

the ferritin levels at the optimal cut-off value were 85.7 and 83.3% respectively. When the meningitis patients were left out, specificity increased to 94.4%. Judgement of the values of free haemoglobin or bilirubin (one or both elevated) gave a sensitivity of 100% in the same group, however specificity was 66.7% (after leaving out the meningitis patients 72.2%).

Ferritin levels in the CSF therefore are mainly useful to confirm the diagnosis of a haemorrhage in the brain, not to exclude the diagnosis.

*Keywords: central nervous system haemorrhage; cerebrospinal fluid; ferritin; free haemoglobin; bilirubin*

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 58-66

## Karakterisering en partiële klonering van isovormen van steroid 5 $\alpha$ -reductase type I en type II bij de hond

P.N. SPAN<sup>1</sup>, A. van BOKHOVEN<sup>2</sup>, A.G.H. SMALS<sup>3</sup>, J.A. SCHALKEN<sup>2</sup> en C.G.J. SWEEP<sup>1</sup>

Zowel bij de mens als de hond is 5 $\alpha$ -reductase, het enzym dat testosteron omzet in dihydrotestosteron (DHT), betrokken bij de pathogenese van benigne prostaat hyperplasie. De hond wordt dan ook beschouwd als een geschikt model om de effecten van 5 $\alpha$ -reductase remmers op prostaatgroei te testen. Echter, in tegenstelling tot bij de mens is er bij de hond geen informatie beschikbaar over het bestaan of de karakteristieken van 5 $\alpha$ -reductase isozymen. Daarom werden de biochemische karakteristieken van 5 $\alpha$ -reductase enzymatische activiteit in de prostaat van de hond geëvalueerd en werden isovormen van 5 $\alpha$ -reductase type I en type II gekloneerd. Zowel de pH gevoeligheid, enzym-kinetische karakteristieken en gevoeligheid voor remming door twee van de drie geteste 5 $\alpha$ -reductase remmers, specifiek in de mens, wezen op een grote overeenkomst tussen 5 $\alpha$ -reductase isozymen bij de mens en de hond. Uit de prostaat van de hond werden twee cDNA's gekloneerd welke een hoge mate van homologie met de humane 5 $\alpha$ -reductase isovormen bleken te hebben. Vergelijking van de weefsel-specificiteit echter gaf aan dat er geen verband was tussen 5 $\alpha$ -reductase mRNA expressie niveau en -enzymactiviteit in diverse hondenweefsels. Deze resultaten benadrukken dat de hond een geschikt model is voor studies naar de rol van 5 $\alpha$ -reductase in neoplasmen van de prostaat, maar dat de specificiteit van 5 $\alpha$ -reductase-remmers a priori nagegaan moet worden voor een correcte evaluatie van resultaten.

*Trefwoorden: 5 $\alpha$ -reductase; prostaat; BPH; steroiden; isozymen*

Afdeling Chemische Endocrinologie<sup>1</sup>, Urologisch Research Laboratorium<sup>2</sup>, Afdeling Endocriene Ziekten<sup>3</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen St Radboud

Correspondentie: Dr. P.N. Span, Afdeling Chemische Endocrinologie 530, Academisch Ziekenhuis Nijmegen St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
E-mail: p.span@ace.azn.nl

Dihydrotestosteron (DHT) wordt beschouwd als het belangrijkste androgeen betrokken bij de pathogenese van Benigne Prostaat Hyperplasie (BPH) (1,2), een veel voorkomende aandoening bij oudere mannen die kan leiden tot mictie problemen. De vorming van DHT uit testosteron (T) wordt gekatalyseerd door het enzym 5 $\alpha$ -reductase (3-oxo-5 $\alpha$ -steroid-oxidoreductase, E.C. 1.3.1.22), waarvan twee isozymen, type I en type II, bestaan (3). Er is veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van 5 $\alpha$ -reductase remmers voor de farmacologische behandeling van BPH, om zo de groeibevorderende werking van androgenen op de prostaat tegen te gaan (2-6). Finasteride (Proscar®), een specifieke enzymremmer van het humane type II isozym, is geregistreerd voor de behandeling van patiënten met BPH (2) en wordt onderzocht voor mogelijke effecten op prostaatkanker (7).

De hond kan, net als de mens, bij het ouder worden spontaan BPH ontwikkelen (1,8-11). DHT lijkt een etiologische factor in de pathogenese van BPH in beide species te zijn (1,2,8,12,13). Bij de hond is een directe correlatie tussen de weefselconcentratie van DHT en de grootte van de prostaat beschreven (13). De hond wordt daarom vaak gebruikt als in vivo model om de rol van 5 $\alpha$ -reductase en de effecten van isozym-specifieke remmers op de pathologische groei van de prostaat te onderzoeken (4,5,13-19). Er is echter weinig informatie over het bestaan en karakteristieken van mogelijke isovormen van 5 $\alpha$ -reductase bij de hond. Hierdoor is de specificiteit van de geteste 5 $\alpha$ -reductase remmers bij de hond niet bekend en is juiste interpretatie van hun effecten op prostaatgroei moeilijk.

Deze studie was erop gericht de kinetische karakteristieken van 5 $\alpha$ -reductase in de prostaat van de hond te onderzoeken, door middel van een eerder gevalideerde en beschreven assay (20,21). De effecten van drie verschillende humane isozym-specifieke remmers op de enzymactiviteit werd vervolgens *in vitro* geëvalueerd in prostaathomogenaten van de hond (22). Verder werden bij de hond de isovormen gekloneerd door middel van een gedegeneerde primer strategie.

Tenslotte werd de weefsel  $5\alpha$ -reductase activiteit gecorreleerd met de expressie van de beide isozymen. Deze studie leidt tot een beter inzicht in overeenkomsten en verschillen tussen  $5\alpha$ -reductase van mens en hond, en tot een betere rationale voor het gebruik van de hond als model systeem voor prostaat hyperplasie en BPH behandeling met differentiële  $5\alpha$ -reductase remming.

## MATERIAAL en METHODEN

[1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]Testosteron (3,74 TBq/mmol) en [ $1\alpha,2\alpha$ (n)- $^3\text{H}$ ]17 $\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstaan-3-on (2,00 TBq/mmol) werden verkregen van Amersham (Amersham, U.K.) en [9,11- $^3\text{H}$ ]5 $\alpha$ -androstaan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (1,48 TBq/mmol) van Du Pont-New England Nuclear (Boston, MA). Alle radioactief gelabelde steroïden werden vóór gebruik gezuiverd met high performance liquid chromatography (HPLC, vide infra). Testosteron (T) werd verkregen van Steraloids (Wilton, NH). Diethylether (p.a.), n-hexaan (LiChrosolv) en 2-propanol (LiChrosolv) werden gekocht bij Merck (Darmstadt, Duitsland). Alle andere chemicaliën waren van analytische zuiverheid. De humane  $5\alpha$ -reductase type II remmer Finasteride (17 $\alpha$ -(*N*-tert-butylcarbonyl)-4-aza- $5\alpha$ -androst-1-*en*-3-on, MK906, Proscar®) en de type I remmer MK386 (4,7 $\beta$ -dimethyl-4-aza- $5\alpha$ -cholestaan-3-on) waren giften van de Merck, Sharp and Dohme Corp. (Rahway, NJ). De humane type I remmer LY306089 ((+)(4aR)(10bR)-8,9-dichloro-4,10b-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,10b-octahydrobenzo[*f*]quinoline-3-on) was een gift van Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN).

### Weefsels

Weefsels (zie resultaten) werden verzameld van mannelijke Beagles (5 jaar oud) van het Centrale Dieren Laboratorium (CDL) van de Katholieke Universiteit van Nijmegen. Deze weefsels werden ontdaan van vet en bindweefsel en in vloeibare stikstof verpulverd met behulp van een microdismembrator (Braun). Dit poeder werd gebruikt voor RNA extractie en bepaling van  $5\alpha$ -reductase enzymatische activiteit. Totaal RNA werd geëxtraheerd uit ongeveer 100 mg weefsel poeder door middel van de LiCl/Ureum methode.

### $5\alpha$ -reductase assay

De methode voor het meten van  $5\alpha$ -reductase enzymatische activiteit werd gevalideerd en beschreven door Span et al. (20,21). Weefsels werden gehomogeniseerd in 20 mM Tris (2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol, Merck) / citraat monohydraat (Merck), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck), 50  $\mu\text{M}$  NADPH (Boehringer, Mannheim, Duitsland), 0,2 M sucrose (Merck) en 1 mM monothioglycerol (3-mercapto-1,2-propaandiol, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), pH 7,0. Homogenaten werden gecentrifugeerd bij 200xg en het verkregen supernatant werd vervolgens nogmaals bij 106.000xg gecentrifugeerd om een membraan preparaat te verkrijgen voor verdere experimenten. De incubatie buffer was een 200 mM Tris-citraat buffer zoals boven beschreven, aangevuld met 2 mM NADPH, pH 7,0 of pH 4,0 tot 9,0. Radioactief

gelabeld T werd isotopisch verdund tot een reeks van 1,8 nM tot 2,4  $\mu\text{M}$  in Pyrex kweekbuizen (borosilicaat, 12x75 mm, Corning Inc., Corning, NY) in incubatiebuffer. Vervolgens werden deze mengsels voorverwarmd tot 37°C in een schudwaterbad. Remmers van  $5\alpha$ -reductase activiteit werden vanuit "stock"-oplossingen in ethanol (van 1 tot 10.000 nM eindconcentratie) tegelijk met T toegevoegd. Veertig of 80  $\mu\text{l}$  van het enzympreparaat (0,2 tot 0,8 mg eiwit) en de juiste hoeveelheid cofactor (NADPH, 2 mM eindconcentratie) werd aangevuld tot 100  $\mu\text{l}$  met incubatie buffer en toegevoegd aan de buizen met substraat om de incubatie te starten. Na 60-120 minuten werd de incubatie beëindigd door toevoeging van 100  $\mu\text{l}$  1 M NaOH, waarna de metabolieten werden geëxtraheerd met 4 ml ijskoude diethylether. Geëxtraheerde metabolieten werden na droogdampen van de etherfractie gereconstitueerd in 100  $\mu\text{l}$  hexaan voor HPLC.

### HPLC

Gemetaboliseerde steroïden werden gescheiden op een Hibar LiChrosorb Diol-kolom (lengte 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Merck), met een guard-kolom (Resolve Silica, Waters Corp., Milford, MA). Het HPLC-systeem bestond uit een Waters 610 Fluid Unit, een Waters 600E System Controller en een Waters U6K-injector. De isocratische flow van de mobiele fase (hexaan / isopropanol 96:4, v/v) was 1,5 ml/min. Radioactiviteit werd gemeten met behulp van een FloOne Beta Radiomatic A500 radio-chromatografie detector (Packard-Canberra Benelux, Tilburg, Nederland) met een 500  $\mu\text{l}$  cel en een vloeibare scintillatie flow van 1,5 ml/min (Aqua-Luma, Lumac-LSC, Olen, België). Het percentage gevormd DHT en  $5\alpha$ -androstaan-3 $\alpha$ ( $\beta$ ), 17 $\beta$ -diol werd gebruikt om de  $5\alpha$ -reductase activiteit te bepalen.

### Berekening van Enzym Karakteristieken

Geschatte omzettingssnelheden werden geplotted tegen T-concentraties, en  $K_m$  en  $V_{max}$  werden berekend met een non-lineaire regressie methode tot kleinste kwadraten, gebaseerd op een Michaelis-Menten vergelijking voor twee onafhankelijke isozym-activiteiten, met het computer programma Enzfitter. Een Eadie-Scatchard plot van enzym snelheid gedeeld door substraatconcentratie ( $V/S$ ) tegen snelheid ( $V$ ) werd gebruikt, omdat deze het meest geschikt is om isozymactiviteiten te detecteren (23). De  $V_{max}/K_m$  ratio werd berekend omdat deze overeenkomt met de enzymatische activiteit bij substraatconcentraties veel lager dan de  $K_m$ , hetgeen meer overeenkomt met de in vivo situatie (24,25).  $IC_{50}$ 's werden berekend door interpolatie van plots van gemiddelde enzymatische activiteit tegen remmerconcentratie.

### Klonering van $5\alpha$ -reductase isozym mRNA

Totaal RNA (2  $\mu\text{g}$ ) van een hondenprostaat werd met DNase-I behandeld en een cDNA synthese werd uitgevoerd met behulp van random hexameren (Boehringer Mannheim) en Reverse Transcriptase (Superscript RNase H-, GIBCO BRL, Life Technologies Inc.). Gedegeneerde primers werden gekozen gebaseerd op geconserveerde aminozuren in de C-termi-

nale regio's van humaan, aap en rat  $5\alpha$ -reductase en gebruikt voor PCR-amplificatie. PCR-producten werden gekloneerd in een TA-vectorsysteem (pcDNAII, Invitrogen). Nucleotide sequentie analyse werd verricht met behulp van Sequenase 2.0 (United States Biochemical). Positieve sequenties werden geïdentificeerd door computergeassisteerde database vergelijking. Specifieke primers gebaseerd op deze sequenties werden gebruikt om  $^{32}\text{P}$ -dATP-gelabelde probes te genereren en om een semi-kwantitatieve RT-PCR-assay op te zetten (zie RT-PCR).

### Northern blotting

Tien  $\mu\text{g}$  totaal RNA van honden- en humane prostaat werd gedenateerd met glyoxal, elektroforetisch gescheiden in 1% agarose gel en overgebracht op Hybond-N+ membraan (Amersham) door middel van capillaire blotting. Probes voor hond type I en type II  $5\alpha$ -reductase werden door middel van de random prime methode  $^{32}\text{P}$ -dATP gelabeld. De blots werden gehybridiseerd onder lage stringentie.

### RT-PCR

Totaal RNA (2  $\mu\text{g}$ ) van diverse weefsels (zie resultaten) werd met DNase-I behandeld en reverse getranscribeerd (zie klonering). RT-reacties werden gekwantificeerd door synchrone reacties met  $^{32}\text{P}$ -dATP. Specifieke primers voor het honden-type I isozym waren 5'-CTGAGGAATCTCCGAAAACC-3' (sense) en 5'-TCTCAAGGTACCACCGGTGAT-3' (antisense). Voor het type II isozym van de hond was de sense primer 5'-TCACTAGAGGGAGGCCTTTTC-3' en 5'-ACAAGCCACCTTGGAATC-3' de antisense. De standaard PCR-reactie bestond uit 35 cycli van 1 minuut/92°C, 1 minuut/55°C en 1 minuut/72°C in aanwezigheid van 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . De specificiteit van de reacties werd nagegaan met behulp van gebiotinyleerde interne probes (bio-5'-AGAAGGTGAAGAGAGCGAAGG-3' voor het type I en bio-5'-CCTGAGCTGGCGCAATATAT-3' voor het type II isozym) op blots van PCR-producten van hondenprostaat cDNA. Dit werd gevisualiseerd met streptavidine-biotine-HRP en ECL-detectie (Amersham). Standaarden van 0-25,6 pg insert (type I of type II gekloneerd in vector pcDNAII) werden gebruikt als kalibratoren (externe ijklijn) in dezelfde experimenten. Reactieproducten werden gescheiden en geanalyseerd met behulp van elektroforese in 1,5% agarose gels met ethidiumbromide. Voor elk weefsel werden aparte PCR-reacties verricht met GAPDH (een huishoudgen) specifieke primers (26), ter controle van het gebruik van vergelijkbare hoeveelheden cDNA.

### Eiwitmeting

Eiwitwaarden werden bepaald met een methode volgens Lowry et al. (27) waarbij bovine serum albumine (OHRD 20/21, Hoechst-Behring, Marburg, Duitsland) als standaard werd gebruikt. De assay was gemodificeerd voor microtiterplaten en had een sensitiviteit van 25  $\mu\text{g}$  per well.

### Statistiek

De statistische analyses (Analysis of Variance met post-hoc (Bonferroni) t-tests) werden uitgevoerd met

behulp van het SPSS statistische analyse programma versie 6.1.3 (SPSS Benelux bv, Gorinchem, Nederland). Verschillen worden als significant aangegeven bij  $p < 0,05$  (\*) of bij  $p < 0,01$  (\*\*). Waarden worden weergegeven als gemiddelde  $\pm$  sd.

## RESULTATEN

### Validatie

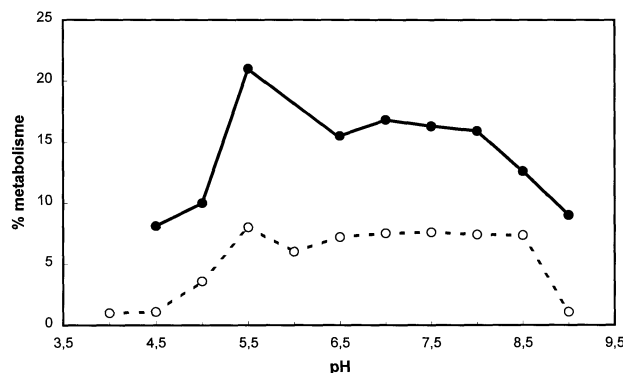
Alle initiële  $5\alpha$ -reductase enzymsnelheden werden geschat door incubatie van T met een enzympreparaat (0,2 – 0,8 mg totaal eiwit) bij 37°C gedurende 1 tot 2 uur. Onder deze omstandigheden was in de kinetische analyse experimenten het percentueel metabolisme van T nooit hoger dan 15%. Daar de mate van enzymatische omzetting van T evenredig was met zowel de hoeveelheid eiwit als met de incubatietijd, kunnen deze schattingen als betrouwbaar worden beschouwd.

### pH-afhankelijkheid

De pH-afhankelijkheid van de  $5\alpha$ -reductie van T in een homogenaat van hondenprostaat werd onderzocht bij pH 4,0 tot 9,0. Daar het pH-optimum van type II  $5\alpha$ -reductase afhankelijk is van de substraatconcentratie bij welke deze bepaald wordt (28), werd de pH-afhankelijkheid vastgesteld met zowel 5 nM als met 800 nM T (figuur 1). Bij beide T-concentraties werd een smalle piek van optimale  $5\alpha$ -reductie gevonden bij pH 5,5. Bij pH 6,5 tot 8,0 was  $5\alpha$ -reductase nog substantieel actief.

### Kinetiek

De  $5\alpha$ -reductase activiteit werd bepaald bij pH 7,0 en een T-concentratiebereik van 1,8 nM tot 2,4  $\mu\text{M}$ . De experimenten werden uitgevoerd op verschillende dagen, met homogenaten van drie verschillende honden. Een Eadie-Scatchard plot van geschatte initiële enzymsnelheden gedeeld door substraatconcentratie ( $V/S$ ) tegen  $V$  was duidelijk non-lineair (figuur 2). Door deze data te "fitten" aan een Michaelis-Menten vergelijking voor twee onafhankelijke isozymen werden een hoog affiniteits (laag  $K_m$ ) isozym ( $K_m = 2,67 \pm 1,45$  nM) en een laag affiniteits (hoog  $K_m$ ) isozym ( $K_m = 1,23 \pm 0,54$   $\mu\text{M}$ ) gevonden. De maximale enzymsnelheid ( $V_{max}$ ) van het lage affiniteits isozym



**Figuur 1.** pH-gevoeligheid van  $5\alpha$ -reductase activiteit in prostaathomogenaten van de hond. Enzymatische activiteit werd bepaald zoals beschreven in Materiaal & Methoden met 5 (●) en 800 (○) nM testosteron als substraat.

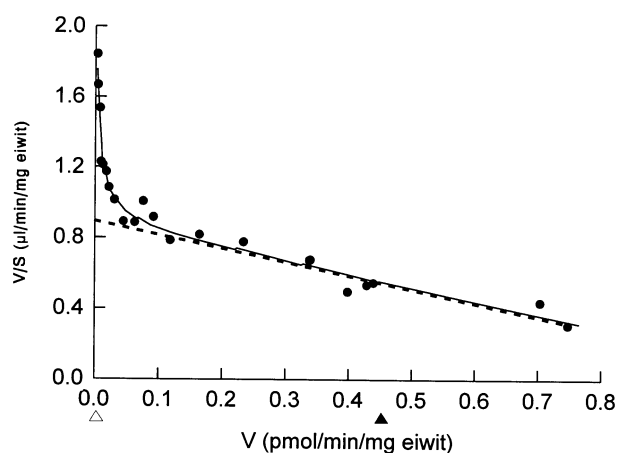
was  $0,674 \pm 0,35$  pmol/min/mg eiwit, terwijl het hoge affiniteits isozym een maximale snelheid had van  $4,75 \pm 3,7$  fmol/min/mg eiwit. De  $V_{\max}/K_m$  ratio's waren 0,548 and 1,78  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  eiwit voor respectievelijk het lage en hoge affiniteits isozym.

### Specificiteit remmers

De 50% inhibitieconcentraties ( $IC_{50}$ 's) van drie verschillende humaan isozym-specifieke  $5\alpha$ -reductase remmers werden vastgesteld bij twee verschillende T-concentraties (pH 7,0). Remmers werden getest in een concentratiereeks van 1 tot 10.000 nM. Bij 1,8 nM T waren de  $IC_{50}$ 's van Finasteride, LY306089 en MK386 respectievelijk ongeveer 7 nM, 900 nM en 5000 nM. Bij 500 nM T waren deze waarden ongeveer 2000 nM, 1100 nM en 8 nM (figuur 3 en figuur 5a).

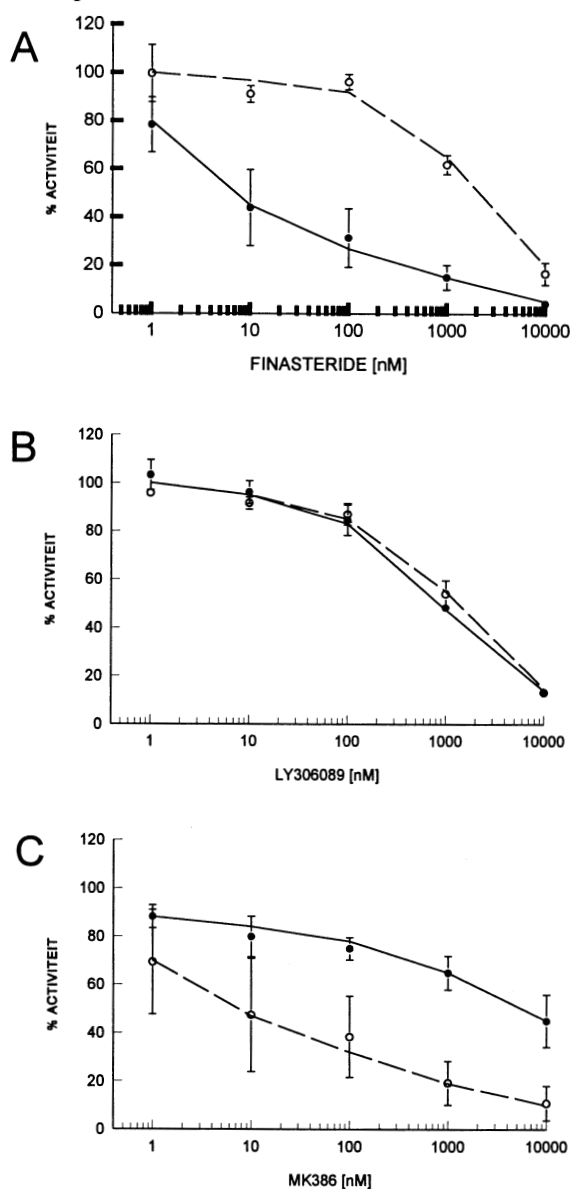
Vervolgens werden de effecten van één concentratie van de remmer op de  $5\alpha$ -reductase activiteit in een homogenaat van hondenprostaat bepaald. Deze concentratie van de remmer werd bepaald aan de hand van de inhibitie plots uit een van de eerdere experimenten (figuur 3), waarbij slechts een partiële remming bij 1,8 nM T gevonden werd. Bij 100 nM Finasteride werd het hoge affiniteits isozym bijna geheel geremd (figuur 4a). De activiteit van het lage affiniteits isozym was nog altijd detecteerbaar in een Eadie-Scatchard plot van de verkregen data. LY306089 (1  $\mu\text{M}$ ) remde beide isozymen, gezien het feit dat een Eadie-Scatchard plot na remming non-lineair bleef (figuur 4b). Bij 2  $\mu\text{M}$  MK386 was alleen het hoge affiniteits isozym detecteerbaar (figuur 4c).

Gezien het grote aantal onbekenden in een vergelijking voor de remming van twee onafhankelijke isozymen was het niet mogelijk het type en de mate van remming te berekenen uit de verkregen data. Daarom werd aangenomen dat er sprake was van non-competitieve remming, en werden de data "gefit" bij vastge-

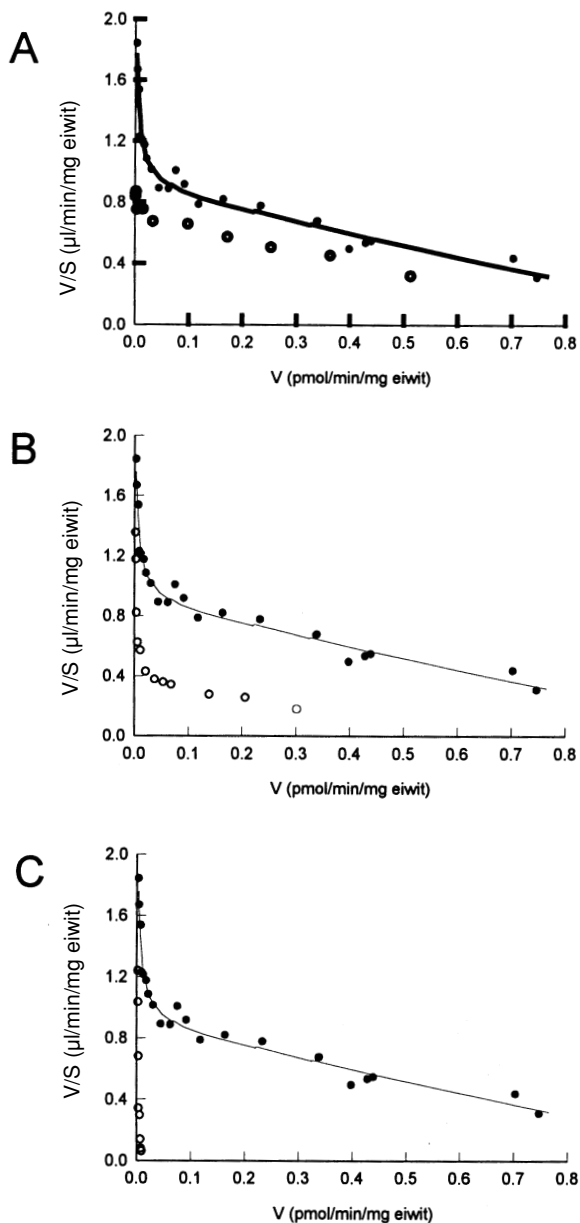


**Figuur 2.** Eadie-Scatchard plot van geschatte initiële enzym-snelheid ( $V$ ) gedeeld door substraat concentratie ( $S$ ) tegen  $V$  van  $5\alpha$ -reductase activiteit in een homogenaat van de prostaat van de hond bij pH 7,0. Substraat- (testosteron) concentraties varieerden van 1,8 nM tot 2,4  $\mu\text{M}$ . Het resultaat van één representatief experiment wordt getoond. Twee isozym activiteiten kunnen worden berekend, een laag  $K_m$  isozym (---) en een hoog  $K_m$  isozym (●●●). Driehoeken wijzen naar enzymsnelheden bij 1,8 nM ( $\Delta$ ) en bij 500 nM ( $\blacktriangle$ ) nM testosteron, bij welke concentraties de  $IC_{50}$ 's werden bepaald getoond in figuur 3.

stelde  $K_m$ -waarden. Deze analyse gaf een  $14,3 \pm 15,6$  % remming van  $V_{\max}$ -waarden van het lage affiniteits isozym en  $91,0 \pm 5,2$  % remming van het hoge affiniteits isozym door 100 nM Finasteride (figuur 5b). 1  $\mu\text{M}$  LY306089 gaf een remming van  $58,6 \pm 2,5$  % van het lage affiniteits isozym, en  $39,4 \pm 11,2$  % van het hoge affiniteits isozym. Bij 2  $\mu\text{M}$  MK386 waren deze waarden respectievelijk  $93,7 \pm 6,6$  en  $8,8 \pm 37,0$  %. Variantie analyse (ANOVA) gaf aan dat er een significant verschil was tussen de remmers in de mate van remming van het lage ( $p = 0,0006$ ) en het hoge affiniteits isozym ( $p = 0,034$ ). Een post-hoc Bonferoni t-test gaf aan dat Finasteride specifiek het hoge affiniteits isozym remde ( $p = 0,0028$ ), terwijl MK386 het lage affiniteits isozym meer remde ( $p = 0,034$ ). LY306089 was niet specifiek voor één van de isozymen ( $p = 0,078$ ).



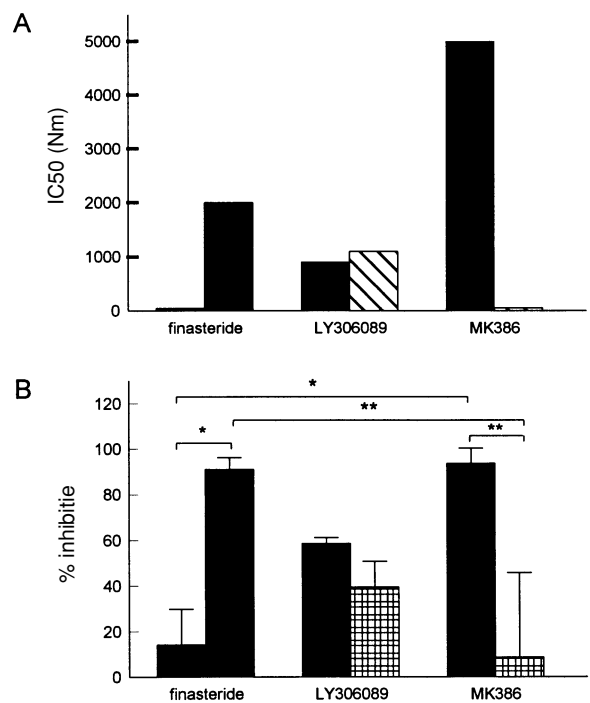
**Figuur 3.** Remming van  $5\alpha$ -reductase activiteit in de prostaat van de hond door drie verschillende humaan  $5\alpha$ -reductase subtype specifieke inhibitors (1 tot 10.000 nM), i.e. de humane type II specifieke remmer Finasteride (A) en de humane type I specifieke remmers LY306089 (B) en MK386 (C).  $IC_{50}$ 's werden bepaald voor  $5\alpha$ -reductie bij 1,8 nM (●●●) en 500 nM testosteron. Waarden zijn weergegeven als gemiddelde  $\pm$  van drie verschillende experimenten.



**Figuur 4.** 5 $\alpha$ -Reductase enzymatische activiteit in homogenaten van de prostaat van de hond in afwezigheid (-●-) of aanwezigheid (-○-) van 100 nM Finasteride (A), 1  $\mu$ M LY306089 (B) of 2  $\mu$ M MK386 (C). A: Finasteride remt specifiek het lage  $K_m$ -isozym; B: LY306089 lijkt niet specifiek voor een isozym, terwijl C: MK386 specifiek het hoge  $K_m$ -isozym remt.

### Partiële klonering

Analyse van de honden cDNA's, verkregen door middel van een gedegeneerde kloneringsstrategie in de prostaat van de hond, leverde sequenties met een hoge homologie met de humane 5 $\alpha$ -reductase isozymen op. De nucleotide sequenties van deze klonen zijn ingediend bij GenBank met de accession numbers AF136720 en AF136721. Gezien de homologie werd vastgesteld dat deze sequenties overeenkomen met respectievelijk de nucleotiden 538 tot 800 van het humane type I (M32313), en 311 tot 739 van het humane type II 5 $\alpha$ -reductase (M74047). Dit betreft 34 en 56% van de respectievelijke humane coderende sequenties. Gebaseerd op deze analogie werden de



**Figuur 5.** A: Grafische representatie van de IC<sub>50</sub> waarden zoals beschreven in figuur 3. IC<sub>50</sub> van remming bij 1,8 (zwarte balken) en bij 500 (gearceerde balken) nM testosteron; B: Semi-kwantificering van de gegevens uit figuur 4. De gegevens werd "gefit" voor non-competitieve remming en het percentage daling in maximale snelheid werd gebruikt om de specifieke remming van het hoge  $K_m$ -isozym (zwarte balken) en lage  $K_m$ -isozym (gearceerde balken) te bepalen. Balken geven het gemiddelde + sd aan van drie verschillende experimenten (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  volgens twee-zijdige (Bonferroni) t-test).

waarschijnlijke aminozuursequenties bepaald. Deze partiële aminozuursequenties bij de hond gaven een homologie met de humane homologen van respectievelijk 82,8 en 87,8 % (data niet getoond).

### Northern blot

Totaal RNA van de humane en hondenprostaat werd gehybridiseerd met <sup>32</sup>P-dATP gelabelde probes. De type I 5 $\alpha$ -reductase hond-specifieke probe detecteerde een duidelijk transcript van ongeveer 2,4 kb in zowel humane- als honden-RNA. De honden type II 5 $\alpha$ -reductase probe was niet in staat specifiek mRNA in de hondenprostaat, noch in de humane prostaat te detecteren.

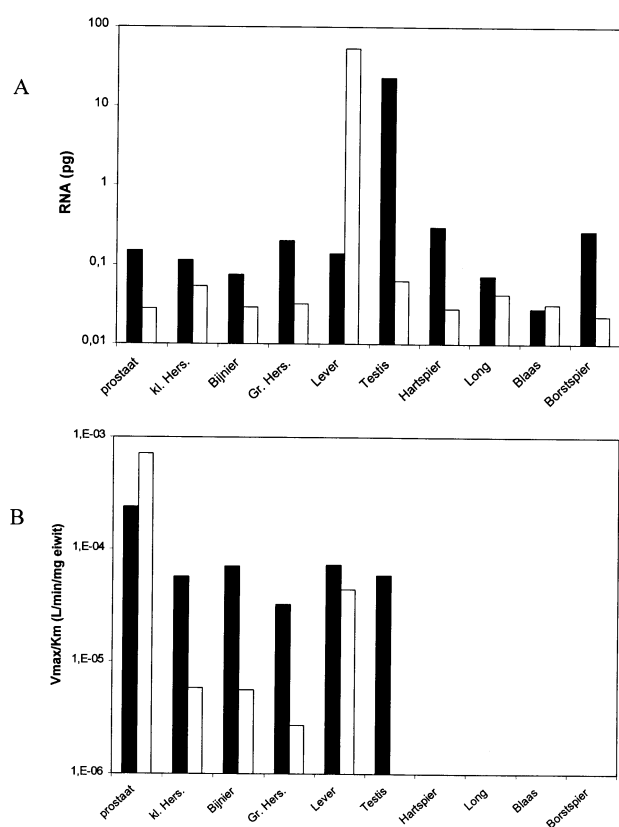
### RT-PCR

Een RT-PCR werd opgezet door specifieke primers voor de amplificatie van de honden 5 $\alpha$ -reductase isozymen te bepalen. Met behulp van deze primers werd 5 ng cDNA, verkregen uit totaal RNA uit de prostaat van de hond, geamplificeerd. Dit gaf duidelijke producten van 214 en 255 nucleotiden voor respectievelijk type I en type II 5 $\alpha$ -reductase op een ethidiumbromide agarose gel. Gezien de homologie tussen de isovormen, werd de specificiteit van de PCR-reactie gecontroleerd door de PCR-producten te blotten en te hybridiseren met interne gebiotinyleerde probes. Deze interne probes van 21 en 20 nucleotiden voor,

respectievelijk, het type I en type II isozym werden geselecteerd op basis van hun specificiteit voor de betreffende isozymen. Er werd geen signaal gevonden als een interne probe voor het andere isozym gebruikt werd om een reactie product van een PCR-reactie te hybridizeren, terwijl de juiste probes duidelijke signalen gaven. Dit geeft aan dat zowel de beide isozymprimersets, als de gebiotinyleerde interne primers, specifiek zijn voor de betreffende isozymen.

### Weefsel-specifieke expressie

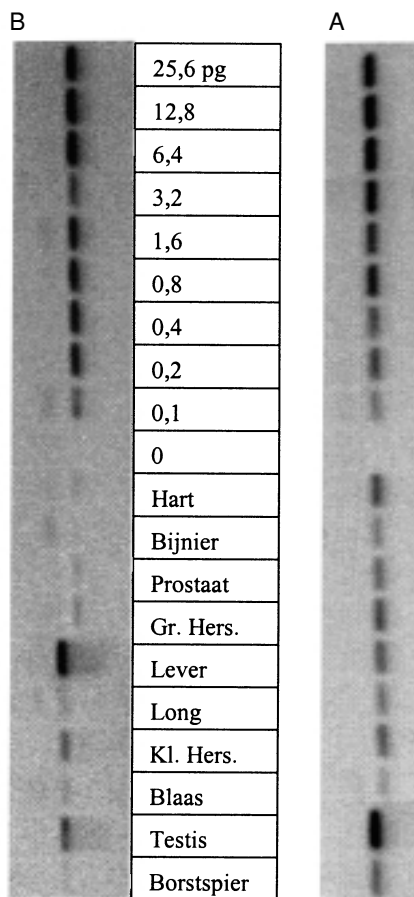
In diverse hondenweefsels werd de  $5\alpha$ -reductase mRNA-expressie nagegaan. Hiervoor werd van diverse weefsels afkomstig van één hond RNA geïsoleerd en werd met behulp van semi-kwantitatieve RT-PCR de expressie van type I en II  $5\alpha$ -reductase bepaald (figuur 7, figuur 6a). Ook werd in deze weefsels de  $5\alpha$ -reductase activiteit bepaald bij pH 7,0 (figuur 6b). Ter vergelijking zijn de  $V_{max}/K_m$  waarden vermeld. Type I kwam in alle geteste weefsels in meer of mindere mate tot expressie. In de testis werd de hoogste expressie van deze isovorm gemeten. Daarnaast bleek ook dat in weefsels waarin géén  $5\alpha$ -reductase-activiteit te meten was, toch type I  $5\alpha$ -reductase mRNA te vinden was. Type II  $5\alpha$ -reductase mRNA kwam het hoogst tot expressie in de lever van de hond. Daarnaast werd ook in de testis een relatief hoge hoeveelheid type II  $5\alpha$ -reductase mRNA aangetoond, hetgeen niet bleek uit de enzymatische activiteitsmeting (figuur 6).



**Figuur 6.** mRNA (A) en  $V_{max}/K_m$ -ratio's (B) van type I (zwarte balken) en type II (witte balken)  $5\alpha$ -reductase in diverse weefsels van de hond.

## DISCUSSIE

Moore en Wilson waren de eersten die het bestaan van twee isozymen van  $5\alpha$ -reductase postuleerden, op basis van de aanwezigheid van twee duidelijk te onderscheiden pH-optima in  $5\alpha$ -reductase-activiteit in humane fibroblasten (29). Het zure pH-optimum is een van de meest opvallende karakteristieken van het type II isozym dat is geconserveerd in muis, rat, aap en mens (3,20,21,24,25,28-30). In de door ons beschreven experimenten werden, in tegenstelling tot eerdere resultaten van Liang et al. (31), twee pH-optima van  $5\alpha$ -reductase activiteit gevonden in de prostaat van de hond. Echter, het zure pH-optimum zou met het experimentele protocol van Liang et al, waarbij werd gemeten bij gehele pH-waarden en bij  $1 \mu\text{M T}$ , niet gedetecteerd zijn (zie figuur 1). De door ons gevonden ratio van  $5\alpha$ -reductase activiteit bij pH 5,5 en pH 7,0 (0,8-1) komt overeen met de ratio die eerder is gerapporteerd in de prostaat van de rat (20,28,30). Dit wil echter niet zeggen dat de enzymatische activiteiten van de beide mogelijke  $5\alpha$ -reductase subtypes bij de hond in vivo, dus bij fysiologische pH (32), in de prostaat ook ongeveer gelijk zijn. Daarom werd de  $5\alpha$ -reductase activiteit in de hondenprostaat nader onderzocht bij pH 7,0 zoals eerder door ons is beschreven bij de mens (20,21). Eadie-Scatchard plots van de verkregen data waren non-lineair, hetgeen enzymatische activiteit van twee



**Figuur 7.** Resultaten van de semi-kwantitatieve RT-PCR van type I (A) en type II (B)  $5\alpha$ -reductase mRNA in diverse weefsels van de hond. Een externe ijklijn werd gebruikt voor kalibratie.

aparte isozymen impliceert (23). De berekende affiniteits-constanten (2,67 nM en 1,23  $\mu$ M) zijn in dezelfde orde van grootte als die van respectievelijk de ratten- en humane type II (5-10 nM) en type I (1-2  $\mu$ M) (3,20,21,30). De maximale omzettingssnelheden van beide isozymen in de prostaat van de hond bij pH 7,0 (4,75 fmol/min/mg eiwit en 0,674 pmol/min/mg eiwit), geven aan dat er een ongeveer 140 keer hogere maximale enzymactiviteit van het lage affiniteits isozym in dit weefsel aanwezig is.

De effecten van drie specifieke remmers van het humane  $5\alpha$ -reductase, namelijk het 4-azasteroid Finasteride, een specifieke remmer voor het humane type II (2) maar niet specifiek in de rat (30), de benzoquiolinone humane type I-specifieke remmer LY306089 (33) en het humane type I-specifieke 4-azasteroid MK386 (6) op de beide isozymen in de prostaat van de hond werden vervolgens bepaald.  $IC_{50}$ 's van deze remmers werden bepaald bij 1,8 nM en bij 500 nM T. Volgens de Michaelis-Menten vergelijking voor twee onafhankelijke isozymen, gebruikt om de kinetische karakteristieken van de isozymen te berekenen, dragen beide isozymen in gelijke mate bij aan de vorming van DHT bij 1,8 nM T, terwijl bij 500 nM T alleen het lage affiniteits isozym significant bijdraagt (figuur 2). Bij 1,8 nM T, is de volgorde van potentie voor de remmers: Finasteride > LY306089 > MK386. Bij 500 nM is deze volgorde echter omgekeerd: MK386 > LY306089 > Finasteride. De  $IC_{50}$  van Finasteride bij 500 nM T (2  $\mu$ M) is vergelijkbaar met eerder beschreven waarden, bepaald bij hoge T-concentraties (5,13,31). Dus, Finasteride is een meer effectieve remmer van  $5\alpha$ -reductase-activiteit bij lage substraatconcentraties, terwijl MK386 een duidelijk lagere  $IC_{50}$  bij 500 nM dan bij 1,8 nM T heeft. LY306089 is even effectief bij beide T concentraties. Om dit verder te onderzoeken werd het effect van één concentratie van elk van de remmers op de isozym-activiteiten nagegaan en uitgezet in een Eadie-Scatchard plot. Finasteride bleek het hoge affiniteits isozym sterker te remmen dan het lage. 2  $\mu$ M MK386, echter, was effectiever in het remmen van het lage affiniteits-isozym. De derde onderzochte remmer, LY306089, remde bij een concentratie van 1  $\mu$ M beide isozymen in de prostaat van de hond in dezelfde mate. Deze gegevens suggereren dat Finasteride in de hondenprostaat specifiek is voor het hoge affiniteits isozym is, terwijl MK386 specifiek is voor

het lage affiniteits isozym.

Gezien de hier beschreven overeenkomsten van de honden  $5\alpha$ -reductase isozymen (pH-optima, affiniteits-constanten en de specificiteit van Finasteride en MK386) met die van de rat en de mens, postuleren wij dat de door ons beschreven lage en hoge affiniteits isozymen overeenkomen met respectievelijk het type I en type II  $5\alpha$ -reductase-isozym van de hond (tabel 1).

De  $V_{max}/K_m$ -ratio wordt als een reële afspiegeling van de potentiële in vivo enzym activiteit beschouwd, omdat bij de relatief lage weefsel T-concentraties de enzymactiviteit slechts het pseudo-eerste orde gebied bereikt (34). De hoge affiniteit (lage  $K_m$ ) van het humane type II isozym voor T en de bijbehorende hoge  $V_{max}/K_m$ -ratio, waren voor andere auteurs reden om aan te nemen dat juist het type II isozym betrokken is bij de ontwikkeling van de prostaat wanneer de T-concentraties laag zijn (32). De beide  $5\alpha$ -reductase isozymen beschreven bij de hond in het huidige artikel tonen gelijkwaardige  $V_{max}/K_m$ -ratio's in de prostaat (0,548 and 1,78  $\mu$ l/min/mg eiwit voor respectievelijk het type I en type II), hetgeen aangeeft dat beide isozymen, in tegenstelling tot de situatie in de humane prostaat (21), in belangrijke mate bijdragen aan DHT-productie in de prostaat van de hond bij lage weefsel T-concentraties.

Isozymen van  $5\alpha$ -reductase met dezelfde karakteristieke pH-optima en affiniteitsconstanten zijn beschreven bij de muis, de rat, de aap en de mens (3,20,21,24,25,29,30). De genetische en biochemische overeenkomsten tussen ratten- en humane isovormen zijn in feite groter dan de overeenkomsten tussen de twee isozymen binnen elk van deze species (3). Daarom is de aanwezigheid van honden  $5\alpha$ -reductase isozymen zoals door ons beschreven niet onverwacht. Echter, de specificiteit van de mensspecifieke  $5\alpha$ -reductase remmers voor de beide isozymen bij de hond was enigszins onverwacht. Finasteride is niet specifiek in de rat; beide ratten-isozymen zijn gevoelig voor Finasteride-remming (30). Ook de benzoquiolinone-remmers, met als voorbeeld LY191704 (35,36), en het 4-azasteroid MK386 (6) gelden als niet specifiek tegen de ratten-isozymen. De hier beschreven  $5\alpha$ -reductase isozymen bij de hond worden echter specifiek geremd door twee van de drie geteste remmers. Dit geeft aan dat de beide isozymen bij de hond relatief grote overeenkomsten vertonen met de hu-

**Tabel 1.** Biochemische karakteristieken van de  $5\alpha$ -reductase isozymen bij de hond, de rat en de mens

Isozym:	Hond <sup>1</sup>		Rat <sup>2</sup>		Mens <sup>3</sup>	
	Lage affiniteit	Hoge affiniteit	Type I	Type II	Type I	Type II
pH-optimum	6,5-8,0	5,5	6,0-8,0	5,0-5,5	6,0-8,0	5,0-6,0
$K_m$ (pH 7,0)	1,23 $\mu$ M	2,67 nM	1 $\mu$ M	5 nM	2 $\mu$ M	12 nM
Finasteride	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos
LY306089	Neg	Neg	(neg <sup>4</sup> )	(neg <sup>4</sup> )	Pos	Neg
MK386	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg

1: dit rapport; 2: refs 6,20,30; 3: refs 2,6,21,32,33; 4: benzoquiolinone remmer LY191704, refs 35,36

mane isovormen.

De behandeling van BPH-patiënten met Finasteride is niet altijd even succesvol (2,37). Deze farmacologische therapie leidt specifiek tot reductie van glandulair epitheel, terwijl BPH juist voornamelijk van stromale oorsprong is (2,38,39). Bij ratten leidt chronische behandeling met Finasteride (hetgeen een niet specifieke remmer in deze species is (30)) tot een daling van zowel glandulair epitheelcellen als van fibromusculaire stromale cellen (40). Dit zou wijzen op een rol van het type I isozym bij het ontstaan van stromale hyperplasie. Echter, ondanks de eerder gerapporteerde lage affiniteit van Finasteride voor 5 $\alpha$ -reductase bij de hond ( $IC_{50}$  = 2,5 - 4  $\mu$ M (5,13,31)), leidt chronische Finasteride-toediening aan honden toch tot effecten in zowel epitheel als stroma (18). Wij toonden aan (figuur 6a) dat deze  $IC_{50}$ 's, gemeten bij hogere T-concentraties representatief zijn voor het type I isozym van de hond. Gezien de hier beschreven specificiteit van Finasteride voor het type II isozym van de hond, zou dit kunnen betekenen dat remming van de honden-type II isovorm leidt tot deze dubbele effecten. Mogelijk echter speelt hierbij de in vivo farmacokinetiek of de gerapporteerde tijdsafhankelijke remming van beide isozymen in de mens (41,42) een rol als verklaring voor dit verschil tussen de hond en de mens. Ook zijn de doseringen Finasteride die toegediend worden aan honden in de genoemde experimenten (5-45 mg/kg/dag) (18) veel hoger dan de klinisch toegepaste doses bij de mens. Daarom is het niet onmogelijk dat bij deze hoge doseringen beide 5 $\alpha$ -reductase isozymen van de hond worden geremd, waardoor apoptose van zowel epitheel als stroma wordt geïnduceerd. Deze gegevens suggereren dat mogelijk juist type I remmers een goede therapie voor BPH zouden kunnen zijn, hetgeen nog dient te worden onderzocht.

Tenslotte wordt de partiële klonering van de hondenisovormen van 5 $\alpha$ -reductase beschreven. De gekloonde regio's van de honden 5 $\alpha$ -reductase isozymen tonen wat betreft de geduceerde aminozuur volgorde een duidelijke homologie met de humane isovormen van respectievelijk 82,8% en 87,8% voor het type I en type II. Op Northern blot blijken de humane en honden-type I 5 $\alpha$ -reductase mRNA's ongeveer even groot te zijn (2,4 kB). De RT-PCR, specifiek voor de honden 5 $\alpha$ -reductase isozymen is veel gevoeliger dan de enzymmeting die hierboven beschreven werd. Verder is de specificiteit van deze PCR een groot voordeel ten opzichte van de enzymmeting. Deze laatste kan alleen indirect een onderscheid maken tussen de isozymen van 5 $\alpha$ -reductase, hetzij op basis van pH-gevoeligheid, affiniteit voor substraat, of remmergevoeligheid. Echter, gezien het gebrek aan correlatie tussen mRNA en enzymactiviteitsmetingen, dient men zich af te vragen wat de meest geschikte methode is om 5 $\alpha$ -reductase te kwantificeren. De verschillende methoden beschreven in dit artikel geven zeer verschillende waarden voor de ratio tussen type I en type II 5 $\alpha$ -reductase in de prostaat van de hond: de ratio tussen pH 5,5 en pH 7 geeft aan dat er ongeveer evenveel van beide isozymen actief is, terwijl de  $V_{max}$ -waarden bij pH 7,0 aantonen dat er 140 maal zoveel type I aanwezig is. Anderzijds is

volgens de  $V_{max}/K_m$ -ratio's drie maal zoveel type II aanwezig. De hoeveelheid mRNA wijst op 5 maal zoveel type I dan type II 5 $\alpha$ -reductase in dit weefsel. De interpretatie van deze diverse resultaten voor de in vivo situatie blijft dus moeilijk.

## CONCLUSIES

Dit is de eerste beschrijving van het bestaan van twee isozymen van 5 $\alpha$ -reductase bij de hond met pH-optima, kinetische karakteristieken, remmergevoeligheden en nucleotide-sequenties vergelijkbaar met de humane isovormen. Twee remmers, i.e. Finasteride en MK386, zijn specifiek voor respectievelijk het 5 $\alpha$ -reductase isozym type II en I isozym bij de hond, terwijl de remmer LY306089, althans *in vitro*, niet specifiek is. Deze remmers kunnen derhalve gebruikt worden om bij de hond onderzoek te doen naar de effecten van al dan niet specifieke remming van 5 $\alpha$ -reductase isozymen.

## Literatuur

1. Wilson JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am J Med* 1980; 68: 745-756.
2. Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, et al. The effect of Finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 1992; 327: 1185-1191.
3. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 $\alpha$ -reductase: Two genes/two enzymes. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 25-61.
4. Häusler A, Allegrini PR, Biollaz M, Batzl Ch, Scheidegger E, Bhatnagar AS. CGP 53153: a new potent inhibitor of 5 $\alpha$ -reductase. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 57: 187-195.
5. Di Salle E, Briatico G, Giudici D, Ornati G, Panzeri A. Endocrine properties of the testosterone. 5 $\alpha$ -reductase inhibitor turosteride (FCE 26073). *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 48: 241-248.
6. Tolman RL, Aster S, Bakshi RK et al. 4-Azasteroids as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors: identification of 4,7J-dimethyl-4-aza-5 $\alpha$ -cholestan-3-one (MK386) as a scalp selective inhibitor. *Eur J Med Chem* 1995; 30 suppl: 311s-316s.
7. Brawley OW, Ford LG, Thompson I, Perlman JA, Kramer BS. 5 $\alpha$ -Reductase inhibition and prostate cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 177-182.
8. Isaacs JT. Changes in dihydrotestosterone metabolism and the development of benign prostatic hyperplasia in the aging beagle. *J Steroid Biochem* 1983; 18: 749-757.
9. Lowseth LA, Gerlach RF, Gillett NA, Muggenburg BA. Age-related changes in the prostate and testes of the beagle dog. *Vet Pathol* 1990; 27: 347-353.
10. Zirkin BR, Strandberg JD. Quantitative changes in the morphology of the aging canine prostate. *Anat Rec* 1984; 208: 207-214.
11. Brendler CB, Berry SJ, Ewing LL, McCullough AR, Cochran RC, Strandberg JD, Zirkin BR, et al. Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle: The relationships between age, serum hormone levels, and the morphology and function of the canine prostate. *J Clin Invest* 1983; 71: 1-10.
12. Gloyna R, Siiteri PK, Wilson JD. Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog. *J Clin Invest* 1970; 49: 1746-1753.
13. Cohen SM, Werrmann JG, Rasmusson GH, Tanaka WK, Malatesta PF, Prahalada S, Jacobs JG, et al. Comparison of the effects of new specific azasteroid inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase on canine hyperplastic prostate: Suppression of prostate DHT correlated with prostate regres-



- sion. *The Prostate* 1995; 26: 55-71.
14. Brooks JR, Berman C, Glitzer MS, Gordon LR, Primka RL, Reynolds GF, Rasmusson GH. Effect of a new 5 $\alpha$ -reductase inhibitor on size, histological characteristics and androgen concentrations of the canine prostate. *Prostate* 1982; 3: 35-44.
  15. Juniewicz PE, Hoekstra SJ, Lemp BM, Barbolt TA, Devin JA, Gauthier E, Frenette G, et al. Effect of combination treatment with Zanolterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and Finasteride (MK-906), a steroidal 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. *Endocrinol* 1993; 133: 904-913.
  16. Cohen SM, Taber KH, Malatesta PF, Shpungin J, Berman C, Carlin JR, Werrmann JG, et al. Magnetic resonance imaging of the efficacy of specific inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia. *Magn Reson Med* 1991; 21: 55-70.
  17. Brooks JR, Berman C, Garnes D, Giltinan D, Gordon LR, Malatesta PF, Primka RL, et al. Prostatic effect induced in dogs by chronic or acute oral administration of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. *Prostate* 1986; 9: 65-75.
  18. Laroque PA, Prahallada S, Gordon LR, Molon Noblot S, Bagdon WJ, Duprat P, Peter CP, et al. Effects of chronic oral administration of a selective 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, Finasteride, on the dog prostate. *Prostate* 1994; 24: 93-100.
  19. Wenderoth UK, George FW, Wilson JD. The effect of a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor on androgen-mediated growth of the dog prostate. *Endocrinol* 1983; 113: 569-573.
  20. Span PN, Benraad ThJ, Sweep CGJ, Smals AGH. Kinetic analysis of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase activity in prostate and epididymis homogenates at neutral pH: evidence for type I activity in epididymis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 57: 95-101.
  21. Span PN, Sweep CGJ, Benraad ThJ, Smals AGH. Kinetic analysis of steroid 5 $\alpha$ -reductase activity at neutral pH in benign prostatic hyperplastic tissue: evidence for type I isozyme activity in the human prostate. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 57: 103-108.
  22. Span PN, Schalken JA, Sweep FG, Smals AG. Identification and partial characterization of two steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the canine prostate. *Prostate* 1998; 34: 222-223.
  23. Segel IH. *Enzyme Kinetics*. John Wiley & Sons, New York 214-218, 1975
  24. Levy MA, Brandt M, Sheedy KM, Holt DA, Heaslip JJ, Trill JJ, Ryan PJ, et al. Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5 $\alpha$ -reductases from *Cynomolgus* monkey: comparison with human and rat isoenzymes. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 52: 307-319.
  25. Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 $\alpha$ -reductase. *J Clin Invest* 1992; 89: 293-300.
  26. Prins GS, Jung MH, Vellanoweth RL, Chatterjee B, Roy AK. Age-dependent expression of the androgen receptor gene in the prostate and its implication in glandular differentiation and hyperplasia. *Dev Genet* 1996; 18: 99-106.
  27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
  28. Span PN, Smals AGH, Sweep CGJ, Benraad ThJ. Rat steroid 5 $\alpha$ -reductase kinetic characteristics: extreme pH-dependency of the type II isozyme in prostate and epididymis homogenates. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 54: 185-192.
  29. Moore RJ, Wilson JD. Steroid 5 $\alpha$ -reductase in cultured human fibroblasts: biochemical and genetic evidence for two distinct enzyme activities. *J Biol Chem* 1976; 251: 5895-5900.
  30. Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. *J Biol Chem* 1992; 267: 19548-19554.
  31. Liang T, Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH. Species differences in prostatic steroid 5 $\alpha$ -reductases of rat, dog, and human. *Endocrinol* 1985; 117: 571-579.
  32. Thigpen AE, Cala KM, Russell DW. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. *J Biol Chem* 1993; 268: 17404-17412.
  33. Kaefer M, Audia JE, Bruchofsky N, Goode RL, Hsiao KC, Leibovitch IY, Krushinski JH, et al. Characterization of type I 5 $\alpha$ -reductase activity in DU145 human prostatic adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 58: 195-205.
  34. Krieg M, Bartsch W, Thomsen M, Voigt KD. Androgens and estrogens: their interaction with stroma and epithelium of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. *J Steroid Biochem* 1983; 19: 155-161.
  35. Neubauer BL, Gray HM, Hanke CW, Hirsch KS, Hsiao KC, Jones CD, Kumar MV, et al. LY191704 inhibits type I steroid 5 $\alpha$ -reductase in human scalp. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2055-2060.
  36. Hirsch KS, Jones CD, Audia JE, Andersson S, McQuaid L, Stamm NB, Neubauer BL, et al. LY191704: A selective, nonsteroidal inhibitor of human steroid 5 $\alpha$ -reductase type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5277-5281.
  37. Lepor H, Williford WO, Barry MJ, Brawer MK, Dixon CM, Gormley G, Haakenson C et al. The efficacy of terazosin, Finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 533-539.
  38. Montironi R, Valli M, Fabris G. Treatment of benign prostatic hyperplasia with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor: morphological changes in patients who fail to respond. *J Clin Pathol* 1996; 49: 324-328.
  39. Rittmaster RS, Norman RW, Thomas LN, Rowden G. Evidence for atrophy and apoptosis in the prostates of men given Finasteride. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 814-819.
  40. Prahallada SR, Keenan KP, Hertzog PR, Gordon LR, Peter CP, Soper KA, van Zwieten MJ, et al. Qualitative and quantitative evaluation of prostatic histomorphology in rats following chronic treatment with Finasteride, a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. *Urology* 1994; 43: 680-685.
  41. Faller mB, Farley D, Nick HP. Finasteride: a slow-binding 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. *Biochem* 1993; 32: 5705-5710.
  42. Tian G, Stuart JD, Moss ML, Domanico PL, Bramson HN, Patel IR, Kadwell SH, et al. 17 $\beta$ -(N-tert-butylcarbamoyl)-4-aza-5 $\alpha$ -androstane-1-en-3-one is an active site-directed slow time-dependent inhibitor of human steroid 5 $\alpha$ -reductase type I. *Biochem* 1994; 33: 2291-2296.

## Summary

*Characterization and partial cloning of the canine isoforms of steroid 5 $\alpha$ -reductase type I and type II. Span PN, Bokhoven A van, Smals AGH, Schalken JA en Sweep CGJ. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 58-66.*

In both man and dog the enzyme that catalyses the reduction of testosterone to dihydrotestosterone, 5 $\alpha$ -reductase, is involved in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. Therefore, the dog is considered to be a valid model to test the effects of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on prostate growth. However, unlike in man, no information is available on the existence or characteristics of the canine 5 $\alpha$ -reductase isozymes. Therefore, we assessed the biochemical characteristics of dog prostatic 5 $\alpha$ -reductase, and cloned the canine isoforms of 5 $\alpha$ -reductase type I and type II. pH-dependency, enzyme kinetic characteristics and sensitivity to two out of three tested human-specific 5 $\alpha$ -reductase inhibitors indicated considerable similarities between dog and human isozymes. In the dog prostate, two partial cDNA's with high identity with the human isozymes were cloned. Comparing the tissue distribution, no correlation between enzyme activity and mRNA expression was found in several dog tissues. These results indicate the validity of the dog as a model for studies into the role of 5 $\alpha$ -reductase in prostatic neoplasia. However, the specificity of inhibitors should be assessed a priori for a correct evaluation of results.

*Key-words: 5 $\alpha$ -reductase; prostate; BPH; steroids; isozymes*