

It is apparent from the data in Table I that the Hill-reaction activity to 2,3',6-trichlorophenolindophenol and photophosphorylation as elicited by several co-factors is not affected by the above freezing and thawing technique nor by storage under liquid nitrogen for at least a month. Storage of similar preparations at -8° resulted in a complete loss of phosphorylation activity within 72 h.

TABLE I
EFFECT OF FREEZING OF CHLOROPLAST SUSPENSION ON HILL-REACTION ACTIVITY
AND PHOTOPHOSPHORYLATION
All values are μ moles/mg chlorophyll/h.

	Chloroplast preparation	
	Untreated	Frozen, stored for 1 month
Hill-reaction activity to 2,3',6-trichlorophenolindophenol	129	129
Photophosphorylation with as cofactor		
phenazine methosulfate	492	477
FMN	149	181
menadione	208	170

This technique has proved extremely useful in the storage of chloroplasts extracted with heptane to remove the plastoquinone. Thus, a uniformly depleted chloroplast preparation which could be consistently reactivated by the readdition of plastoquinone was available for numerous comparative studies.

This investigation was supported by Grant GM 07658-03 from the U.S. Public Health Service.

Department of Chemistry, Wayne State University,
Detroit, Mich. (U.S.A.)

WARREN C. DUANE
DAVID W. KROGMANN

¹ M. AVRON, A. T. JAGENDORF AND M. EVANS, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 262.

² D. I. ARNON, *Plant Physiol.*, 24 (1949) 1.

³ A. T. JAGENDORF AND M. AVRON, *J. Biol. Chem.*, 231 (1958) 277.

⁴ A. T. JAGENDORF, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 141.

Received October 13th, 1962

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 195-196

SC 2213

Östrogene und antiöstrogene Wirkung einiger Östranabkömmlinge *in vitro* und *in vivo*

Vor kurzem wurde über die Darstellung neuer, in 3-Stellung substituierter Östranabkömmlinge berichtet¹. Diese und einige andere Derivate des Östrans werden *in vitro* an der östrogenabhängigen Transhydrogenase aus menschlicher Placenta sowie *in vivo* im Allen-Doisy-Test auf ihre östrogene und antiöstrogene Wirkung geprüft.

Die Transhydrogenase aus menschlicher Placenta²⁻⁵ wird nach einem modifizierten Verfahren angereichert und als Trockenpulver in lagerfähiger Form erhalten.

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 196-198

TABELLE I

WIRKUNG VERSCHIEDENER ÖSTRAN-ABKÖMMLINGE AUF DIE ÖSTROGENABHÄNGIGE TRANSHYDROGENASE AUS MENSCHLICHER PLACENTA (*in vitro*)
UND IN ALLEN-DOISY-TEST AN KASTRIERTEN MÄUSEN (*in vivo*)

Nr.	Substanz	Schmelzpunkt	Wirksamkeit <i>in vitro</i>		Wirksamkeit <i>in vivo</i>	
			a % Aktivierung mit den Konzentrationen $2.8 \cdot 10^{-8}$ M	b % Hemmung mit den Konzentrationen $2.8 \cdot 10^{-8}$ M	c in % der Wirkung von Östradiol (17 β)	d
1	Östradiol-(17 β)	175-176	100	—	—	100
2	Östron	253-254	80	— 3	— 5	10
3	3-Chlor- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrienol-(17 β)	fl.	13	— 3	— 7	< 1
4	3-Jod- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrienol-(17 β)	fl.	10	70	— 2	< 1
5	3-Desoxy-östradiol-(17 β)	115-116	13	43	— 13	0.2
6	3-Methoxy-östron	168-169	3	20	0	0
7	3-Carboxy- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrienol-(17 β)	283-284	3	20	0	0.2
8	3-Amino- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrienol-(17 β)	145-146	0	0	— 11	0.2
9	3-Thio-östradiol-(17 β)	98-100	0	7	— 11	< 1
10	Östradiol-(17 α)	220-222	0	0	— 52	~ 4 (Ref. 7)
11	3-Hydroxy- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrien	133-134	0	0	— 7	~ 0.2 (Ref. 8)
12	3-Hydroxy-17 β -amino- $\Delta^{1,3,5(10)}$ -östratrien	221-222.5	0	0	— 3	< 1
13	17 α -Äthynyl-östradiol-(17 β)	180-181	0	0	— 14	~ 100 (Ref. 9)
14	Östriol	280-281	0	5	— 10	~ 0.4 (Ref. 9)

Zur Prüfung der Enzymaktivierung verfolgt man die Kinetik der Bildung von DPNH aus DPN⁺ in einem optischen Test. Der Ansatz besteht aus: 5.0 ml Substratmischung (pH 7.4) (diese enthält in 100 ml: 10 μ Mol TPN⁺, 100 μ Mol DPN⁺, 75 μ Mol EDTA, 250 μ Mol MgCl₂, 6 mMol Tris-HCl-Puffer), 1.0 ml Glukose-6-phosphat-Lösung (Natrium-Salz Boehringer, 3 mg/ml Wasser), 0.05 ml Zwischenfermentlösung (Präp. Boehringer, 0.1 ml verdünnt mit Puffer ad 3 ml) und 1.8 ml Proteintrockenpulver-Lösung (12 mg/ml Puffer). Pro Versuch werden 2.56 ml der angegebenen Mischung (pH 7.4) mit 0.04 ml einer geeignet konzentrierten Lösung der zu testenden Verbindung in Dimethylformamid versetzt. Von diesem Moment an verfolgt man die Änderung der optischen Dichte bei 340 m μ 30 Min lang bei 32°. Als Mass für die aktivierende Wirkung der geprüften Substanz gilt die zwischen der 10. und 30. Versuchsminute (linearer Anstieg) gebildete DPNH-Menge. Bei der Prüfung auf antiöstrogene Wirksamkeit *in vitro* enthält der Ansatz jeweils neben dem fraglichen Antiöstrogen gleichzeitig Östradiol-17 β in einer Konzentration von $2.8 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. Der mit letzterem allein erzielte Effekt ist in Tabelle I Spalten a und b gleich 100 % gesetzt.

Der Allen-Doisy-Test wird an kastrierten Mäusen in Gruppen zu je 12 Tieren ausgeführt. Man injiziert die zu prüfende Lösung des Östrogens in Sesamöl unter die Rückenhaut. 0.1 μ g Östradiol-(17 β) pro Maus gibt bei 80–100 % der Tiere den typischen Vaginaabstrich. Diese Östrogenmenge ist in Tabelle I gleich 100 % gesetzt. Für die übrigen Östranabkömmlinge wird in einer Verdünnungsreihe diejenige Menge ermittelt, die bei mindestens 80 % der Mäuse einer Gruppe den positiven Vaginaabstrich gibt. Wenn dazu die 10-fache Substanzmenge verglichen mit Östradiol-(17 β) benötigt wird, so besitzt die Substanz nur 10 % der Wirksamkeit des Östradiols-(17 β) (vgl. Tabelle I, Spalte c, Östron). Auf antiöstrogene Wirkung *in vivo* wird durch gleichzeitige Injektion von 0.1 μ g Östradiol-(17 β) und der maximalen, noch nicht östrogenwirksamen Dosis der zu testenden Substanz geprüft.

Ausser Östron vermögen auch die Verbindungen 3–7 die östrogen-abhängige Transhydrogenase zu aktivieren, was besonders bei Anwendung einer höheren Konzentration deutlich wird. Sie hemmen jedoch die Wirkung des Östradiols-(17 β) nur wenig oder gar nicht, auch wenn sie in 10-fach höherer Konzentration als dieses anwesend sind. Grössere Hemm- oder Antiöstrogen-Wirkung *in vitro* zeigen die Verbindungen 8–14; sie aktivieren das Enzym nicht, wie es für ein ideales Antiöstrogen zu fordern ist.

In vivo erweisen sich die Östranabkömmlinge 3–12 als schwache Östrogene. Die Verbindungen 13 und 14 sind wirksamer. Antiöstrogene Wirkung *in vivo* wurde bei den Substanzen 3–9 nicht beobachtet.

Max-Planck-Institut für Biochemie,
München (Deutschland)

E. HECKER
G. FARTHOFFER

¹ E. HECKER, *Chem. Ber.*, 95 (1962) 977; vergl. *Angew. Chem.*, 73 (1961) 772.

² C. A. VILLEE UND D. D. HAGERMANN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 42.

³ C. A. VILLEE UND D. D. HAGERMANN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2031.

⁴ P. TALALAY UND H. G. WILLIAMS-ASHMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 15.

⁵ P. TALALAY, B. HURLOCK UND H. G. WILLIAMS-ASHMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 862.

⁶ B. ZONDECK UND E. BERGMANN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 641.

⁷ A. BUTENANDT UND C. GOERGENSEN, *Z. Physiol. Chem.*, 248 (1935) 129.

⁸ C. HUGGINS UND E. V. JENSEN, *J. Exptl. Med.*, 102 (1955) 335.

⁹ H. H. INHOFFEN UND W. HOHLWEG, *Naturwissenschaften*, 26 (1938) 96.

Eingegangen am 8. Oktober, 1962