

# Aktivierung von Steroidsystemen zu alkylierenden Agenzien

Activation of Steroid Systems to Alkylating Agents

Manfred Wilk und Karlheinz Schmitt\*

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt, Laboratorium Niederrad,  
Sandhofstraße, D-6000 Frankfurt

Z. Naturforsch. **36b**, 248–251 (1981); eingegangen am 26. März/27. Mai/18. August 1980

Oxidation, 7-Dehydrocholesterol, Endogene Carcinogenesis

7-Dehydrocholesterol and ergosterol are oxidised by iodine and  $\text{FeCl}_3$  under "physiologically similar" conditions to highly reactive alkylating species. These can be trapped by nucleophiles, such as 1-methylimidazole.

The oxidation of the sterols to those alkylating species is discussed as a model-reaction for the first step in chemical carcinogenesis by endogene substrates.

## Einleitung

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Carcinomen und der Anwesenheit von Steroiden im Organismus wurde schon früh vermutet.

Die augenfällige Ähnlichkeit der Steroidstrukturen mit den Strukturen der als carcinogen bekannten polycyclischen Aromaten, führte schon vor fünfzig Jahren zu der Vermutung, daß die Steroide durch fehlgeleitete Stoffwechselforgänge im Körper zu solchen Aromaten umgewandelt werden könnten [1–4]. Solche Umwandlungen ließen sich *in vitro* auch tatsächlich durchführen [5], allerdings benötigte man dazu recht drastische Bedingungen, die man sich in der Zelle nicht recht vorstellen konnte.

Kürzlich durchgeführte epidemiologische Untersuchungen [6, 7] zeigen, daß der Gehalt an Cholesterol und Cholesterolabkömmlingen – speziell 7-Dehydrocholesterol – in der weiblichen Brustdrüse mit zu den Risikofaktoren für das Auftreten von Mamma-Carcinomen gehört.

Diese Ergebnisse führten uns zu der Vermutung, daß 7-Dehydrocholesterol, bzw. einer seiner Metaboliten durch alkylierende Wirkung auf die Zellnucleophile einen carcinogenen Effekt ausübt, d. h. als „ultimate carcinogen“ wirksam wird, ohne daß

erst eine Umwandlung des Steroids zum Aromaten erfolgt. Um diese Vermutung zu überprüfen, war es notwendig, Modellreaktionen zu finden, die dem natürlichen Reaktionsablauf in der Zelle möglichst nahe kommen: niedrige Temperaturen, Oxidationsmittel, deren Oxidationspotentiale den Potentialen der natürlichen „mixed-function“-Oxidasen der Zelle weitgehend entsprechen.

Schon früher konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [8–15], daß sowohl die sogenannte „Iodreaktion“ als auch die Reaktion mit Metallsalzen wie  $\text{FeCl}_3$  diese Bedingung nach physiologischer Ähnlichkeit erfüllen.

Bei diesen Reaktionen wird das Substrat durch Iod bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  zum Radikalkation oxidiert, das dann als alkylierendes Agens mit einem Nucleophil (Zellnucleophil) weiterreagieren kann.

## Ergebnisse

7-Dehydrocholesterol und Ergosterol (bzw. deren  $3\beta$ -Acetate) wurden mit Iod oder  $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  und 1-Methylimidazol umgesetzt. (Vgl. Abfangreaktionen mit intermediär auftretenden Elektrophilen [11–15].)

Die Reaktionsprodukte sind laut Elementaranalyse 1:1-Kupplungsprodukte zwischen Steroid und 1-Methylimidazol. Das konjugierte Doppelbindungssystem der Steroide ist in den Addukten nicht mehr vorhanden. Dies konnte durch die fehlende UV-Absorption des cisoid-konjugierten Doppelbindungssystems eindeutig gezeigt werden. Ein Strukturvorschlag läßt sich für die Addukte aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ableiten (Zuordnungen siehe Tab. I).

### Abkürzungen:

DHC – 7-Dehydrocholesterol,

ERG – Ergosterol,

4 K – Lösungsmittelgemisch:

Methanol: Benzol: Eisessig: aceton 70:20:5:5.

\* Sonderdruckanforderungen an Dr. Karlheinz Schmitt, Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Koellikerstraße 2, D-8700 Würzburg.

Tab. I. Lage und Zuordnung der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Steroid-Nucleophil-Addukte in ppm relativ zu TMS aufgenommen in  $\text{DMSO-d}_6$ , in Klammern: Zahl der Protonen laut Integration.

Chemische Verschiebung				Zuordnung
2a	2b	3a	3b	
9,01(1)	9,07(1)	9,00(1)	9,00(1)	H 2' Imidazol
7,72(1)	7,79(1)	7,70(1)	7,76(1)	H 5' Imidazol
7,61(1)	7,68(1)	7,60(1)	7,62(1)	H 4' Imidazol
6,18(1)	6,24(1)	5,25(1)		H 7 Steroid, bei 3b als Multiplett zwischen 5,00–5,30(5), O–O–H, H 3 und H 22,23
5,55(1)	5,58(1)			H 4
5,20(1)		4,65(1)	4,66(1)	H 6, bei 2b Multiplett 5,13–5,53(4): H 22,23 und H 3
5,25(1)		5,13(1)		
3,88(3)	3,91(3)	3,89(3)	3,89(3)	N–CH <sub>3</sub>
2,03(3)	2,07(3)	1,98(3)	1,98(3)	CH <sub>3</sub> -Acetoxy (3 $\beta$ )
	1,02(3)		1,02(3)	CH <sub>3</sub> -28
0,91(3)	0,90(3)	0,94(3)	0,89(3)	CH <sub>3</sub> -21
0,85(6)	0,81(6)	0,85(6)	0,81(6)	CH <sub>3</sub> -26, CH <sub>3</sub> -27
0,66(3)	0,68(3)	0,75(3)	0,75(3)	CH <sub>3</sub> -19
0,63(3)	0,65(3)	0,69(3)	0,69(3)	CH <sub>3</sub> -18

Die Signale der Imidazolprotonen liegen bei deutlich tieferem Feld als die des freien 1-Methylimidazols [16, 17], wobei das Signal der N-Methylgruppe am wenigsten stark entschirmt ist. Es scheint, daß hier das positive Zentrum an einem der beiden Stickstoffatome für die Tieffeldverschiebung verantwortlich ist [17]. Aufgrund der vergleichsweise geringen Verschiebung des N-Methylsignals kann man annehmen, daß das positive Zentrum, d. h. die Verknüpfungsstelle mit dem Steroid an Stickstoff 3' lokalisiert ist.

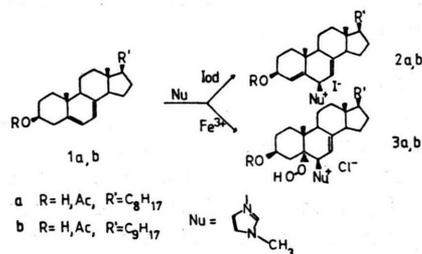
Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der Produkte der Iodreaktion und denen der  $\text{FeCl}_3$ -Reaktion ergeben sich erst bei der Betrachtung der Signale im olefinischen Bereich. Entkopplungsexperimente und stereochemische Betrachtungen am Dreidingmodell führen im Fall der Iodreaktions-Produkte zu den in Tab. I dargestellten Zuordnungen.

Danach kann für diese Produkte der Strukturvorschlag 2a, b gemacht werden (Abb. 1).

Bei den Produkten der  $\text{FeCl}_3$ -Reaktion liegen die Verhältnisse etwas komplizierter: Bestimmung des Sauerstoffgehaltes und Besprühen einer mit Produkt präparierten Dünnschichtplatte mit N.N'.N'.N'-tetramethyl-p-phenylendiamin zeigen, daß zusätzlich zum N-Methylimidazolsubstituenten eine Hydroperoxygruppe im Molekül vorhanden sein muß. Weiterhin zeigt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, daß im Molekül nur noch eine einzige Doppelbindung vorhanden ist. An der Multiplizität der Signale im „off-resonance“-Spektrum erkennt man ein Singu-

lett für einen nicht protonierten Kohlenstoff bei  $\delta = 149,13$  ppm und ein Dublett für einen olefinischen Methin-Kohlenstoff bei  $\delta = 111,37$  ppm. Das Auftreten eines Singulett bei  $\delta = 74,76$  ppm zeigt, daß einer der beiden Substituenten an einer Ringverknüpfungsstelle lokalisiert ist. Da man C–O-Resonanzen im allgemeinen bei etwas tieferem Feld erwarten sollte als C–N-Resonanzen [18], sollte es sich hierbei um einen Sauerstoff-substituierten Kohlenstoff handeln. Das Dublett bei  $\delta = 63,75$  wäre demnach einem  $\text{CH-N}$ -Kohlenstoff zuzuordnen.

Die Zuordnungen der Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, wie sie nach Entkopplungsexperimenten und Betrachtungen am Dreidingmodell getroffen werden können, sind in Tab. I gezeigt. Demnach läßt sich für die Produkte der  $\text{FeCl}_3$ -Reaktion Strukturvorschlag 3a, b ableiten (Abb. 1).

Abb. 1. Strukturvorschlag für die Produkte der Iodreaktion 2a, b und der  $\text{FeCl}_3$ -Reaktion 3a, b.

### Diskussion

Es ist bekannt, daß unter den Bedingungen der Iodreaktion bei aromatischen Kohlenwasserstoffen

[8], Farbstoffen, aromatischen Aminen und Heterocyclen [9], sowie Alkaloiden [10], Reaktionen ablaufen, deren Ergebnisse sich am besten über das intermediäre Auftreten von Radikalkationen deuten lassen.

In unserem Falle erscheint die Bildung eines freien Radikalkations allerdings problematisch, hätte dabei doch das stabilere  $\alpha$ -Epimere entstehen sollen. Die  $\alpha$ -Seite des Steroids muß also während des nucleophilen Angriffs blockiert sein. Faßt man Iod als Lewisäure auf, wird verständlich, daß die Doppelbindungen des Steroids durch Polarisierung gegenüber einem nucleophilen Angriff reaktiver wird. Dabei wird im Sinne einer *trans*-Addition zum Iod, das sich auf der  $\alpha$ -Seite des Steroids befindet, die Bildung des instabileren  $\beta$ -Epimeren begünstigt (vgl. [19, 20]).

Für die Iodreaktionsprodukte resultiert daraus der folgende Vorschlag eines Bildungsmechanismus:

1. Polarisierung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung durch Iod von der  $\alpha$ -Seite her und Angriff des Nucleophils über die  $\beta$ -Seite des Steroids 4 (Abb. 2).

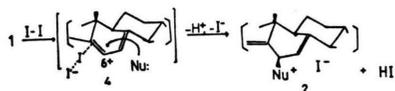


Abb. 2. Möglicher Bildungsmechanismus der Iodreaktions-Produkte: Durch die Lewisäure Iod kommt es zur Polarisierung der Doppelbindung (EDA-Komplex). Das Nucleophil greift von oben her Kohlenstoff 6 an. Durch Abspaltung von  $H^+$  in Allylstellung zu Nu und Abspaltung von I unter Mitnahme eines Elektrons bildet sich Produkt 2.

2. Eliminierung des Iods unter Mitnahme eines Elektrons und Rückbildung der Doppelbindung in Allylstellung zum Substituenten durch Abspaltung von  $H^+$  an C4 2.

Für die Bildung der  $FeCl_3$ -Reaktionsprodukte erscheint uns ein radikalischer Mechanismus plausibel. Dabei wird durch die Zersetzung von  $H_2O_2$  nach Fenton [21], Haber und Weiss [22] und Weinstein *et al.* [23] (durch  $Fe^{3+}$ ) Sauerstoff frei, der im Sinne von Tang *et al.* [24] gemeinsam mit  $Fe^{3+}$  das cyclische 1,3-Diensystem der Steroide unter Bildung eines *endo*-Peroxid-Radikalkations (5) angreift. Dieses Radikalkation kann mit dem Nucleophil unter Bildung von 3 reagieren (Abb. 3). Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß sich unter den von uns gewählten Bedingungen, die man als physiologisch

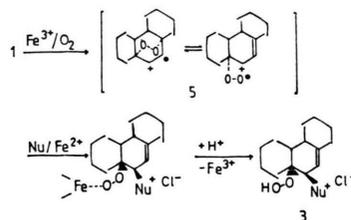


Abb. 3. Möglicher Bildungsmechanismus der Produkte der  $FeCl_3$ -Reaktion über das Radikalkation-endo-peroxid (5) (Lit. [24]).

ähnlich bezeichnen kann, bestimmte Steroide – 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol in alkylierende Agenzien überführen lassen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, daß auch *in vivo* derartige Steroide unter der Wirkung bestimmter Monooxygenasen in alkylierend wirksame Verbindungen überführt werden können und so durch Reaktion mit den Makromolekülen der Zelle zur endogenen Carcinogenese und Mutagenese beitragen. Eine Umwandlung von Steroiden in polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe ist demnach für die Endogenese carcinogener Verbindungen nicht notwendig. Ein einziger Ein-Elektronenschritt kann genügen, Steroide in hochreaktive alkylierende Spezies umzuwandeln.

## Experimentelles

NMR-Spektren: Bruker WH 270, Meßfrequenzen 270 MHz ( $^1H$ ), 67,88 MHz ( $^{13}C$ ).  $^1H$ -Spektren aufgenommen in  $DMSO-d_6$ ,  $^{13}C$ -Spektren in  $CDCl_3$ , TMS als innerer Standard.

UV-Spektren: Beckman Modell 25, aufgenommen in Methanol „uvasol“ (Merck).

Chromatographie: DC-Mikroarten SI F mit Fluoreszenzindikator (Riedel-deHaen), DC Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) Säulenchromatographie: Sephadex LH 20 (Pharmacia, Uppsala). Die verwendeten Chemikalien sind im Handel erhältlich und wurden jeweils umkristallisiert bzw. destilliert. Die Sterolacetate wurden aus dem freien Sterol mit Acetanhydrid nach der „Organikum“-Vorschrift hergestellt.

## Reaktionsbedingungen

**Iodreaktion:**  $10^{-3}$  mol des Sterols oder seines Acetats werden in wenig Methylchlorid gelöst und mit 7 ml 1-Methylimidazol versetzt. Man gibt in kleinen Portionen 1,25 g ( $5 \times 10^{-3}$  mol) Iod hinzu und rührt 20 h bei RT (37 °C) auf dem Wasserbad). Nun wird mit 50 ml Methylchlorid aufgenommen und zur Entfernung des überschüssigen Iods 2–3-mal mit wäßriger Natriumthiosulfatlösung ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat rotiert

man zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit wenig Methanol auf und eluiert über eine Säule mit Sephadex LH 20 (120 cm lang,  $\varnothing$  3–4 cm).

Die zuerst eluierte Fraktion enthält das gewünschte Produkt in angereicherter Form. Um genügend reines Produkt zu erhalten ist meist mehrmaliges Säulen erforderlich. Man rotiert nun das Elutionsmittel (Methanol) ab. Die weitere Aufarbeitung kann in drei Varianten erfolgen:

1. Der Rückstand wird in 3 ml Methanol aufgenommen und mit 3 ml 70-proz. Perchlorsäure versetzt. Man gießt nun in 50 ml Wasser. Das als Perchlorat ausgefallene Produkt wird abgesaugt.

2. Man nimmt mit 3 ml Methylenchlorid auf und gießt die Lösung in 30 ml *n*-Hexan. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt. Sollte hier nichts ausfallen, so verfährt man nach

3. Die *n*-Hexan/Methylenchlorid-Lösung des Produkts wird zur Trockene einrotiert. Man nimmt mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch auf und rotiert ein. Dieses Verfahren wird mehrmals wiederholt. Das gewünschte Produkt bleibt schließlich als gelblich-weißes Pulver im Kolben zurück. Es wird jeweils im evakuierten Exsikkator über  $P_2O_5$  getrocknet.

Die Produkte sind sehr instabil, sie zersetzen sich oberhalb 100 °C,  $R_f$ -Werte in „4 K“ als Entwickler: um 0,0–0,2. Die Ausbeuten liegen bei 10%.

### *FeCl<sub>3</sub>-Reaktion*

10<sup>-3</sup> mol des entsprechenden Sterols oder seines Acetats werden in wenig  $CH_2Cl_2$  gelöst. Anschließend gibt man die equimolare Menge des Oxidationsmittels ( $FeCl_3 \times 6H_2O$ ) und 7 ml *N*-Methylimidazol zu. Man tropft zu der Reaktionsmischung 5 ml einer acetonischen  $H_2O_2$ -Lösung zu. (Aceton: 30-proz.  $H_2O_2$  – 1:1). Die Lösung schäumt stark auf und färbt sich dunkelbraun bis schwarz. Nachdem man noch 45 min bei Raumtemperatur (oder 37 °C) gerührt hat, kann man weiter aufarbeiten: Man nimmt mit 50 ml Methylenchlorid auf und schüttelt mit halbkonzentrierter Salzsäure aus. Nach zweibis dreimaligem Waschen mit Wasser und Trocknen über  $Na_2SO_4$  wird zur Trockene einrotiert, mit wenig Methanol aufgenommen und auf eine Sephadex LH 20-Säule (Laufmittel Methanol) aufgetragen. Das gewünschte Reaktionsprodukt wird als erstes eluiert. Meist ist jedoch mehrmaliges Säulen erforderlich, um auch die letzten Metallsalzverunreinigungen zu entfernen. Die methanolische Lösung des Produktes wird schließlich zur Trockene einrotiert, der Rückstand mit 3 ml Methylenchlorid aufgenommen und in 30 ml *n*-Hexan gegossen. Das gewünschte Produkt fällt aus und kann abgesaugt werden. Man trocknet im evakuierten Exsiccator. Die Produkte zersetzen sich oberhalb 100 °C. Sie sind auf der Dünnschichtplatte bei  $R_f=0,0$  durch Ansprühen mit *N,N,N',N'*-*p*-Phenylendiamin zu identifizieren.

- 
- [1] V. Ghiron, Proc. Third Intern. Cancer Congr. 1939, 116.  
 [2] J. W. Cook, E. L. Kennaway, N. M. Kennaway, Nature 145, 627 (1940).  
 [3] I. Hieger, Brit. Med. Bull. 14, 159 (1958).  
 [4] A. Lacassagne, N. P. Buu Hoi u. F. Zajdela, Nature 209, 1026 (1966).  
 [5] H. Wieland u. E. Dane, Hoppe Seylers Z. 219, 240 (1933).  
 [6] E. L. Wynder, J. Am. Diet Assoc. 71, 385 (1977) und dort zitierte Literatur.  
 [7] E. L. Wynder, persönl. Mitteilung an M. Wilk.  
 [8] M. Wilk, W. Bez u. J. Rochlitz, Tetrahedron 22, 2599 (1966).  
 [9] M. Wilk, U. Hoppe, W. Taupp u. J. Rochlitz, J. Chromatogr. 27, 311 (1967).  
 [10] M. Wilk u. U. Brill, Arch. Pharm. Ber. Dt. Pharm. Ges. 301, 282 (1968).  
 [11] J. Rochlitz, Tetrahedron 23, 3043 (1967).  
 [12] D. Schäfer, Diplomarbeit, Frankfurt 1971.  
 [13] H. Binder, Diplomarbeit Frankfurt 1971.  
 [14] D. Schäfer, Dissertation, Frankfurt 1976.  
 [15] H. Binder, Dissertation, Frankfurt 1976.  
 [16] G. S. Reddy, R. T. Hobgood u. J. H. Goldstein, J. Am. Chem. Soc. 84, 336 (1962).  
 [17] A. Mannschreck, W. Seitz u. H. A. Staab, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 67, 470 (1963).  
 [18] E. Breitmaier u. G. Bauer, Pharmazie in unserer Zeit 5, 97 (1976).  
 [19] D. J. Collins, W. R. Jackson u. R. N. Timmes, Tetrahedron Lett. 6, 494 (1976).  
 [20] B. M. Trost u. P. E. Strege, J. Am. Chem. Soc. 97, 2534 (1975).  
 [21] H. J. H. Fenton, J. Chem. Soc. 1894, 899.  
 [22] F. Haber u. J. Weiss, Proc. Royal Soc. London Ser. A 147, 332 (1934).  
 [23] J. Weinstein u. B. J. H. Bielsky, J. Am. Chem. Soc. 101, 58 (1979).  
 [24] R. Tang, H. J. Yue, J. F. Wolf u. F. Mares, J. Am. Chem. Soc. 100, 5248 (1978).