

to combine with a specific antibody occurring in blood serum of rabbits immunized as previously reported¹⁴. Quantitative measurements were carried out according to the standard procedure of precipitine curves, and the precipitates were measured, after dissolution in NaOH 0.2 M, for their absorbance at 280 nm in a Beckman DU spectrophotometer.

Results and conclusions. When heated, the Yoshida glycoprotein does not change its solubility even if the heating is prolonged up to 3 h. Moreover the analysis in the ultracentrifuge reveals that the rise of temperature determines a loss of the homogeneity. A heavier component, which represents about 20% of the principal peak, has been observed and, from calculations of the sedimentation coefficient, it was concluded that, following heating, the Yoshida glycoprotein undergoes aggregation and the size of the aggregated molecule may be evaluated as the double of the native one.

The changes in spectroscopic properties of Yoshida glycoprotein upon heating are shown in Figure 1. Marked

modifications in the spectrum are observed in the range between 310 and 260 nm. The modifications became apparent at 70°C (Figure 1, B) and increased with temperature (Figure 1, C). Thermal denaturation is almost reversible because, after cooling (Figure 1, D), the difference spectrum of Yoshida glycoprotein is quite similar to that of native (Figure 1, A).

After heating, most proteins in solution soon lose their ability to interact with antibodies elicited by their undenatured counterparts. In the case of Yoshida glycoprotein, as observed in Figure 2, the original antigenic specificity has not been lost. The figure clearly indicates that quantitative precipitin reaction of heated Yoshida glycoprotein is similar to that of the native one. The only exception is represented by the descending portion of the curve which is broad and therefore less homogeneous, thus confirming the occurrence of differently sized antigenic determinants. The antigenic specificity did not change with the increase of the temperature. The precipitin reaction carried out with the protein heated at 90°C was in fact identical with that of protein at 70°C.

It has been previously demonstrated⁵ that chemical modification of tyrosyl groups suppresses the capacity of this antigen to combine with specific antibody, thus indicating that tyrosyl residues are of fundamental importance for the immunospecificity of the glycoprotein.

Nevertheless, the fact that heating does not abolish this capacity is not surprising if one considers that the changes in temperature difference spectra can be attributed not only to tyrosyl but also to a contribution of tryptophanyl and phenylalanyl residues.

Moreover the spectral changes, essentially due to modifications both of intrinsic solvent effect and of degree of ionization of certain groups, are reversible.

These observations indicate that the conformational changes of Yoshida glycoprotein, which occur upon heating, do not modify the small areas of the surface of the molecule which are involved in the reaction with antibody.

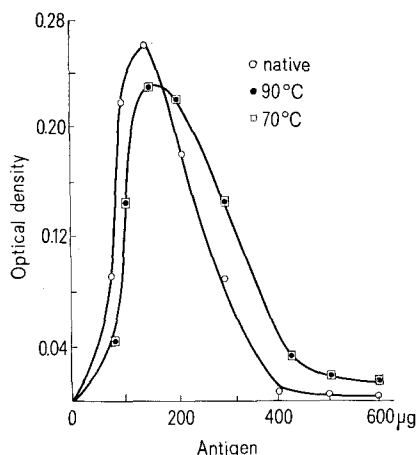


Fig. 2. Quantitative precipitin reactions of native (○—○) and heated (□—□, 70°C; ●—●, 90°C) Yoshida glycoprotein with rabbit antibodies to native Yoshida glycoprotein.

¹⁴ P. P. GAZZANIGA, F. R. SONNINO and A. CAPUTO, in *Protides of the Biological Fluids*, Proc. 11th Colloq., Bruges 1963 (Ed. H. Peters; Elsevier, Amsterdam 1964), vol. 11, p. 338.

Wirkung von 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion (Ro 6-1963) auf die Steroidreduktasen in der Rattenleber¹

Effect of 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-diene-3,20-dione (Ro 6-1963) on the Steroid Reductases in Rat Liver

V. GRAEF and S. W. GOLF

Zentrum für Biochemie, Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Friedrichstrasse 24, D-63 Giessen (Bundesrepublik Deutschland), 30. März 1976.

Summary. 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-diene-3,20-dione inhibites the Δ^4 -3-oxosteroid-5 α -reduction in microsomes and the Δ^4 -3-oxosteroid-5 β -reduction in the soluble fraction of male rat liver. The 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase are not inhibited by this substance.

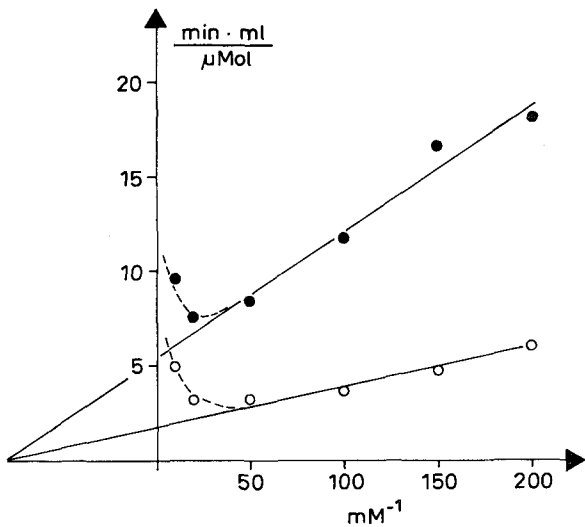
6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion (Ro 6-1963) zeigte sich wirksam als Inhibitor der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase der Rattenprostata in vitro². Uns interessierte die Wirkung dieser Substanz auf die Enzyme des Steroidstoffwechsels in der Rattenleber, und zwar auf die Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase und die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Mikrosomenfraktion und die Δ^4 -3-Oxosteroid-5 β -Reduktase im Cytoplasma.

Methoden. Wir benutzten die Leber männlicher Wistar-Ratten. Die Präparation der Mikrosomen erfolgte in der schon beschriebenen Weise³. Die enzymatischen Aktivitäten wurden berechnet aus den gaschromatographisch bestimmten Produkten. Die enzymatischen Ansätze zur Bestimmung der Aktivität der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase enthielten in einem Volumen von 3,0 ml: 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 0,8 mM NADPH, bis zu

0,1 mM Δ^4 -3-Oxosteroid, bis 0,69 mg Mikrosomenprotein, 0,09 mg 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion (in 30 μ l Äthanol) oder als Leerwert 30 μ l Äthanol. In den Ansätzen mit Testosteron, Androsten-3,17-dion, Androsten-3,11,17-trion, Progesteron und 11-Oxoprogesteron als Substrat wurde die Reaktion durch Schütteln mit Äther unterbrochen. Der Ätherextrakt wurde eingedampft und der Rückstand mit 0,1 ml *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-acetamid 1 h auf 65°C erwärmt. Überschüssiges *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-acetamid wurde bei 50°C mit trockenem Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde in 100 μ l Aceton gelöst. 1 μ l dieser Lösung wurde in den Gaschromatographen eingespritzt. (2-m-Säule aus 3% OV-17 auf Chromosorb W/AW-DMCS. Säulentemperatur 275°C, Einspritzblock 300°C.) Die Ansätze mit Cortison, Cortisol und 11-Desoxycortisol wurden im Anschluss an die enzymatische Reaktion mit 2 ml Propionsäure und 2 g Natriumbismutat 1 h geschüttelt. Die gebildeten 17-Oxosteroide wurden mit Benzol extrahiert und in gleicher Weise wie oben als Trimethylsilyläther gaschromato-

Hemmung der mikrosomalen Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase durch 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion (Ro 6-1963) (*n* = 4-8)

Substrat	Spez. Aktivität der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase (nMol/Min · mg)		
	Obne Ro 6-1963	Mit Ro 6-1963	Hemmung (%)
Testosteron	30,00 ± 1,71	18,96 ± 3,23	36,8
Androsten-3,17-dion	37,39 ± 1,87	21,96 ± 2,58	41,3
Androsten-3,11,17-trion	38,05 ± 0,63	15,74 ± 2,21	58,6
11-Desoxycortisol	33,22 ± 4,79	14,33 ± 1,02	58,9
11-Desoxycorticosteron	29,42 ± 1,20	13,01 ± 1,37	55,8
Progesteron	11,74 ± 0,69	6,75 ± 0,18	42,5
11-Oxoprogesteron	30,98 ± 7,34	3,11 ± 1,22	90,0
Cortison	17,86 ± 1,45	1,81 ± 0,02	89,9
Cortisol	16,39 ± 0,97	1,76 ± 0,08	88,6
Corticosteron	20,13 ± 2,67	3,69 ± 0,69	81,7



Kinetik der Hemmung der Testosteron-5 α -Reduktion durch 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion mit steigenden Testosteron-Konzentrationen.

graphisch bestimmt. Die aus Corticosteron und 11-Desoxycorticosteron entstandenen Reaktionsprodukte wurden als *O*-Methoxim-trimethylsilyläther bestimmt⁴.

Ergebnisse und Diskussion. Bei der Inkubation von Mikrosomen der männlichen Rattenleber mit äquimolaren Mengen verschiedener Δ^4 -3-Oxosteroide mit 6 β -Methoxy-9 β ,10 α -pregna-4,6-dien-3,20-dion in Gegenwart von NADPH fanden wir, dass die Steroid-5 α -Reduktion bei allen Substraten, allerdings in einem unterschiedlichen Ausmass, gehemmt wird (Tabelle). Die Reduktion von Testosteron und Androsten-3,17-dion wird etwa im gleichen Masse gehemmt. Eine zusätzliche 11-Oxogruppe führt zu einer verstärkten Hemmwirkung. Besonders stark war die Hemmung der 5 α -Reduktion von Cortison, Cortisol und Corticosteron. Selbst mit dem 100. Teil der Hemmstoffkonzentration betrug die Hemmung bei Cortison noch 25%. Fehlt im Substratmolekül eine Sauerstoff-Funktion an C-11, ist die Hemmung bedeutend geringer.

Die Substrat-Sättigungskurve (Figur) zeigt, dass die Hemmung der Testosteron-5 α -Reduktion nichtkompetitiven Charakter hat.

($K_m = 1,16 \times 10^{-5} M$; $V_{max} = 0,526 \mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$; $K_i = 5,14 \times 10^{-5} M$).

K_i wurde nach der Gleichung $\frac{1}{v} = \frac{1 + [I]/K_i}{V}$ berechnet.

Die in Gegenwart von hohen Testosteron-Konzentrationen auftretende Substrathemmung wurde bisher noch nicht beschrieben. Die zur Hemmung erforderlichen Substratkonzentrationen werden allerdings unter physiologischen Bedingungen oder nach therapeutischer Anwendung von Steroiden nicht erreicht.

Auf Grund der spez. Aktivitäten und dem Ausmass der Hemmung lassen sich die Δ^4 -3-Oxosteroide in mindestens 2 Gruppen unterteilen, die vermutlich durch verschiedene 5 α -Reduktasen reduziert werden: 1. Testosteron, Androsten-3,17-dion, 11-Desoxycortisol und 11-Desoxycorticosteron (spez. Aktivität 29,4–37,4 nMol · min⁻¹ · mg⁻¹; Hemmung 36,8–58,9%). 2. Cortisol, Corticosteron, Cortison (spez. Aktivität 16,4–20,1 nMol · min⁻¹ · mg⁻¹; Hemmung 81,7–89,9%).

Wir stellten weiter fest, dass auch die cytoplasmatische 5 β -Reduktase durch Ro 6-1963 gehemmt wird. Mit etwa äquimolaren Mengen Substrat und Hemmstoff und NADH als Cosubstrat wurde die Reduktion von Testosteron zu 37,2%, von Androsten-3,17-dion zu 31,7%, von Progesteron zu 23% und von 11-Oxoprogesteron zu 54% gehemmt. Die Cortison-5 β -Reduktase war gegenüber dem Hemmstoff besonders empfindlich. Die Hemmung betrug über 90%. Keine Hemmung wurde dagegen auf die mikrosomale 3 α - und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase beobachtet. Der Hemmstoff selbst wurde in Gegenwart von Mikrosomen oder Cytoplasma und NADPH (NADH) nicht verändert.

¹ Diese Arbeit wurde von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, unterstützt.

² F. Lotz, F. Hoffmann-La Roche, Basel (Schweiz), persönliche Mitteilung.

³ S. W. GOLF, V. GRAEF und HJ. STAUDINGER, Z. physiol. Chem. 355, 1499 (1974).

⁴ W. L. GARDINER und E. C. HORNING, Biochim. biophys. Acta 115, 524 (1966).