

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 14, 1976, pp. 59–64

## Untersuchungen über die Substratspezifität einer $3\alpha$ , $20\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase

Von R. Allner und M. Eggstein

Zentrallaboratorium des Städt. Krankenhauses Fulda, Lehrkrankenhaus der Universität Marburg/Lahn, und Medizinische Klinik der Universität Tübingen, Abteilung Innere Medizin IV

(Eingegangen am 22. April/26. August 1975)

**Zusammenfassung:** Das Enzym  $3\alpha$ ,  $20\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase (EC 1.1.1.53) katalysiert die Reduktion von 20-Oxogruppen der C<sub>21</sub>-Steroide bei Anwesenheit von NADH in einer äquimolar verlaufenden Reaktion und die Oxidation von  $3\alpha$ -Hydroxygruppen der  $5\alpha$ -Androsterivate in einer nicht äquimolar verlaufenden Reaktion bei Anwesenheit von NAD.

Die wichtigsten im menschlichen Urin vorkommenden C<sub>18</sub>-, C<sub>19</sub>- und C<sub>21</sub>-Steroidhormone wurden auf ihre Reaktionsfähigkeit mit dem Enzym bei Anwesenheit von NADH und NAD geprüft.

Die Geschwindigkeit der Reduktion der 20-Oxosteroide wird durch Substituenten in den verschiedenen Stellungen des Steroidgerüsts beeinflusst.

Die beschriebenen Untersuchungen sind als Grundlage für eine spätere klinisch-chemische Anwendung gedacht.

### *Specificity of $3\alpha$ , $20\beta$ -hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase*

**Summary:** The enzyme  $3\alpha$ ,  $20\beta$ -hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (EC 1.1.1.53) catalyses the stoichiometric reduction of 20-oxo groups of C-21 steroids by NADH, and the non-stoichiometric oxidation of  $3\alpha$ -hydroxy groups of  $5\alpha$ -androstane derivatives by NAD.

The activity of the enzyme towards the most important C-18, C-19 and C-21 steroids of human urine was tested in the presence of NAD and NADH.

The rate of reduction of 20-oxo steroids is influenced by substituents at various positions of the steroid skeleton.

These studies are intended as the basis of an eventual clinical chemical application.

### **Einführung**

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungsergebnisse über die Substratspezifität einer  $3\alpha$ ,  $20\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase (EC 1.1.1.53) mitgeteilt. Als Substrate wurden im menschlichen Urin vorkommende C<sub>18</sub>-, C<sub>19</sub>- und C<sub>21</sub>-Steroide untersucht.

Das Enzym, ein Handelspräparat der Firma Boehringer Mannheim, ist aus *Streptomyces hydrogenans* (1,2) nach einem Isolierungsverfahren von Hübener & Sahrholz (3) gewonnen worden.

Die  $20\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase-Aktivität des Enzyms katalysiert die Reduktion der 20-Oxogruppe der C<sub>21</sub>-Steroide. Diese Reaktion verläuft einheitlich bei Gegenwart von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleo-

tid (NADH) unter Bildung von  $20\beta$ -Hydroxysteroiden. Die Spezifität des Enzyms gegenüber C<sub>21</sub>-Steroiden erstreckt sich sowohl auf die C<sub>20</sub>-Position der Oxogruppe als auch auf den sterischen Verlauf der Reaktion in  $\beta$ -Stellung (4).

Die  $3\alpha$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase-Aktivität des Enzyms katalysiert die Oxidation der  $3\alpha$ -Hydroxygruppe von C<sub>19</sub>-Steroiden der  $5\alpha$ -Androstanreihe bei Gegenwart von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD).

Neben den üblichen chemischen Gruppenreaktionen (6) besteht somit auch ein enzymatischer Gruppennachweis von Steroiden.

Die vorliegende Untersuchung ist als Grundlage für eine spätere klinisch-chemische Anwendung gedacht.

## Material und Methoden

Alle untersuchten Steroide (Tab. 1) wurden von der Firma Ikapharm Ltd., Ramat-gan, Israel, bezogen. Der Reinheitsgrad der Steroide wurde dünn-schichtchromatographisch überprüft.

Die Pyridinnucleotide NADH und NAD sowie das Enzym wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen.

Die übrigen Chemikalien waren von der Firma E. Merck, Darmstadt.

### Herstellung der Lösungen

(in Anlehnung an *Staib* (7)):

1. Tris/HCl-Puffer (0,05 mol/l), pH 7,3):  
6,5 g Tris-hydroxymethyl-aminomethan in etwa 900 ml dest. Wasser lösen, pH 7,3 mit Salzsäure einstellen und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.
2. Glycerin-Puffer-Gemisch (1+1/V+V):  
jeweils der Tagesbedarf wird aus Glycerin (doppelt destilliert) und Lösung 1 nach angegebenem Mischungsverhältnis hergestellt.
3. a) NADH-Lösung (15 mmol/l NADH): 10,5 mg NADH-Dinatriumsalz in 1 ml Lösung 1 lösen.  
b) NAD-Lösung (15 mmol/l NAD): 10 mg NAD in 1 ml Lösung 1 lösen.
4. Steroid-Standardlösungen:  
3 mg des zu prüfenden Steroids in 1 ml abs. Ethanol lösen.
5. 3 $\alpha$ , 20 $\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase (Boehringer Mannheim, Art. Nr. 15339): 5 mg Enzymprotein in 1 ml Ammoniumsulfat-Lösung (2,2 mol/l) suspendiert (spezifische Aktivität etwa 22 U/mg).  
Die Enzymsuspension zeigte innerhalb von 6 Monaten keinen Aktivitätsverlust.

### Arbeitsweise

Die Reaktionsansätze erfolgen in Mikrotrogküvetten mit 10 mm Schichtdicke. Die Meßtemperatur beträgt 25°C. Für die Messungen benutzen wir ein selbständig registrierendes Photometer Eppendorf mit sechsfach-Küvettenwechsellautomatik und Registriereinheit. Die Meßstrahlung ist 334 nm oder 365 nm. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt gegen Luft. Die Reaktionsabläufe werden über die NADH-Abnahme bzw. die NADH-Zunahme gemessen.

Das Enzym enthielt geringe Mengen einer NADH-Oxidase-Aktivität. Der hierdurch entstehende NADH-Verbrauch wird bei allen Untersuchungen durch einen Leeransatz, der keine Steroide enthält, gesondert gemessen.

Für den Hauptansatz (Probenwert) werden nacheinander in eine Küvette pipettiert:

1000 $\mu$ l Glycerin-Puffer-Gemisch	(Lösung 2),
20 $\mu$ l NADH-Lösung	(Lösung 3 a),
bzw.	
NAD-Lösung	(Lösung 3 b),
10 $\mu$ l Steroid-Lösung	(Lösung 4*)
mischen,	
Extinktion $E_{t=0}$ ablesen,	
5 $\mu$ l Enzymsuspension	(Lösung 5).

Für den Leeransatz (Probenleerwert) werden nacheinander in eine Küvette pipettiert:

1000 $\mu$ l Glycerin-Puffer-Gemisch	(Lösung 2),
20 $\mu$ l NADH-Lösung	(Lösung 3 a),
10 $\mu$ l abs. Ethanol (statt Lösung 4),	mischen,
Extinktion $E_{t=0}$ ablesen,	
5 $\mu$ l Enzymsuspension	(Lösung 5).

\* Für die Ansätze entsprechend den gewünschten Einwaagen verdünnt mit abs. Ethanol.

Tab. 1. Übersicht der in der Arbeit benutzten Nomenklatur der Steroide

Trivialbezeichnung	chemische Bezeichnung	Symbol
Progesteron	4-Pregnen-3, 20-dion	
Pregnandiol	3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan	
Cortisol	11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-4-pregnen-3, 20-dion	F
Tetrahydrocortisol	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on	THF
allo-Tetrahydrocortisol	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on	allo-THF
Cortison	17 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3, 11, 20-trion	E
Tetrahydrocortison	3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11, 20-dion	THE
Reichstein's Compound S	17 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3, 20-dion	S
Tetrahydro-Reichstein's Compound S	3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on	THS
Corticosteron	11 $\beta$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3, 20-dion	B
Tetrahydrocorticosteron	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on	THB
allo-Tetrahydrocorticosteron	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on	allo-THB
Desoxycorticosteron	21-Hydroxy-4-pregnen-3, 20-dion	DOC
Tetrahydrodesoxycorticosteron	3 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3, 20-dion	THDOC
11-Dehydrocorticosteron	21-Hydroxy-4-pregnen-3, 11, 20-trion	A
Tetrahydro Compound A	3 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11, 20-dion	THA
$\beta$ -Cortolon	3 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 20 $\beta$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11-on	
Testosteron	17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-on	
Androsteron	3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	
Epiandrosteron	3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	
11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	
11 $\alpha$ -Hydroxyandrosteron	3 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on	
11-Oxoandrosteron	3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-11, 17-dion	
$\Delta$ 4-Androstendion	4-Androsten-3, 17-dion	
Dehydroepiandrosteron	3 $\beta$ -Hydroxy-5(10)-androsten-17-on	DHA
Ätiocholanolon	3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on	
11 $\beta$ -Hydroxyätiocholanolon	3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on	
11-Oxoätiocholanolon	3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-11, 17-dion	
17 $\beta$ -Hydroxyätiocholan-3-on	17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$ -androstan-3-on	
Ätiocholan-3, 11, 17-trion	5 $\beta$ -Androstan-3, 11, 17-trion	
Östron	3 $\beta$ -Hydroxy-1, 3, 5(10)-östratrien-17-on	
Östriol	1, 3, 5(10)-Östratrien-3, 17 $\beta$ , 16 $\alpha$ -triol	
17 $\beta$ -Östradiol	1, 3, 5(10)-Östratrien-3, 17 $\beta$ -diol	
Dexamethason	9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon	

Schaumbildung ist beim Rühren zu vermeiden, Schlieren müssen vollständig beseitigt sein. Vier Stunden nach Zumischen der Enzymsuspension (Lösung 5) zum Haupt- und Leeransatz werden die Extinktionen im Haupt- und Leeransatz (HW + LW) wieder gemessen,  $E_{t=240 \text{ min}}$  (Probe) und  $E_{t=240 \text{ min}}$  (Probenleerwert). Diese lange Meßzeit wurde von uns gewählt, um auch die Substratumsätze mit sehr langer Reaktionsdauer zu erfassen.

Die Berechnung des Substratumsatzes erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\Delta E_{t=240 \text{ min}}}{\epsilon \cdot d} = \mu \text{ mol/ml Steroid im Ansatz}$$

In dieser Formel bedeuten:

$$\Delta E_{t=240 \text{ min}} = [E_{t=0 \text{ min. (Probe)}} - E_{t=240 \text{ min. (Probe)}}] - [E_{t=0 \text{ min. (Probenleerwert)}} - E_{t=240 \text{ min. (Probenleerwert)}}]$$

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ] von NADH  
bei 334 nm = 6,18  
bei 365 nm = 3,4

$d$  = Schichtdicke der Küvette  
= 1 cm

Der Umrechnung von  $\mu\text{mol}$  Steroid/Ansatz in  $\mu\text{g}$  Steroid/Ansatz werden die Molekulargewichte der Steroide zugrundegelegt.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Reduktion der 20-Oxosteroide verläuft bei Gegenwart von NADH unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen einheitlich unter Bildung von 20 $\beta$ -Hydroxysteroiden. Bei Verwendung von NAD wurden keine Extinktionsänderungen gemessen. Das Gleichgewicht der Reaktion mit NADH liegt für die geprüften 20-Oxosteroide auf der Seite der Hydrierungsprodukte (Tab. 2). Aus dem gemessenen NADH-Verbrauch errechnete sich stets ein weitgehend äquimolarer Substratumsatz. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch das Enzym unter den gegebenen Reaktionsbedingungen von 20-Oxosteroiden ausschließlich die 20-Oxogruppe reduziert wird. Die Oxidation der 3 $\alpha$ -Hydroxygruppe von 20-Oxosteroiden der 5 $\alpha$ -Pregnanreihe wird bei Gegenwart von NAD durch das Enzym nicht katalysiert.

Die von uns untersuchten Verbindungen 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on und 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on ergaben unter den bestehenden Testbedingungen Extinktionsänderungen, die darauf schließen lassen, daß nur die 20-Oxogruppe der Steroide mit NADH umgesetzt wurde. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Mitteilungen von Pocklington & Jeffery (5).

Der Substratumsatz war unter den beschriebenen Bedingungen in Konzentrationen zwischen 10 und 80  $\mu\text{mol/l}$  20-Oxosteroid vollständig und linear (Abb. 1).

Der Variationskoeffizient lag bei 10-fach-Messungen zwischen 3 und 10%. Corticosteron und Tetrahydrocorticosteron haben in der jeweils höchsten Substratkonzentration in unseren Versuchen nicht die Soll-Extinktionsänderungen erreicht. Diese Abweichungen sind durch einen vorzeitigen Abbruch der Reaktion zu erklären.

Tab. 2. Substratspezifität der 3 $\alpha$ -, 20 $\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase und die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nötige Reaktionszeit bis zum Reaktionsstillstand.

	gemessener Substratumsatz mit		Zeitpunkt des ermittelten Reaktionsstillstandes in Minuten
	NAD	NADH in %	
Progesteron	0	100	
Pregnandiol	0	0	
Cortisol	0	100	9
Tetrahydrocortisol	0	95	15
allo-Tetrahydrocortisol	0	100	15
Cortison	0	98	9
Tetrahydrocortison	0	100	15
Reichstein's Compound S	0	98	3
Tetrahydro-Compound S	0	100	9
Corticosteron	0	100	45
Tetrahydrocorticosteron	0	98	210
allo-Tetrahydrocorticosteron	0	100	60
Desoxycorticosteron	0	98	9
Tetrahydrodesoxycorticosteron	0	100	
11-Dehydrocorticosteron	0	100	30
Tetrahydro Compound A	0	100	30
$\beta$ -Cortolon	0	0	
Testosteron	0	0	
Androsteron	27	0	30
Epiandrosteron	0	0	
11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron	16	0	180
11 $\alpha$ -Hydroxyandrosteron	18	0	180
11-Oxoandrosteron	32	0	174
$\Delta^4$ -Androstendion	0	0	
Dehydroepiandrosteron	0	0	
Ätiocholanolon	0	0	
11 $\beta$ -Hydroxyätiocholanolon	0	0	
11-Oxoätiocholanolon	0	0	
Ätiocholan-3, 11, 17-trion	0	0	
Östron	0	0	
Östriol	0	0	
17 $\beta$ -Östradiol	0	0	
9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon	0	0	
11 $\beta$ -Hydroxyätiocholan-3-on	0	0	

Mit steigender Substratkonzentration pro Ansatz verlängert sich die Reaktionszeit bis zum Endpunkt der Reaktion bei den Steroiden, die eine verhältnismäßig langsame Reaktionsgeschwindigkeit haben, besonders deutlich. Die Reaktion wurde hier schon drei Stunden nach Reaktionsstart abgebrochen, für die höhere Konzentration von Tetrahydrocorticosteron zu früh (Abb. 2, 3).

Die Geschwindigkeit der Reduktion der 20-Oxogruppe [Schmidt-Thomè et al. (4), Gibb & Jeffery (8, 9, 10)] wird durch Substituenten in den verschiedenen Positionen dieser Steroide beeinflusst (Tab. 2). Die Reaktionsgeschwindigkeit wird beschleunigt durch: eine 17 $\alpha$ -Hydroxygruppe, eine 11-Oxogruppe, eine 3-Oxo- $\Delta^4$ -Konfiguration.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird herabgesetzt durch: eine 11-Hydroxygruppe, fehlende 17 $\alpha$ -Hydroxygruppe.

Auch die *cis-trans*-Isomerie der Ringe A und B ist nicht ohne Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ ,

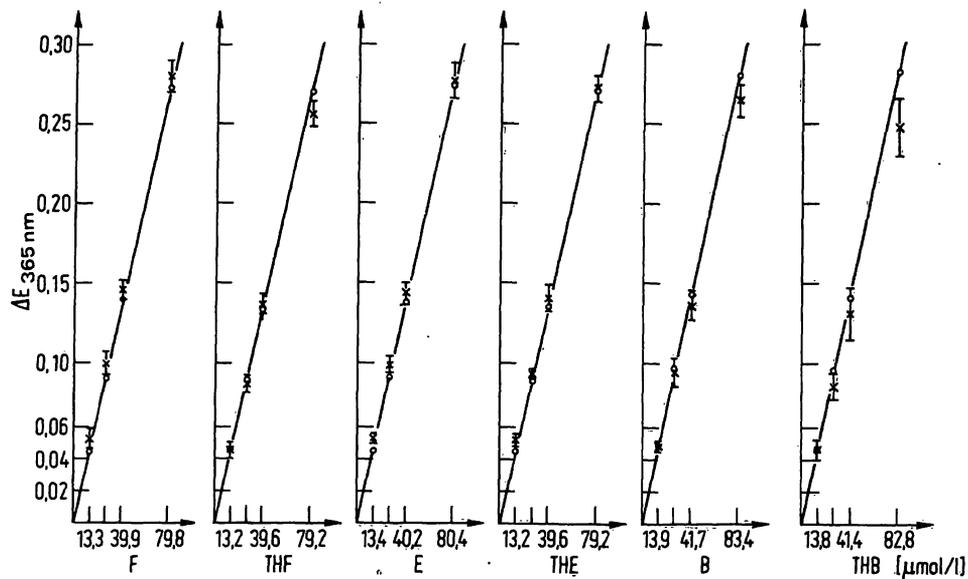


Abb. 1. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der gefundenen  $\Delta E$ -Werte ( $E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$ ) mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener 20-Oxosteroide gemessen bei 365 nm.

Die durch eine Linie verbundenen Kreise zeigen die bei äquimolarem Substratumsatz aus der Substratkonzentration im Ansatz zu erwartenden  $\Delta E$ -Werte.

- F:  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion  
 THF:  $3\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on  
 E:  $17\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion  
 THE:  $3\alpha$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11,20-dion  
 B:  $11\beta$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion  
 THB:  $3\alpha$ ,  $11\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on

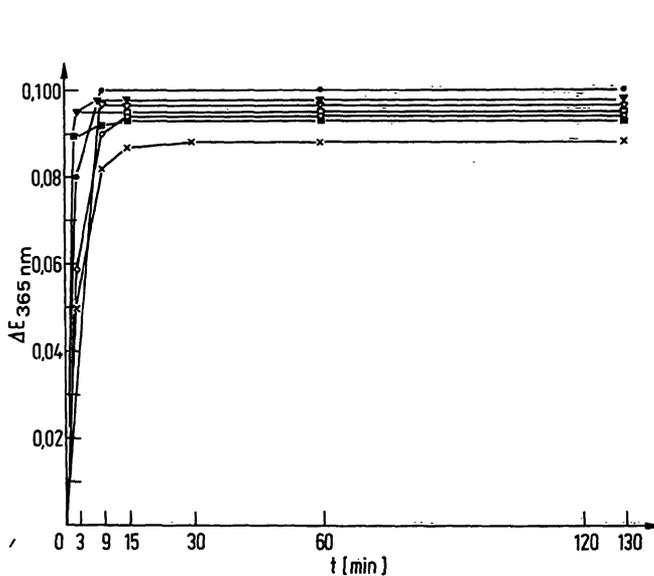


Abb. 2. Darstellung des Substratumsatzes ( $\Delta E$  ( $E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$ )) der 17-Hydroxy-20-oxosteroide, gemessen bei 365 nm.

- $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
- $3\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on
- ▼—▼  $17\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion
- $17\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
- ×—×  $3\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on
- ▽—▽  $3\alpha$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on
- $3\alpha$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11,20-dion

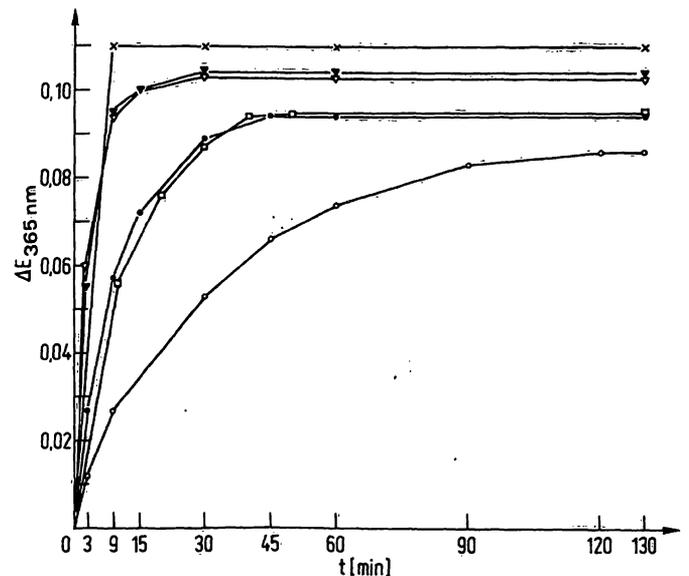


Abb. 3. Darstellung des Substratumsatzes ( $\Delta E$  ( $E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$ )) der 17-Desoxy-20-oxosteroide, gemessen bei 365 nm.

- $11\beta$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
- $3\alpha$ ,  $11\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on
- ▼—▼ 21-Hydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion
- $3\alpha$ ,  $11\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on
- ×—× 21-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion
- ▽—▽  $3\alpha$ , 21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11,20-dion

21-Trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-on wird nach unseren Beobachtungen schneller als Tetrahydrocortico-steron umgesetzt.

Unter standardisierten Reaktionsbedingungen kann unter Umständen die Umsatzgeschwindigkeit der 20-Oxosteroide als eine Funktion der funktionellen Gruppen angesehen werden.

Der Umsatz der 20-Oxosteroide mit NADH läßt sich durch eine logarithmische Funktion beschreiben. Die Reaktion kann durch die Gleichung

$$y = a \cdot b^t$$

ausgedrückt werden.

Trägt man die Konzentrationsabnahme von NADH ( $\Delta E$ ) gegen die Zeit auf, so ergibt sich die Möglichkeit einer graphischen Darstellung, in der die logarithmische Beziehung des Reaktionsablaufes zum Ausdruck gebracht werden kann. Dabei wird die Konzentrationsabnahme logarithmisch auf der Ordinate und die Zeit linear auf der Abszisse aufgetragen. Es ergibt sich eine Gerade (Abb. 4).

In Gemischen verschiedener 20-Oxosteroide pro Ansatz bestimmt das Substrat mit der langsamsten Reaktionsgeschwindigkeit die Analysenzeit. Unter unseren Ana-

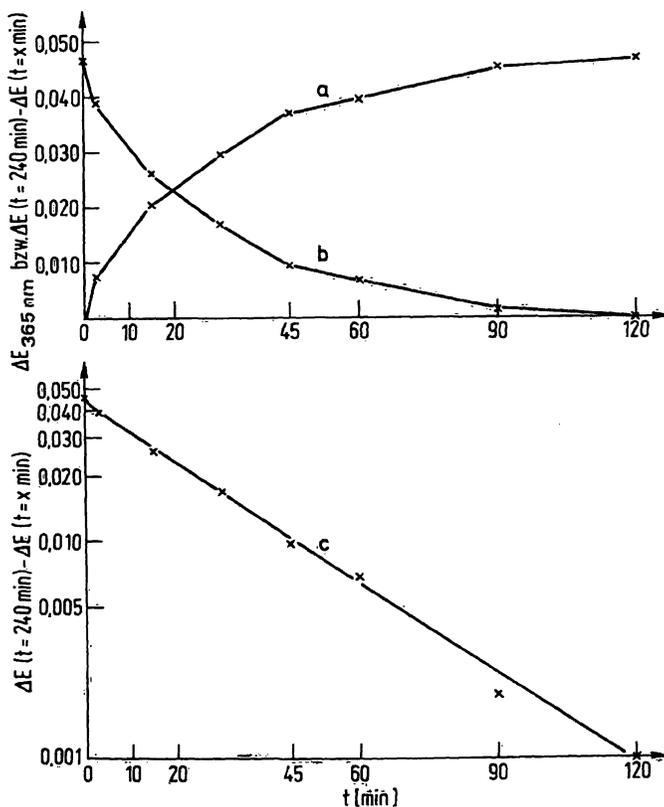


Abb. 4. Graphische Darstellung des Substratumsatzes am Beispiel THB

- a)  $\Delta E$  ( $E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$ )  
 b)  $\Delta E$  ( $t=240 \text{ min}$ ) -  $\Delta E$  ( $t=x \text{ min}$ )  
 c) wie b), Ordinate jedoch im logarithmischen Maßstab.

lysenbedingungen hat sich eine Reaktionszeit von 4 Stunden als zweckmäßig erwiesen. Es sind dann auch extreme Substratkonstellationen aus Gemischen von 20-Oxosteroiden quantitativ erfassbar.

Ansätze, in denen gleichzeitig verschiedene 20-Oxosteroide umgesetzt werden, zeigen, daß sich die Substrate gegenseitig nicht beeinflussen (Abb. 5). Die Konzentration an 20-Oxosteroiden pro Ansatz wurde in den angeführten Beispielen (Abb. 5) von Ansatz zu Ansatz um ein weiteres Substrat erhöht. Die gemessenen Substratumsetzungen blieben stets äquimolar. Die Reaktionszeiten der Gemische bis zum vollständigen Substratumsatz werden durch die Anwesenheit von Corticosteron und schließlich durch Tetrahydrocortico-steron charakteristisch beeinflusst.

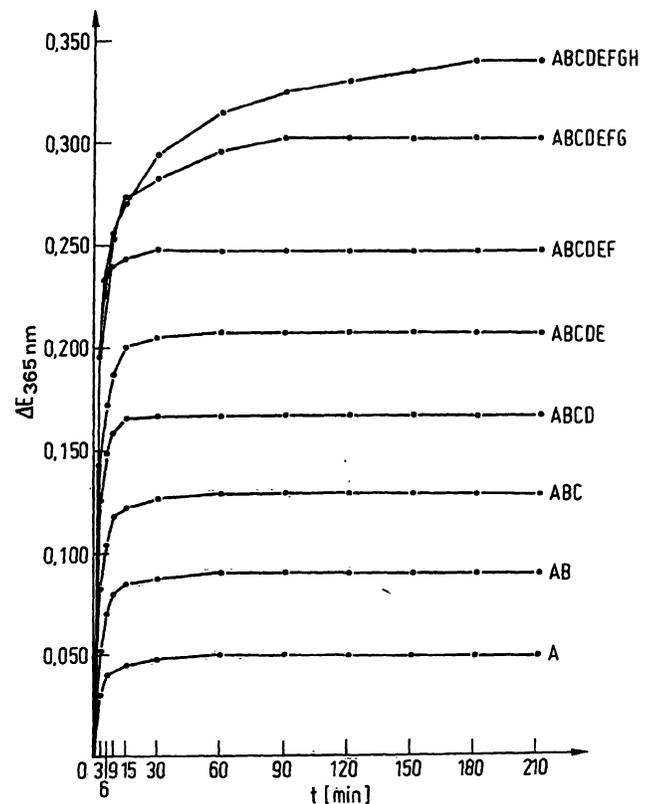


Abb. 5. Einfluß einzelner 20-Oxosteroide in Substratgemischen auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes.

$\Delta E$  ( $E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$ ), gemessen bei 365 nm.

Konzentrationen im Ansatz:

- A = 13,3  $\mu\text{mol/l}$  11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion  
 B = 13,2  $\mu\text{mol/l}$ , 3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Tetrahydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on  
 C = 13,4  $\mu\text{mol/l}$  17 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion  
 D = 13,2  $\mu\text{mol/l}$  3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-11,20-dion  
 E = 14,6  $\mu\text{mol/l}$  21-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion  
 F = 14,4  $\mu\text{mol/l}$  3 $\alpha$ , 21-Dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3,20-dion  
 G = 13,9  $\mu\text{mol/l}$  11 $\beta$ , 21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion  
 H = 13,8  $\mu\text{mol/l}$  3 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 21-Trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on

Die Substratumsatzgeschwindigkeit läßt sich durch Steigerung der Enzymmenge erhöhen.

Die  $3\alpha$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase-Aktivität des Enzyms ist von *Pocklington & Jeffery* (5) sowie von *Gibb & Jeffery* (8, 9, 10) ausführlich untersucht worden. Von den von uns untersuchten C<sub>19</sub>-Steroiden (Tab. 2) reagierten nur Androsteron, 11-Oxo-androsteron, 11 $\alpha$ -Hydroxy-androsteron und 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron mit NAD. Die gefundenen Umsätze waren nicht äquimolar. Aus dem ermittelten  $\Delta E$  bei erreichtem Reaktionsstillstand errechnete sich eine Fraktion für den Substratumsatz von 0,16 bis 0,32 der eingewogenen Substratmenge.

Die NADH-Oxidase-Aktivität der Enzymsuspension ist bei diesen Angaben nicht berücksichtigt. Die Sauerstofffunktion am C<sub>11</sub> der  $3\alpha$ -Hydroxy- $5\alpha$ -androsterinderivate setzt offenbar die Reaktionsgeschwindigkeit bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes herab (Tab. 2). Androsteron zusätzlich neben 20-Oxosteroiden als Reaktionspartner im Bestimmungsansatz beeinflusst den meßbaren NADH-Verbrauch charakteristisch. In Modellversuchen mit Androsteron und Tetrahydrocortison (Abb. 6) nimmt scheinbar mit steigendem Androsterongehalt der Umsatz an Tetrahydrocortison ab. Darüber hinaus scheint mit steigendem Tetrahydrocortison-Anteil bei gleichbleibendem Androsteron-Anteil der gleiche Effekt aufzutreten. Wir interpretieren diese Beobachtung als Ergebnis der Wirkung beider Enzymaktivitäten auf die beiden im Ansatz vorhandenen Substrate. Das bei der Reduktion der 20-Oxogruppe unter dem Einfluß der  $20\beta$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase-Aktivität des Enzyms gebildete NAD wird unter dem Einfluß der  $3\alpha$ -Hydroxysteroid:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase-Aktivität durch Oxidation der  $3\alpha$ -Hydroxygruppe des Androsterons teilweise wieder reduziert. Die meßbaren Extink-

tionsänderungen in diesen Gemischen sind als Resultante beider Enzymaktivitäten und des sich einpendelnden Reaktionsgleichgewichtes zu verstehen.

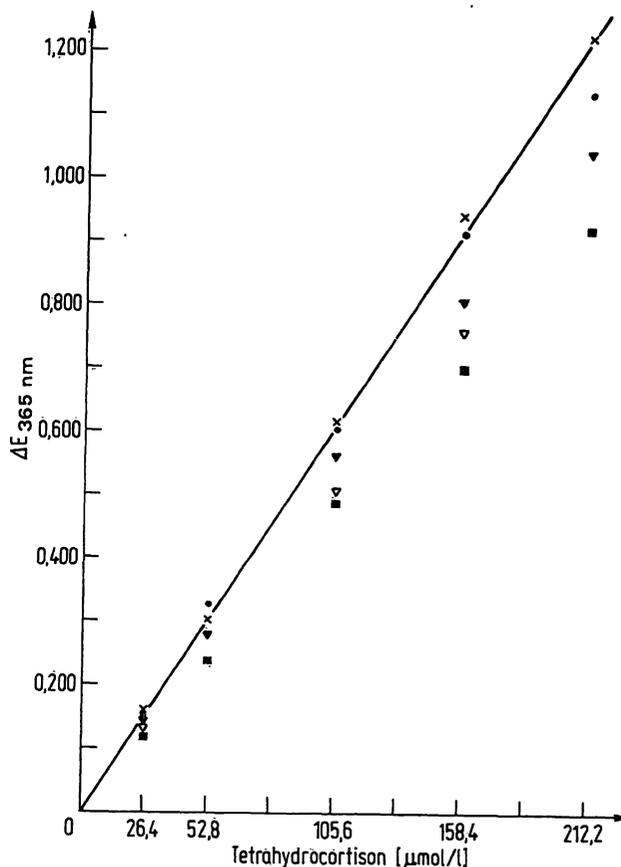


Abb. 6. Der störende Effekt von Androsteron auf den meßbaren Umsatz von THE ( $\Delta E$ ).

Konzentration von Androsteron im Ansatz:

- 66,4  $\mu\text{mol/l}$
- ▲ 132,8  $\mu\text{mol/l}$
- △ 199,2  $\mu\text{mol/l}$
- ◊ 265,6  $\mu\text{mol/l}$

## Literatur

1. Neemann, G., Hübener, H. J., Junk, R. & Schmidt-Thomè, J. (1960), *Biochem. Z.* 333, 88–94.
2. Neemann, G., Hübener, H. J. & Schmidt-Thomè, J. (1962), *Biochem. Z.* 336, 329–333.
3. Hübener, H. J. & Sahrholz, F. G. (1960), *Biochem. Z.* 333, 95–105.
4. Schmidt-Thomè, J., Neemann, G., Hübener, H. J. & Alester, I. (1962), *Biochem. Z.* 336, 322–328.
5. Pocklington, T. & Jeffery, J. (1968), *Eur. J. Biochem.* 7, 63–67.
6. Oertel, G. W. (1962), *Chemische Bestimmungen von Steroiden im menschlichen Urin*. Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
7. Staib, W. (1974), in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1905–1911, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
8. Gibb, W. & Jeffery, J. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 268, 13–20.
9. Gibb, W. & Jeffery, J. (1971), *Eur. J. Biochem.* 23, 336–342.
10. Gibb, W. & Jeffery, J. (1972), *Eur. J. Biochem.* 25, 136–140.

Dr. med. Rolf Allner  
6400 Fulda  
Städt. Krankenhaus  
Edelzeller Str. 4