisomere aufgefaßt werden, da ihre Molekülasymmetrie auf einer weitgehenden Aufhebung der Drehbarkeit um eine C=C-Bindung beruht. Danach

ist **3 a** als Racemat aufzufassen. Analoge Betrachtungen gelten für den Methylester **3 b**.

Im Dilacton **6** sind die beiden γ -Lactonringe jeweils mit der gemeinsamen C=C-Einfachbindung des Cyclohexanrings *cis*-verknüpft.

Das Dilacton **6** besitzt zwei benachbarte Asymmetriezentren (C-1 und C-2) (Abb. 3 a), deren Sub-

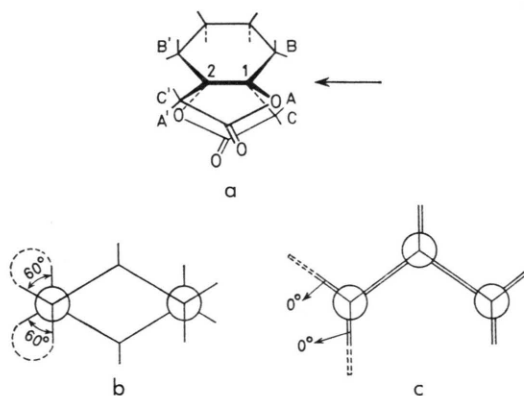


Abb. 3. Modellbetrachtung des Dilactons **6**, nach Stäbchenmodell gezeichnet.

stituenten (A, B, C und A', B', C') identisch sind. Blickt man in Richtung des Pfeils auf das Molekül, so erscheinen die Liganden von C-1 in der Reihenfolge A $\rightarrow$ B $\rightarrow$ C im Uhrzeigersinn und diejenigen von C-2 in der Reihenfolge A' $\rightarrow$ B' $\rightarrow$ C im Gegenuhrzeigersinn angeordnet. Die Verhältnisse sind daher analog denen bei der D- bzw. L-Weinsäure: das Dilacton **6** ist als Racemat aufzufassen. Eine Mesoform wie bei der Weinsäure wäre nur bei *trans*-Verknüpfung der beiden Lactonringe möglich.

Auf die Konformation des Cyclohexanrings sollte die *cis*-Verknüpfung beider γ -Lactonringe nicht ohne Einfluß bleiben, da in dessen Sesselform benachbarte Substituenten auf Lücke stehen und einen Winkel von 60° bilden (Abb. 3 b). Die *cis*-Verknüpfung eines γ -Lactonrings bei unveränderter Sesselform des Cyclohexanrings muß daher dem Lactonfünfring, der in die ebene Konformation drängt, eine gewisse Spannung aufprägen. Durch das Vorhandensein eines zweiten Lactonrings wird sich diese Spannung erhöhen. Wenn der Cyclohexanring dagegen in der Wannenform vorliegt, wären die entsprechenden Bindungswinkel gleich null (Abb. 3 c). Die beiden Lactonringe könnten dann jeweils in ebener Konformation mit dem Cyclohexanring verknüpft sein. Der Energieinhalt der Wannenform des Cyclohexanrings wird durch die ekliptische Konformation der benachbar-

ten Methylengruppen sowie durch die 1,4-Wechselwirkung zweier Wasserstoffatome (am Beispiel der klassischen Lactone von Johnson) gegenüber der Sesselform um 5,6 kcal/Mol erhöht^{17, 18}. Auf Grund der hier angestellten Modellbetrachtungen kann angenommen werden, daß diese Effekte im Dilacton **6** gegenüber dem die Wanne stabilisierenden Einfluß der beiden Lactonringe zurücktreten. Eine endgültige Aussage über die Konformation dieser Verbindung könnte z.B. durch Röntgenstrukturanalyse herbeigeführt werden.

Oxydation von 2-Hydroxy-östradiol-(17 β)-acetat mit Peressigsäure

Einer der Hauptwege der Inaktivierung von Östradiol-(17 β) in der Leber verläuft über Östron und 2-Hydroxy-östron⁵. Es ist jedoch nicht möglich, in 2-Hydroxy-östron den Ring A mit Peressigsäure aufzuspalten, ohne das Molekül auch im Ring D zu verändern: Dessen 17-Carboxylgruppe würde ebenfalls eine Baeyer-Villiger-Reaktion in Analogie zur Bildung des bekannten Östronolactons eingehen^{19, 20}. Aus diesem Grunde muß ein Umweg beschritten werden: 2-Hydroxy-östradiol-(17 β)-acetat (**7**) wird am aromatischen Ring mit Peressigsäure aufgespalten. Anschließend wird die 17 β -Hydroxygruppe freigesetzt und zur Carbonylgruppe oxydiert.

Die oxydative Ringaufspaltung von **7** gelingt unter den gleichen Reaktionsbedingungen, die auch zur Ringöffnung der Tetralole angewandt werden. Während jedoch durch Oxydation von 6,7-Dihydroxy-tetralin eine der *cis,cis*-Muconsäure analoge Dicarbonsäure erhalten werden kann, bildet sich hier eine Verbindung, deren IR-Spektrum neben den Banden einer freien Carboxylgruppe nur eine C=C-Doppelbindung bei $6,10\ \mu$ erkennen läßt. Deshalb wird angenommen, daß es sich um ein dem Monolacton **5** entsprechendes Monolacton handelt. Aus sterischen Gründen dürfte diesem Monolacton die Struktur 2,3-Seco- $\Delta^{10(1)}$ -östrendiol-(5 ξ ,17 β)-disäure-(2,3)-lacton-(2 $\rightarrow$ 5)-17-acetats (**8 a**) zukommen. Die sterisch ungünstigere Bildung des zu **8 a** isomeren Monolactons 2,3-Seco- $\Delta^{4(5)}$ -östrendiol-(10 ξ ,17 β)-disäure-(2,3)-lacton-(3 $\rightarrow$ 10)-17-acetats (**8 b**) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Das Auftreten von Lactonen als erste faßbare Produkte der Peressigsäurespaltung ist nicht ungewöhnlich. So wird aus Ansätzen mit Protocatechusäure nicht β -Carboxy-*cis,cis*-muconsäure, sondern

β -Carboxy-muono-lacton isoliert⁸. Seine Bildung kann auf sterische Gründe zurückgeführt werden⁸. Ähnliche Gründen können auch für die Bildung von **8a** maßgebend sein. Der Unterschied zur Oxydation des 6,7-Dihydroxy-tetralins kann aber auch darauf beruhen, daß die durch Oxydation von 2-Hydroxy-östradiol-(17 β)-acetat primär entstandene Dicarbonsäure eine geringe Tendenz zur Kristallisation aufweist und sich im Verlauf von mehreren Wochen in dem sauren Reaktionsmilieu zu einem Monolacton verändert, das leichter kristallisiert. Hingegen fällt die bei der Oxydation von 6,7-Dihydroxy-tetralin primär gebildete Carbonsäure bereits nach 24 Stdn. kristallin aus, bevor sie zur Lactonisierung Zeit findet.

Die 17-Acetyl-lacton-säure **8a** kann durch Umkristallisation nur schwer analysenrein gewonnen werden und wird daher mit Diazomethan in den entsprechenden kristallinen Methylester **9** überführt. Dieser zeigt im IR-Spektrum deutlich voneinander getrennte Lacton- und Ester-carbonyl-banden.

Die Abspaltung des Acylrestes des 17-Acetyl-lacton-säuremethylesters **9** gelingt durch Umesterung in methanolischer Lösung bei 20 °C mit p-Toluolsulfonsäure²¹. Analyse und spektroskopische Daten des Umesterungsproduktes (OH-Valenzschwingung bei 2,84 μ) stehen mit der Struktur des 17-Hydroxy-lacton-säuremethylesters **10** in Einklang.

Die Einführung einer C-17-Carbonylfunktion in **10** gelingt durch Oppenauer-Oxydation mit Aluminium-Isopropylat und Cyclohexanon in Toluol (vgl. ²²). Durch Dünnschichtchromatographie und Umkristallisation kann der 17-Keto-lacton-säuremethylester **11a** analysenrein erhalten werden.

Es gelang nicht, **8a** in eine dem Dilacton **6** entsprechende Verbindung umzuwandeln.

Andererseits haben Werbin *et al.*²³ die Darstellung eines entsprechenden Dilactons **8** aus 2-Nitro-17-desoxo-östron (**12**) durch Ringspaltung mit konzentrierter Schwefelsäure beschrieben.

Zum Problem der biochemischen Ringspaltung von Oestron

Aus radioaktiv markiertem Oestron entstehen bei Inkubation mit Rattenlebermikrosomen – bzw. 15000 $\times$ g-Überstand 70–80% ätherlösliche Metaboliten. Von diesen sind noch nicht ganz die Hälfte als tetrazyklische Hydroxylierungs- und/oder Dehydrierungsprodukte identifiziert²⁴.

Hinweise auf einen über erste Oxydationsstufen hinausgehenden Abbau des tetrazyklischen Östratrienskeletts durch Spaltung des Ringes D gibt der Befund von Heard⁶, der nach subkutaner Injektion von Östron-[16-¹⁴C] innerhalb von 13 Stdn. 2,14% der eingesetzten Radioaktivität als ¹⁴CO₂ wiederfand. Brusca und Gawienowski⁷ konnten diesen Befund allerdings nicht bestätigen. Hingegen fanden diese Autoren⁷ bei *in vivo*-Versuchen an der Ratte mit Östradiol-(17 β)-[4-¹⁴C] in der Atemluft der Tiere geringe Mengen ¹⁴CO₂.

Als Vorstufe eines Abbaus von Östron, der schließlich zu CO₂ führt, kommen Lacton-säuren vom Typus **11b** in Betracht. Um das Auftreten von **11b** zu prüfen, wurde Östron-[16-¹⁴C] 1 Stde. mit 15000 $\times$ g Überstand aus Rattenleber mit NADPH unter Luft inkubiert. Die ätherlöslichen Metaboliten wurden nach Diazomethanbehandlung mit 17-Keto-lacton-säuremethylester **11a** als Trägermaterial versetzt und bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert (Abb. 4). Die spezifische Aktivität des Kri-

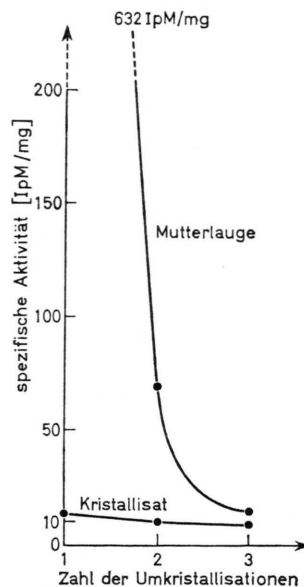


Abb. 4. Umkristallisation von 17-Keto-lacton-säure-methylester **11a** zur konstanten spez. Aktivität

stallisats 3 entspricht 0,28% der eingesetzten Aktivität.

Wenn die einem Ringöffnungsprodukt entsprechende Keto-lacton-säure **11b** demnach in der Ätherphase nur in geringer Menge vorkommt, so ist damit eine Ringöffnungsreaktion keineswegs ausgeschlossen. Beispielsweise kann der Lactonring-

schluß des primär zu erwartenden *cis,cis*-Muconsäurederivates zu zwei isomeren Lactonen **8c** bzw. **11b** erfolgen, und es läßt sich nach den bisherigen Befunden nicht entscheiden, ob Lacton **11b** die mit dem möglichen biologischen Produkt identische Form darstellt. Außerdem könnte ein in Position 6 hydroxyliertes Ringaufspaltungsprodukt in dem beschriebenen Ansatz mit **11a** als Träger nicht erfaßt werden. Dasselbe gilt für alle anderen bekannten Hydroxylierungs- bzw. Dehydrierungsmöglichkeiten in den Positionen 16, 11 und 6, d.h. immer dann, wenn die im Prinzip mögliche Ringöffnung vorzugsweise nicht am Östron selbst, sondern an einem seiner oxydierten Metaboliten erfolgt. Auch könnte das 4-Hydroxy-östron Ausgangsprodukt einer analogen Ringöffnungsreaktion sein, das vielleicht gerade deshalb bisher nur in geringen Mengen in Ansätzen mit 15000 $\times$ g Überstand nachgewiesen werden konnte²⁴.

Es ist ferner denkbar, daß die durch Ringöffnung entstehenden Metaboliten nur eine geringe (oder gar keine) stationäre Konzentration erreichen, weil sie sofort weiter abgebaut oder an Proteine gebunden werden. So ist zum Beispiel bekannt, daß ungesättigte Lactone mit Cystein unter Bildung von Thioäthern reagieren können. Teilweise geschieht dies unter äußerst milden Bedingungen (Raumtemperatur, pH 7)²⁵. Das ist deswegen beachtenswert, weil gewisse Lactone (Propiolacton und α,β -ungesättigte 5-Ringlactone) cancerogen sind. Diese Wirkung steigt proportional mit ihrer Affinität zu SH-Verbindungen²⁵. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen war es bisher nicht möglich, mit den α,β -ungesättigten γ -Lactonen **8a** bis **11** Carcinogenteste durchzuführen. Sie verdienen jedoch Interesse im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Hormonwirkung und Carcinogenese²⁶.

Methoden und Substanzen

Sämtliche Schmelzpunktangaben sind nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden von Dr. A. Schoeller, Kronach/Ofr., ausgeführt. Die UV-Spektren sind mit einem Beckman-Spektralphotometer, Modell DK 2, in Äthanol und die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-Gerät, Modell 21, in KBr gemessen. Die Radioaktivität ¹⁴C-haltiger Lösungen wurde im Durchflußzähler TGC-14 (Tracerlab) und die von Papierchromatogrammen im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler Tri-Carb, Modell 314 E, der Firma Packard Instruments, Illinois, gemessen. Für alle papierchromatographischen Versuche wurde die

Papiersorte 2043 b der Firma Schleicher und Schüll verwendet. 2,5-Diphenyloxazolyl-(PPO) und 1,4-Bis-2-[4-methyl-5-phenyloxazolyl]-benzol (Dimethyl-POPOP) wurden von der Firma Packard, Frankfurt, NADPH von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, Nicotinamid von der Firma Merck, Darmstadt, Peressigsäure von den Elektrochemischen Werken München und Östron-[16-¹⁴C] von der Firma Radiochemical Centre Amersham, England, bezogen. 2-Hydroxy-östradiol-(17 β)-acetat wurde nach Axelrod und Rao²² dargestellt. Östron und Östradiol-(17 β) verdanken wir der Schering AG Berlin.

Peressigsäure. Die käufliche etwa 40-proz. Peressigsäure, bezogen von den Elektrochemischen Werken München, Höllriegelskreuth, wird zur Entfernung der Schwefelsäure⁸ in kleinen Anteilen (50 ml) bei 24–26 °C Badtemperatur und 12–15 Torr in eine eisgekühlte Vorlage destilliert und der Gehalt des Destillats an Peressigsäure (ca. 50%) und an Wasserstoffsuperoxyd (ca. 0,4%) bestimmt (vgl.⁸).

Papierchromatographie. Auf 10 cm breiten und ca. 40 cm langen Streifen wird absteigend in einem Chromatographiergefäß entwickelt, das mit Filtrierpapier ausgekleidet ist, welches in die am Boden des Gefäßes befindliche Unterphase eintaucht.

System A: Mobile Phase 500 ml Cyclohexan + 125 ml Benzol; stationäre Phase 500 ml Methanol + 500 ml Wasser.

Chromatographiegefäße mit frischen Phasenpaaren müssen vor Gebrauch mindestens 12 Stdn. bei möglichst konstanter Temperatur stehen, damit die Phasen ins Gleichgewicht kommen.

Anfärben. Die in System A entwickelten Chromatogramme werden durch eine Mischung von Folins Reagenz und Wasser (1+2) gezogen. Die dabei auf gelbem Grund erscheinenden blauen Flecken stammen von den leicht oxydierbaren Verbindungen, z.B. 2,3-Dihydroxy-tetralin (R_F 0,04), 6,7-Dihydroxy-tetralin (R_F 0,13). Monophenole erscheinen erst nach dem Räuchern mit Ammoniak.

Nach Entwicklung werden die Platten im durchscheinenden UV-Licht (Hg-Niederdrucklampe mit Filter UG 5 der Firma Schott, Durchlässigkeitsmaximum etwa bei 255–260 nm) betrachtet. Alle synthetisierten Verbindungen mit einer C=C-Bindung sind fluoreszenzlöschend und können ohne zusätzliche Verwendung eines Sprühreagenz im UV-Licht erkannt werden.

Messung von Radioaktivitäten. Zur Messung ¹⁴C-haltiger Lösungen im Geigerzähler trägt man aliquote Teile davon auf Aluminiumplättchen auf und trocknet sie unter einer IR-Lampe bis zur Gewichtskonstanz. Die Nullwerte erhält man durch vorheri-

ges Zählen derselben Plättchen, auf denen anschließend die Substanz gemessen wird. Durch einen ^{14}C -Standard werden Schwankungen in der Zählhausbeute des Meßgerätes kontrolliert und rechnerisch eliminiert. Eine Korrektur der Meßwerte erfolgt bezüglich des Untergrundes durch die gemessenen 0-Werte und hinsichtlich der Selbstabsorption mit Hilfe einer Selbstabsorptionstabelle, die für Proteine bestimmt worden ist. Sie wird auch auf kristalline organische Substanzen und anorganische Salze angewendet.

Östron- $[16\text{-}^{14}\text{C}]$ (1,27 mg, Akt. 0,1 mCi) verdünnt man mit 10 mg unmarkiertem Östron, bevor es im biologischen Experiment eingesetzt wird. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität dieses Präparates, die etwa $3,8 \cdot 10^6$ Ipm/mg beträgt, ist eine weitere Verdünnung um den Faktor 10^3 erforderlich. Die exakten Aktivitätswerte sind bei der Beschreibung der Versuche angegeben.

Papierchromatogramme von radioaktiven Lösungen werden zur Bestimmung der Radioaktivität quer zur Wanderungsrichtung in 1 cm breite Streifen zerschnitten, die man in je eine Zählflasche mit 15 ml Zählflüssigkeit bringt und im Szintillationszähler mißt. Der Untergrund einer jeden Flasche wird zuvor gemessen und bei der Auswertung berücksichtigt. Die Zählflüssigkeit ist eine Lösung von 7 g PPO, 300 mg Dimethyl-POPOP und 100 g Naphthalin in 1 l Dioxan.

6.7-Dihydroxytetralin. Eine Lösung von 500 mg 2.3-Dihydroxy-naphthalin in 20 ml Äthanol wird unter Zusatz von 2 ml konzentrierter Salzsäure und 500 mg Platinoxid in einem 50 ml-Schüttelautoklaven bei 140 atm. H_2 -Druck und Raumtemperatur 3 Stdn. hydriert. Danach wird der Katalysator von der alkoholischen Lösung abfiltriert, das Filtrat mit Wasser versetzt und mit insgesamt 120 ml Benzol 5-mal extrahiert. Die vereinigten Benzolextrakte werden mit Natriumsulfat getrocknet. Man erhält eine klare gelbliche Lösung, aus der das Hydrierungsprodukt nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer als violettbraune Substanz erhalten wird. Nach 12-stdg. Trocknen im Vakuum über P_2O_5 wird das Rohprodukt bei 10^{-2} Torr und langsam auf 140 °C ansteigender Badtemperatur gegen einen mit Trockeneis/Äthanol beschickten Kühlfinger sublimiert. Ausbeute an Sublimat: 269 mg (53% d. Th.). 50 µg des Sublimats werden neben 50 µg eines Testgemisches aus bekannten Mengen 2.3-Dihydroxy-naphthalin und 6.7-Dihydroxy-tetralin im System A papierchromatographiert. Nach Anfärben mit Folins-Reagenz lassen sich die Ausbeuten abschätzen. Man erhält zu 95% 6.7-Dihydroxy-tetralin neben 5% 2.3-Dihydroxy-naphthalin. Nach Umkristallisation aus Benzol/Petroläther (90–100 °C) ist die Verbindung nach Schmelzpunkt 129–

130 °C und IR-Spektrum mit einer auf anderem Wege gewonnenen reinen Vergleichssubstanz identisch.

1.2-Bis-carboxymethylen-cyclohexan (3a). 328 mg (2 mMol) 6.7-Dihydroxy-tetralin gelöst in 1 ml eisgekühltem Essigester werden mit 0,61 ml eisgekühlter 49-proz. Peressigsäure (4,6 mMol, 15% Überschuß) tropfenweise versetzt. Die Lösung wird bei 4 °C aufbewahrt, wobei sich innerhalb von 24 Stdn. die ersten Kristalle abscheiden. Nach sieben Tagen wird das Kristallinat abfiltriert (100 mg) und mit wenig kaltem Essigester gewaschen. Ausbeute 25% d. Th., Schmelzpunkt: 149–153 °C. **3a** ist unlöslich in Benzol, Nitromethan und Eisessig. In Dimethylsulfoxid löst sie sich sehr gut, ist aber nicht mehr zur Rekristallisation zu bringen. Versuche, **3a** aus Wasser umzukristallisieren ergaben unter Addition von Wasser **4** bzw. unter Lactonisierung **5** (vgl. unten).

UV-Spektrum: λ_{max} 211 nm, ϵ_{max} 15 600 (Äthanol). IR-Spektrum: ν_{OH} 3–4,5 µ, $\nu_{\text{C=O}}$ 5,90 µ, $\nu_{\text{C=C}}$ 6,01 µ, 6,16 µ; δ_{COOH} (in plane) 7,92–8,14 µ, δ_{DH} 10,5 µ.

1.2-Bis-carbomethoxymethylen-cyclohexan (3b). Eine Lösung von 55 mg **3a** (Rohprodukt) in wenig Methanol wird bei Raumtemperatur unter Umschütteln tropfenweise mit einer ätherischen Diazomethanlösung (0,9 mMol/ml) versetzt. Wenn die Reaktionslösung von überschüssigem Diazomethan blaßgelb bleibt, wird zur Entfärbung mit einer Lösung von Eisessig in Benzol versetzt. Der Dimethylester kristallisiert nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff aus. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in einigen Tropfen Methanol gelöst, auf Kieselplatten aufgetragen und mit Benzol/Essigester 4:1 chromatographiert. Man erkennt im UV-Licht mehrere fluoreszenzlöschende Zonen: Hauptprodukt R_f 0,73; R_f -Werte von Nebenprodukten: 0,51; 0,36; 0,18. Nach Abkratzen der Hauptzone, Extraktion mit Methanol und Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man 35 mg **3b**. Zur Analyse wird aus Petroläther (60–70 °C) umkristallisiert, Schmelzpunkt: 74 °C (Ausbeute 55% d. Th.).

UV-Spektrum: λ_{max} 209 nm, ϵ_{max} 21 850 (Äthanol). IR-Spektrum: $\nu_{\text{C=O}}$ 5,8 µ, 5,87 µ, $\nu_{\text{C=C}}$ 6,02 µ, 6,15 µ.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (224,2) Ber.: C 64,27 H 7,19,
Gef.: C 64,20 H 7,10.

1-Hydroxy-1-carboxymethyl-2-carboxymethylen-cyclohexan (4). 197 mg **3a** werden in 50 ml Wasser bis zur völligen Auflösung 1,5 Stdn. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach Abkühlen kristallisieren

feine Nadeln aus (142 mg), Schmelzpunkt: 137 – 145 °C.

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 213 nm (Äthanol).

IR-Spektrum: in KBr ν_{OH} 2,85 μ , 2,92 μ ; in CH_2Cl_2 ν_{OH} 2,86 μ , $\nu_{\text{C=O}}$ 5,78 – 5,85 μ , $\nu_{\text{C=C}}$ 6,07 μ , 6,18 μ (schwach).

1-Hydroxy-2-carboxymethylen-cyclohexan- γ -lactonessigsäure-(1) (**5**). Zweimalige Umkristallisation von 140 mg **4** aus Benzol ergibt 62 mg des Monolactons **5**. Nach weiterem dreimaligem Umkristallisieren aus Wasser/Methanol ist die Verbindung analysenrein. Schmelzpunkt 146 – 146,5 °C.

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 213 nm, $\epsilon_{\max}$ 14 800 (Äthanol).

IR-Spektrum: $\nu_{\text{C=O}}$ 5,75 – 5,86 μ , $\nu_{\text{C=C}}$ 6,08 μ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (196,2) Ber.: C 61,21 H 6,16,
Gef.: C 61,16 H 6,00.

1,2-Dihydroxy-cyclohexan-diessigsäure-(1,2)-di- γ -lacton (**6**). 100 mg **5** werden 30 min auf 160 – 180 °C erhitzt. Aus der Schmelze kristallisieren 6-eckige Blättchen aus. Nach dreimaliger Sublimation (10^{-2} Torr, Badtemperatur 260 °C) gegen einen mit Aceton/Trockeneis beschickten Kühlfinger erhält man 25 mg **6**, das durch Umkristallisation aus Aceton weiter gereinigt wird. Ausbeute 25% d. Th., Schmelzpunkt 199 – 202 °C.

IR-Spektrum: $\nu_{\text{C=O}}$ 5,62 μ , 5,68 μ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (196,2) Ber.: C 61,21 H 6,16,
Gef.: C 61,16 H 6,10.

2,3-Seco- $\Delta^{10(1)}$ -östrendiol-(5 ξ ,17 β)-disäure-(2,3)-lacton-(2 $\rightarrow$ 5)-7-acetat (**8a**). 330 mg (1 mMol) 2-Hydroxy-östradiol-(17 β)-acetat werden in 2 ml Essigester gelöst und in der Kälte mit 0,3 ml 49-proz. PES (15% Überschuß) versetzt. Nach 6-wöchigem Aufbewahren des Ansatzes bei –20 °C haben sich Kristalle von **8** abgeschieden, die man von der Mutterlauge absaugt und mit kaltem Cyclohexan und Benzol wäscht. Ausbeute 30% d. Th. **8a**, Schmelzpunkt 94 – 98 °C.

Der mehrere Wochen dauernde Prozeß der Kristallisation kann durch Einengen des Ansatzes nach der Farbaufhellung (blaßgelb) auf die Hälfte des Ausgangsvolumens, gleichzeitig Zugabe von einigen Tropfen Wasser, Animpfen und wiederholtes Kratzen mit dem Glasstab an der Innenwand des Erlenmeyers beschleunigt werden, so daß man bereits nach 8 Tagen eine Ausbeute an kristallinem Lacton **8a** von 30% erhält.

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 214 nm, $\epsilon_{\max}$ 17 150 (Äthanol).

IR-Spektrum: ν_{OH} 2,86 μ , 2,92 μ , 3,0 – 4,5 μ , $\nu_{\text{C=O}}$ 5,7 – 5,9 μ ; $\nu_{\text{C=C}}$ 6,10 μ , δ_{COOH} (in plane) 8,0 μ .

Die scharfen ν_{OH} -Banden bei 2,86 μ und 2,92 μ verschwinden im Lösungsmittelspektrum und bei

Veresterung. Daraus folgt, daß die Carboxylgruppe im Kristallverband teilweise im nichtassoziierten Zustand vorliegt.

Methylierung von 8a. 130 mg **8a** werden in 0,5 ml Methanol gelöst und mit ätherischer Diazomethanolösung (0,9 mMol/ml) behandelt. Nach Abblasen des Lösungsmittels auf dem Dampfbad mit Stickstoff kristallisiert der rohe 17-Acetyl-lactonsäuremethylester **9** aus (130 mg). Er wird dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgelplatten mit Essigester/Cyclohexan 4 : 7 aus Elutionsmittel gereinigt (R_F 0,62).

Zweimalige Umkristallisation aus Cyclohexan (mit Methanol gesättigt) ergibt analysenreines **9**. Schmelzpunkt 161,5 – 162 °C. Ausbeute 52% d. Th.

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 215 nm, $\epsilon_{\max}$ 16 200 (Äthanol).
IR-Spektrum: $\nu_{\text{C=O}}$ 5,71 μ , 5,80 μ , $\nu_{\text{C=C}}$ 6,10 μ .

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (376,4) Ber.: C 67,00 H 7,50,
Gef.: C 67,20 H 7,87.

Freisetzung von OH-17 in 9 zu 10. 38 mg (0,1 mMol) **9**, in 7 ml Methanol gelöst, werden mit 24 mg (0,14 mMol) *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Nach 24-stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wird am Rotationsverdampfer bei 20 °C auf die Hälfte eingengt und mit frischem Methanol wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Dies wird nach weiteren 24 Stdn. wiederholt. Nach 72 Stdn. wird auf die Hälfte eingengt und nach Zugabe von 25 ml Wasser 5-mal mit 15 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformauszüge werden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer einrotiert. Das Verseifungsprodukt ist harzig und kristallisiert erst nach dünn-schichtchromatographischer Reinigung (Kieselgel-G, Cyclohexan/Essigester 1:1, R_F 0,30). Ausbeute 26 mg **10**, 72% d. Th., Schmelzpunkt 130 °C nach Umkristallisation aus Diisopropyläther.

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 215 nm, $\epsilon_{\max}$ 15 900 (Äthanol).
IR-Spektrum: ν_{OH} 2,84 μ , $\nu_{\text{C=O}}$ 5,70 – 5,78 μ , $\nu_{\text{C=C}}$ 6,07 μ .

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5$ (334,4) Ber.: C 68,24 H 7,83,
Gef.: C 68,43 H 7,64.

Oxydation von 10 zu 11a. 40 mg (0,46 mMol) Aluminiumisopropylat, 24 mg **10** (0,07 mMol) und 0,2 ml (0,16 mMol) Cyclohexanon in 4 ml Toluol werden unter Ausschluß von Wasser 4 Stdn. am Rückflußkühler erhitzt. Anschließend wird die Lösung nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 5 ml 10-proz. H_2SO_4 , zweimal mit 5 ml Wasser, einmal mit 5 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung und schließlich dreimal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Durch dünn-schichtchromatographische Reinigung auf Kieselgel G (Cyclohexan/Essigester 1:1, R_F 0,28) und

Umkristallisation aus Benzol und Methanol erhält man 12 mg analysenreine Substanz. Ausbeute 50% d. Th. **11a**. Schmelzpunkt 200–214 °C (Zersetzung).

UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ 216 nm, $\epsilon_{\max}$ 15 500 (Äthanol).

IR-Spektrum: $\nu_{C=O}$ 5,67 μ , 5,77 μ , $\nu_{C=C}$ 6,08 μ .

$C_{19}H_{24}O_5$ (332,4) Ber.: C 68,65 H 7,27,
Gef.: C 68,58 H 7,10.

Versuche zur Bildung eines zweiten Lactonrings

a. 40 mg **8a** wurden in 40 ml Xylol 30 min am Rückflußkühler gekocht.

b. 15 mg **8a** wurden mit 20 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 auf dem Dampfbad erhitzt und danach mit Wasser und CH_2Cl_2 aufgearbeitet.

c. Erwärmung auf 160 °C (20 min).

Von den zurückisolierten Produkten der Versuche a. bis c. wurden IR-Spektren aufgenommen. Bei Versuch a. wurde das Ausgangsmaterial unverändert zurückisoliert. Bei b. und c. wird nur eine geringe Abschwächung der $\nu_{C=C}$ -Bande bei 6,1 μ und das Auftreten einer Schulter bei 5,65 μ (gesättigtes 5-Ring-lacton) sowie eine Abnahme der Intensität der ν_{OH} -Schwingung zwischen 3,5 μ und 4 μ (assoziierte Säure) beobachtet. Die anderen Banden sind teilweise stark verbreitert, was auf eine Zersetzung hindeutet.

Enzymatische Ansätze und ihre Aufarbeitung

Mindestens drei Monate alte Wistarratten, die noch nicht trächtig waren, werden nach einer 12-stdg. Hungerperiode getötet und entblutet. Die Lebern bringt man sofort in eiskalte isotonische KCl-Lösung. 20-proz. Homogenat wird in isotonischer KCl-Lösung im Potter-Elvehjem-Homogenisator hergestellt, woraus man Erythrozyten, Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien bei $15\,000 \times g$ (Spinco L, 15 000 UpM, Rotor Nr. 40) während 15 min abzentrifugiert. Vor seiner Verwendung wird der $15\,000 \times g$ Überstand 15 min bei 37 °C präinkubiert. Die Inkubationsansätze werden wie folgt zusammengestellt: 1,5 ml präinkubierter $15\,000 \times g$ -Überstand; 0,25 ml 1 M-Nicotinsäureamidlösung; 0,5 ml NADPH-Lösung (3 mg/ml Puffer); 1,5 ml Östron-[16- ^{14}C] (10 μg /ml Puffer).

Mit 0,15 M-Phosphatpuffer nach Soerensen, pH 7,4, wird auf 4 ml aufgefüllt. Die Östronlösung erhält man durch Erwärmen von Östron-[16- ^{14}C] in wenig Äthanol und anschließendes Verdünnen mit Puffer. Die dabei auftretende Trübung verschwindet beim Erwärmen auf dem Wasserbad. Eine derartige „Lösung“ ist in der Kälte mehrere Stunden haltbar. Ihr geringer Alkoholgehalt (0,15 ml/20 ml Puffer) beeinflusst die Versuchsergebnisse nicht. Die in der vorgeschriebenen Weise zusammengestellten Ansätze werden unter Luftzutritt bei 37 °C im Thermostaten die erforderliche Zeit geschüttelt. Anschließend stoppt man die enzymatische Reaktion mit 1,5 ml 1 N-HCl. Die Kontrollansätze werden unmittelbar nach dem Zusammengehen der einzelnen Komponenten bei 0 °C mit 1 N-HCl versetzt. Zur Aufarbeitung schüttelt man jeden Ansatz bei 0 °C dreimal mit je 4 ml peroxidfreiem Äther aus und trocknet die vereinigten Extrakte mit Natriumsulfat. Nach Abrotieren des Äthers und Zugabe einer definierten Menge Methanol mißt man die Radioaktivität eines Aliquots. Um zu ermitteln, wieviel Prozent des eingesetzten ^{14}C -markierten Östrons nach der Inkubation unverändert in der Ätherphase vorliegen, verdünnt man deren Trockenrückstand mit 20 mg kaltem Östron und chromatographiert auf Aluminiumoxid (Akt.St. IV, sauer) (Firma Woelm) durch Elution mit je 200 ml Benzol, Benzol/Chloroform (4 : 1) und Benzol/Chloroform (3 : 1). Dann kristallisiert man das eluierte Östron bis zur konstanten spezifischen Aktivität aus Methanol um. Zum Carrierexperiment mit Lacton **11a** wird ein Teil der Ätherphase ($2,42 \cdot 10^4$ ipm) eines 4 ml-Inkubationsansatzes von Östron-[16- ^{14}C] mit $15\,000 \times g$ -Überstand und NADPH unter Luft (Inkubationszeit 1 Stde.) verwendet: Der Äther wird mit Stickstoff abgeblasen. Man löst den Rückstand in 0,2 ml Methanol und fügt tropfenweise 1 ml einer Diazomethanol-Lösung (0,9 mMol/ml) hinzu, zerstört nach 5 min den Überschuß mit Eisessig, versetzt die Lösung mit 4,66 mg Carrier (Lacton **11a**) und chromatographiert sie zur Vorreinigung auf einer Kieselgel-Dünnschichtplatte (Elutionsmittel: Essigester/Cyclohexan 3 : 1, R_F Lacton 0,38). Nach erneuter Zugabe von 8,4 mg Carrier (Lacton **11a**) kristallisiert man mehrmals bis zur konstanten spezifischen Aktivität aus Benzol um (vgl. Abb. 4).

¹ E. Hecker u. G. Nowoczek, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **337**, 257 [1964].

² F. Marks u. E. Hecker, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **345**, 22 [1966]; sowie Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **144**, 690 [1967].

³ E. Hecker, G. Walter u. F. Marks, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **111**, 546 [1965].

⁴ E. Kuss, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **349**, 9 [1968].

⁵ F. Marks u. E. Hecker, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **187**, 250 [1969].

⁶ R. D. H. Heard, Recent. Progr. Hormone Res. **9**, 383 [1954].

⁷ D. R. Brusca u. A. M. Gawienowski, Steroids **3**, 209 [1964].

⁸ G. Schulz u. E. Hecker, Z. Naturforsch. **28c**, 662 [1973].

⁹ D. T. Gibson, Science [Washington] **161**, 1093 [1968] sowie CRC Critical Rev. in Microbiol. **1**, 199 [1971].

- ¹⁰ K. Schubert u. C. Hörhold, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. **325**, 260 [1961].
- ¹¹ D. T. Gibson, K. C. Wang, C. J. Sih u. H. Whitlock jr., J. biol. Chemistry **241**, 551 [1966].
- ¹² L. Zechmeister, Experientia [Basel] **10**, 1 [1954].
- ¹³ A. T. Nielson, J. org. Chemistry **22**, 1539 [1957].
- ¹⁴ W. J. Bailey u. H. R. Golden, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4780 [1953].
- ¹⁵ H. H. Jaffé u. M. Orchin, „Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy“, p. 203, John Wiley & Sons, London 1962.
- ¹⁶ R. B. Woodward, J. Amer. chem. Soc. **64**, 72 [1942].
- ¹⁷ W. S. Johnson, V. J. Bauer, J. L. Margrave, M. A. Frisch, L. H. Dreyer u. W. N. Hubbard, J. Amer. chem. Soc. **83**, 606 [1961]; *ibid.* **82**, 1255 [1960].
- ¹⁸ H. Lau, Angew. Chme. **73**, 423 [1961].
- ¹⁹ A. Lardon, J. Schmidlin, A. Wettsteile u. T. Reichstein, Helv. chim. Acta **40**, 662 [1957].
- ²⁰ L. H. Knox, R. Villotti, F. A. Kincl u. H. J. Ringold, J. org. Chemistry **26**, 501 [1961].
- ²¹ E. Hecker, Chem. Ber. **92**, 1386 [1959].
- ²² R. L. Axelrod u. P. N. Rao, J. chem. Soc. [London] **1961**, 4769.
- ²³ H. Werbin, M. R. Imada u. I. L. Chaikoff, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **58**, 136 [1962].
- ²⁴ E. Hecker u. F. Marks, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **343**, 211 [1965].
- ²⁵ F. Dickens, „On Cancer and Hormones“, p. 107, The University of Chicago Press 1962.
- ²⁶ T. L. Dao, „On Cancer and Hormones“, p. 231, The University of Chicago Press 1962.