

BBA 65754

## STEROIDEPIMERASE—EIN NEUES ENZYM DES OESTROGENSTOFF-WECHSELS

K. DAHM, MONIKA LINDLAU UND H. BREUER

*Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie der Chirurgischen Universitätsklinik, Bonn  
(Deutschland)*

(Eingegangen am 26. Januar, 1968)

## SUMMARY

*Steroid epimerase—a new enzyme of oestrogen metabolism*

When 16 $\alpha$ -hydroxyoestrone is incubated with the 150 000  $\times$  g supernatant of human placenta, 16 $\beta$ -hydroxyoestrone is formed as metabolite. This reaction is reversible; it occurs in the absence of NAD(P)<sup>+</sup> or NAD(P)H and does not require 16-oxo-oestradiol-17 $\beta$  as intermediate. The enzymic conversion of 16 $\alpha$ -hydroxyoestrone to 16 $\beta$ -hydroxyoestrone and *vice versa* is catalysed by a steroid epimerase which is localised exclusively in the cytoplasmic fraction. The enzyme has also been found in the 150 000  $\times$  g supernatant of human intestine and liver as well as in the liver and kidney of guinea pig and rat.

For characterization of the steroid epimerase, the 150 000  $\times$  g supernatant of human placenta was treated with ammonium sulphate. A 3-fold increase in specific activity was obtained in the fraction precipitated between 30–60% saturation with ammonium sulphate. The rate of epimerization of the oestrogen ring D ketols is approximately constant between pH values of 6 and 8. The Michaelis–Menten constant was found to be  $3.9 \cdot 10^{-3}$  M for 16 $\alpha$ -hydroxyoestrone. The placental steroid epimerase is stable for at least 2 months at +2°, shows a temperature optimum at 47° and has an activation energy of 13.6 kcal/mole within the range of 24–37°. The  $Q_{10}$  values varied between 3.0 (24–34°) and 1.6 (30–40°). In contrast to the steroid oxidoreductases, involved in the metabolism of the 16,17-ketols, the steroid epimerase is not inhibited by *p*-chloromercuribenzoate.

By gel filtration, using Sephadex G-100 A and G-200, the molecular weight of the steroid epimerase was found to range between 45 800 and 48 500.

## EINLEITUNG

Bei unseren Untersuchungen über den Stoffwechsel von 16-substituierten Oestrogenen machten wir die Beobachtung, dass 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron in Abwesenheit von Nicotinamid–Adenin–Dinucleotiden durch den 150 000  $\times$  g-Überstand (Cytoplasma-Fraktion) verschiedener Organe des Menschen, des Meerschweinchens und

der Ratte in 16 $\beta$ -Hydroxyoestron umgewandelt wird; unter den gleichen Versuchsbedingungen entstand 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron aus 16 $\beta$ -Hydroxyoestron. Die gegenseitige Umwandlung der beiden Hydroxyketone verlief bei neutralem pH und konnte nur in den Cytoplasma-Fractionen, nicht aber in den Mikrosomen-Fractionen der untersuchten Organe festgestellt werden. Dieser Befund legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine enzymatisch katalysierte Epimerisierung von 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron handelte.

Da eine Steroidepimerase bisher noch nicht beschrieben worden ist, erschienen Untersuchungen über das Vorkommen eines solchen Enzyms gerechtfertigt. Ausserdem sollte versucht werden, die Steroidepimerase anzureichern und durch kinetische Daten zu charakterisieren. Für diese Versuche erwies sich die Cytoplasma-Fraktion der Placenta als geeignetes Ausgangsmaterial. In der vorliegenden Arbeit wird über die Eigenschaften einer durch Ammoniumsulfat angereicherten Steroidepimerase berichtet.

#### METHODIK

##### *Steroide*

16 $\alpha$ -Hydroxyoestron (Oestra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\alpha$ -diol-17-on), 16 $\beta$ -Hydroxyoestron (Oestra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\beta$ -diol-17-on), 16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$  (Oestra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol-16-on) und 16-*epi*-Oestriol (Oestra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol) wurden von Dr. R. KNUPPEN, Bonn, zur Verfügung gestellt. Oestriol (Oestra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol) war ein Handelspräparat (Schering AG, Berlin). Alle Steroide wurden papierchromatographisch auf Reinheit geprüft.

##### *Reagenzien und Lösungen*

Alle verwendeten Reagenzien waren von p.a. Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt); die organischen Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch einmal destilliert. Als Cofaktoren wurden NADH und NADPH (Biochemica Boehringer, Mannheim) benutzt. Folgende Enzyme und Eiweisse dienten als Standardsubstanzen: Cytochrom *c* (aus Pferdeherz), Ribonuclease (EC 2.7.7.17, aus Rinderpankreas, kristallisiert), Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27, aus Kaninchenmuskel, Kristallsuspension) und Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2., aus Rinderleber, Kristallsuspension) von Biochemica Boehringer, Mannheim, Haemoglobin (aus Rinderblut, 2 mal kristallisiert, 100%) von Fluka AG, Buchs SG, Schweiz, sowie Albumin (aus Rinderserum, kristallisiert, reinst > 98%), Ovalbumin (aus Hühnerei, 5 mal kristallisiert, reinst > 99%),  $\gamma$ -Globulin (aus Humanserum, lyophilisiert, rein > 98%) von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg. Labtrol (Standardisiertes Serumpräparat) wurde vom Asid-Institut, München, bezogen.

##### *Gewebe*

Zur Darstellung der Enzympräparationen dienten folgende Gewebe: Placenta, Dünndarm und Leber des Menschen sowie Leber und Niere des Meerschweinchens und der Ratte. Bei den Versuchen mit menschlicher Placenta betrug die Zeit zwischen Ausstossung und Beginn der Aufarbeitung 20–30 min; bei den übrigen Versuchen betrug die Zeit zwischen Gewebs-Entnahme und Beginn der Aufarbeitung 10 min. Nach Entfernung der Eihäute wurde das Placentagewebe von den bindegewebigen Septen

getrennt, mit der Schere zerkleinert und in 0.25 M Sucrose-Lösung in einem Homogenisator nach Bühler (E. Bühler, Tübingen) mit dem Schneidpropeller homogenisiert. Die Mucosa des Dünndarms wurde sorgfältig von der Submucosa abpräpariert und wie oben aufgearbeitet. Leber und Niere der Meerschweinchen und der Ratten wurden in 0.25 M Sucrose-Lösung im Glashomogenisator homogenisiert.

#### *Zellfraktionierung*

Die Homogenate wurden in einer Spinco-Ultrazentrifuge L 50 mit Titanrotor zunächst 15 min bei  $1000 \times g$  zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand anschliessend 45 min bei  $20\,000 \times g$  zentrifugiert. Der  $20\,000 \times g$ -Überstand wurde zur Abtrennung der Mikrosomen-Fraktion 60 min bei  $150\,000 \times g$  zentrifugiert und der so gewonnene  $150\,000 \times g$ -Überstand 60 min bei  $150\,000 \times g$  rezentrifugiert (Cytoplasma-Fraktion).

#### *Fällung mit Ammoniumsulfat*

Die Cytoplasma-Fraktion ( $150\,000 \times g$ -Überstand) der Placenta wurde der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat unterworfen. 400 ml des Überstandes wurden im Verlaufe von 120 min unter ständigem Rühren mit 70.4 g feingepulvertem Ammoniumsulfat bis zur 30% Sättigung (Gew./Vol.) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei  $+2^\circ$  stehen gelassen und anschliessend 60 min bei  $150\,000 \times g$  zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) aufgenommen (30% Ammoniumsulfat-Fällung). Der Überstand der 30% Fällung wurde mit 79.2 g Ammoniumsulfat bis zur 60% Sättigung versetzt und der entstandene Niederschlag (60% Ammoniumsulfat-Fällung) in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet. Der Zusatz von 57.2 g Ammoniumsulfat zum Überstand der 60% Fällung ergab schliesslich die 80% Ammoniumsulfat-Fällung, die nach entsprechender Aufarbeitung wie die vorangegangenen Fällungen in 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) gelöst wurde. Die so gewonnenen drei Ammoniumsulfat-Fällungen wurden ebenso wie der Überstand der 80% Fällung bis zur Verwendung bei  $+2^\circ$  aufbewahrt.

#### *Inkubationsbedingungen*

Wenn nicht anders vermerkt, wurden  $0.35 \mu\text{Mol}$  Steroid (gelöst in 0.1 ml Methanol) mit den jeweiligen Zellfraktionen (Mikrosomen- oder Cytoplasma-Fraktion) bzw. den Enzympräparationen aus menschlicher Placenta (Ammoniumsulfat-Fällungen) in 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) 60 min bei  $37^\circ$  in einem Schüttelthermostaten unter Luft inkubiert; das Endvolumen betrug 4.0 ml. Falls erforderlich, wurde die  $\text{H}^+$ -Ionenkonzentration der Inkubations-Lösung nach Zugabe der jeweiligen Ammoniumsulfat-Fällung mit 0.1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt.

#### *Aufarbeitung der Versuchsansätze*

Alle Inkubationslösungen wurden dreimal mit je 10 ml Äther-Chloroform (3:1, V/V) extrahiert, die Extrakte vereinigt und eingedampft.

#### *Quantitative Bestimmungen*

Die steroidhaltigen Eluate wurden durch eine Glasfritte G 3 (Schott, Mainz) filtriert<sup>1</sup>, eingedampft, die Rückstände in 10 ml Äther aufgenommen und die ätherischen Lösungen zur Entfernung von Formamidresten mit 10 ml Wasser extrahiert;

die ätherischen Phasen wurden abgetrennt und die wässrigen Lösungen mit 10 ml Äther reextrahiert. Die vereinigten ätherischen Lösungen wurden eingedampft und die Rückstände in 0.5–1 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 0.2 ml einer Hydrochinonlösung (2% in Äthanol) wurden die alkoholischen Lösungen eingedampft und die Rückstände der Kober-Reaktion unter den optimalen Bedingungen nach NOCKE<sup>2</sup> unterworfen; Einzelheiten s. *l.c.*<sup>3</sup>. Die nach Papierchromatographie für 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron erhaltene Eichkurve zeigte im Bereich von 1–20  $\mu$ g Linearität. Nach Papierchromatographie und Elution von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron betrug die Wiederfindung 80–85% (10 Versuche). Die Gesamtwiederfindung für beide Steroide (Bereich 1–50  $\mu$ g) nach Zusatz zu Standardinkubationen (enthaltend Pufferlösungen) betrug im Mittel 80%. Alle quantitativen Angaben wurden auf 100% Wiederfindung korrigiert.

#### *Eiweissbestimmungen*

Der Eiweissgehalt der Enzympräparationen wurde nach Kjeldahl ermittelt; die in den Ammoniumsulfat-Fällungen enthaltenen NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen wurden vor der Eiweissbestimmung durch Erhitzen (60–80°) mit 1 M NaOH entfernt. Die Bestimmung des Eiweissgehaltes der Eluate, die nach der Gelfiltration erhalten wurden, erfolgte durch Messung der Ultraviolett-Absorption bei 278 m $\mu$ .

#### *Papierchromatographie*

Alle Versuche wurden bei 25–30° durchgeführt. Die Steroide wurden auf formimidprägniertem Papier (Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl) mit Chloroform chromatographiert (vgl. *l.c.*<sup>4</sup>); die Laufzeit betrug das Doppelte der Zeit, die zum Erreichen der Front notwendig war. Dadurch wurde eine vollständige und für die quantitative Bestimmung notwendige Auftrennung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron, 16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$  und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron erreicht. Zur quantitativen Bestimmung wurden die phenolischen Steroide von ungefärbten Chromatogrammen mit Methanol eluiert, nachdem ihre Positionen durch Anfärben von Randstreifen mit authentischen Referenzsubstanzen ermittelt worden waren; die authentischen Verbindungen wurden mit Folin-Ciocalteus-Reagens<sup>5</sup> dargestellt.

#### *Gelfiltration*

Alle Versuche wurden in einem Kühlraum (+2°) durchgeführt. Sephadex G-100 A und Sephadex G-200 wurden von der Deutschen Pharmacia GmbH, Frankfurt, bezogen. Die Quellung des Gels erfolgte durch Zugabe des trockenen Pulvers zu 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer, pH 7.4, wobei ständig gerührt wurde. Die Quellung dauerte 3–5 Tage. Nach 2 h wurde die überstehende Lösung vom gequollenen Gel dekantiert und das Gel anschliessend mit 0.07 M Soerensen-Phosphat-Puffer harnstofffrei gespült. In andern Versuchen erfolgte die Quellung des Gels in Aqua bidest. für die Dauer von 5 Tagen. Das so vorbereitete und sorgfältig unter Vakuum entlüftete Gel wurde luftblasenfrei auf eine Säule (80 cm  $\times$  2.0 cm) gebracht und mit 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer solange gewaschen, bis die obere Gelgrenze stationär blieb. Die Höhe des Gelbettes betrug bei Verwendung von Sephadex G-100 A 64 cm, bei Verwendung von Sephadex G-200 71 cm. Das Fliessmuster des Hämoglobins diente zur Prüfung der Sephadexsäule auf gleichmässige Packung. Die Standardproteine zur Eichung der Sephadex-Säule sowie die jeweiligen Ammoniumsulfat-

Fällungen der Cytoplasma-Fraktion der menschlichen Placenta wurden in 4.0 ml eines 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffers auf die Sephadex-Säule aufgetragen.

Die Elution der in einer Konzentration von 0.1–0.5% aufgetragenen Standardproteine sowie der Ammoniumsulfat-Fällungen erfolgte mit 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer. Die Durchflussgeschwindigkeit der Elutions-Lösung variierte in den einzelnen Versuchen zwischen 0.1–0.15 ml/min; sie wurden während eines Versuches durch einen Flow Adaptor konstant gehalten. Die austretenden Eluate wurden in Fraktionen von 2.4 ml (G-100 A) bzw. 4.8 ml (G-200) in einem Fraktionssammler aufgefangen. Zur Ermittlung der Position und des Elutionsvolumens der Proteine wurde die Absorption eines aliquoten Teils der Eluate bei 278 m $\mu$  bestimmt.

#### *Reduktion mit Natriumborhydrid*

Die 16,17-Ketole wurden 2 h mit NaBH<sub>4</sub> in methanolischer Lösung bei Zimmertemperatur behandelt.

#### ERGEBNISSE

##### *Versuche zur gegenseitigen Umwandlung von 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron*

Nach Inkubation von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron mit den Cytoplasma-Fractionen der Placenta, des Dünndarms und der Leber des Menschen sowie der Leber und der Niere des Meerschweinchens und der Ratte wurde 16 $\beta$ -Hydroxyoestron als Reaktionsprodukt nachgewiesen; die Umwandlung erfolgte bei pH 7.4 und in Abwesenheit von NAD(P)<sup>+</sup> oder NAD(P)H. Der grösste Umsatz wurde in der Cytoplasma-Fraktion der menschlichen Placenta beobachtet; geringere Umsätze ergaben sich in den Cytoplasma-Fractionen der übrigen Organe. Nach Inkubation von 16 $\beta$ -Hydroxyoestron mit den Cytoplasma-Fractionen entstand 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron als Metabolit; auch diese Reaktion verlief ohne Zusatz von Cofaktoren. Im Gegensatz zu den Versuchen mit den Cytoplasma-Fractionen fanden sich in den Mikrosomen-Fractionen der untersuchten Organe keine Hinweise für die Cofaktor-freie gegenseitige Umwandlung von 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron.

Die Identifizierung der jeweiligen Reaktionsprodukte erfolgte durch Papierchromatographie unter den in der Methodik angegebenen Bedingungen sowie durch Reduktion mit Natriumborhydrid. Dabei entstand aus 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron sowohl Oestriol als auch 17-*epi*-Oestriol (Verhältnis 9:1)<sup>4</sup>, 16 $\beta$ -Hydroxyoestron ergab ausschliesslich 16-*epi*-Oestriol. Die Reduktionsprodukte der Hydroxyketone wurden ebenfalls papierchromatographisch identifiziert.

Um festzustellen, ob die gegenseitige Umwandlung von 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron durch ein spezifisches cytoplasmatisches Enzym oder aber durch unspezifische Reaktionen bedingt ist, wurden folgende Versuche durchgeführt: (a) 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron wurden getrennt 60 min bei 37° unter Luft in Phosphat-Puffer in pH-Bereichen von 6–8 geschüttelt. Nach Beendigung des Versuchs konnte das jeweils eingesetzte Steroid quantitativ wiedergewonnen werden. (b) 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron wurden getrennt unter den gleichen Bedingungen wie oben mit Labtrol (0.5 ml in 3.5 ml Puffer) bzw. Rinderserumalbumin (28 mg/4 ml Puffer) inkubiert; auch in diesen Versuchen wurden die eingesetzten Steroide unverändert wiedergefunden.

Aus den bisher dargelegten Ergebnissen geht hervor, dass es sich bei der gegen-

seitigen Umwandlung von  $16\alpha$ - und  $16\beta$ -Hydroxyoestron in den Cytoplasma-Fractionen um einen enzymatischen Prozess handelt, der durch eine Steroidepimerase katalysiert wird. Da in der menschlichen Placenta eine hohe Aktivität nachgewiesen worden war, wurden die Versuche zur Anreicherung und Charakterisierung der Steroidepimerase mit der Cytoplasma-Fraktion dieses Organs durchgeführt.

TABELLE I

SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN DER STEROIDEPIMERASE IN VERSCHIEDENEN PRÄPARATIONEN DER CYTOPLASMA-FRAKTION DER MENSCHLICHEN PLACENTA

Jeweils  $0.35 \mu\text{Mol}$   $16\alpha$ -Hydroxyoestron wurden mit der jeweiligen Enzympräparation und  $0.15 \text{ M}$  Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) in einem Gesamtvolumen von  $4.0 \text{ ml}$   $60 \text{ min}$  bei  $37^\circ$  unter Luft in einem Schüttelthermostaten inkubiert. Die quantitative Bestimmung von  $16\beta$ -Hydroxyoestron erfolgte nach Papierchromatographie mit der Kober-Reaktion. Weitere Einzelheiten siehe METHODIK.

Enzympräparation	Inkubierte Enzymmenge (ml)	Eiweiss-gehalt der Enzympräparation (mg)	Gebildete Menge $16\beta$ -Hydroxyoestron ( $\mu\text{Mol/min}$ ) $\times 10^{-6}$	Spez. Aktivität ( $\mu\text{Mol/min} \cdot \text{mg Eiweiss}$ ) $\times 10^{-6}$
$150\,000 \times g$ -Überstand	0.5	21.9	70.0	3.20
0–30% Ammoniumsulfat-Fällung	1.0	12.5	47.0	3.75
30–60% Ammoniumsulfat-Fällung	1.0	50.0	490	9.80
60–80% Ammoniumsulfat-Fällung	1.0	64.6	240	3.72
Überstand der 80% Ammoniumsulfat-Fällung	1.0	3.1	0	0

#### Versuche zur Anreicherung der placentaren Steroidepimerase

Der  $150\,000 \times g$ -Überstand der menschlichen Placenta wurde der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat unterworfen. Wie aus Tabelle I hervorgeht, fand sich

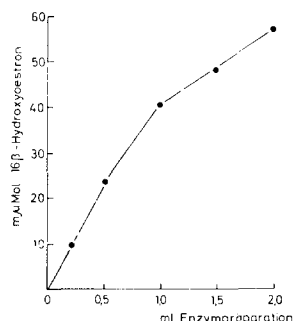
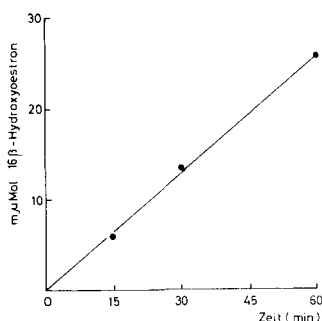


Fig. 1. Zeitlicher Verlauf der Epimerisierung von  $16\alpha$ -Hydroxyoestron zu  $16\beta$ -Hydroxyoestron durch die placentare Steroidepimerase (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung) des Menschen.  $0.35 \mu\text{Mol}$   $16\alpha$ -Hydroxyoestron wurden mit  $1.0 \text{ ml}$  der Enzympräparation (entsprechend  $50 \text{ mg}$  Eiweiss) und  $0.15 \text{ M}$  Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) in einem Gesamtvolumen von  $4 \text{ ml}$  bei  $37^\circ$  inkubiert. Die quantitative Bestimmung von  $16\beta$ -Hydroxyoestron erfolgte mit der Kober-Reaktion.

Fig. 2. Epimerisierung von  $16\alpha$ -Hydroxyoestron zu  $16\beta$ -Hydroxyoestron durch die placentare Steroidepimerase (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung) des Menschen in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge.  $0.35 \mu\text{Mol}$   $16\alpha$ -Hydroxyoestron wurden mit steigenden Mengen der Enzympräparation ( $0$ – $2 \text{ ml}$ , entsprechend  $0$ – $100 \text{ mg}$  Eiweiss) und  $0.15 \text{ M}$  Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) in einem Gesamtvolumen von  $4 \text{ ml}$  bei  $37^\circ$  inkubiert. Die quantitative Bestimmung von  $16\beta$ -Hydroxyoestron erfolgte mit der Kober-Reaktion.

die höchste spezifische Aktivität der Steroidepimerase (16 $\alpha$ -Hydroxyoestron  $\rightarrow$  16 $\beta$ -Hydroxyoestron) in der 30–60% Ammoniumsulfat-Fällung. Gegenüber dem 150 000  $\times$  g-Überstand wurde eine 3-fache Anreicherung des Enzyms erzielt. Ebenso wie die Cytoplasma-Fraktion epimerisierte die Enzympräparation die Hydroxyketone ohne Zusatz von NAD(P)<sup>+</sup> oder NAD(P)H. Zur Prüfung der Substratspezifität der Steroidepimerase wurden Oestriol und 16-*epi*-Oestriol als Substrate verwendet. Weder die 16 $\alpha$ -Hydroxygruppe von Oestriol noch die 16 $\beta$ -Hydroxygruppe von 16-*epi*-Oestriol wurden durch das Enzym epimerisiert.

Alle weiteren Versuche zur Charakterisierung der Steroidepimerase wurden mit der 30–60% Ammoniumsulfat-Fällung des 150 000  $\times$  g-Überstandes der menschlichen Placenta durchgeführt.

### Kinetische Untersuchungen

Wie aus Fig. 1 hervorgeht, verläuft die Zeitkurve der Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron im Zeitraum von 0–60 min linear. Fig. 2 zeigt, dass im Bereich von 0–0.5 ml der Enzympräparation (entsprechend 0–25 mg Eiweiss) Linearität zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron besteht; im weiteren Verlauf der Kurve (0.5–2.0 ml) Enzympräparation (entsprechend 25–100 mg Eiweiss) wurde ein stetiger Anstieg beobachtet. Die Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron besitzt kein

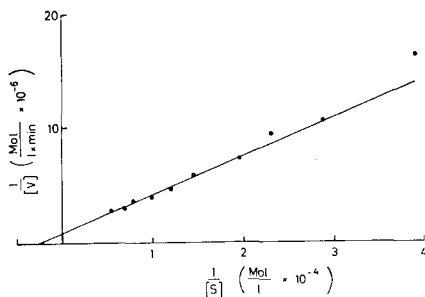


Fig. 3. Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron durch die placentare Steroidepimerase (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung) des Menschen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Steigende Mengen (0.07–0.7  $\mu$ Mol) von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron wurden mit 1.0 ml der Enzympräparation (entsprechend 50 mg Eiweiss) und 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) in einem Gesamtvolumen von 4 ml bei 37° inkubiert. Die quantitative Bestimmung von 16 $\beta$ -Hydroxyoestron erfolgte mit der Kober-Reaktion.

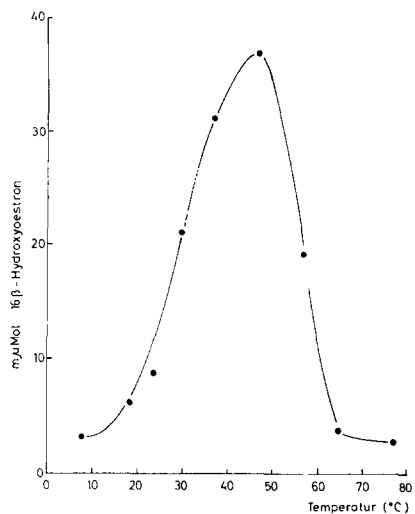


Fig. 4. Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron durch die placentare Steroidepimerase (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung) des Menschen in Abhängigkeit von der Temperatur. 0.35  $\mu$ Mol 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron wurden mit 1.0 ml der Enzympräparation (entsprechend 50 mg Eiweiss) und 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) in einem Gesamtvolumen von 4.0 ml bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die quantitative Bestimmung von 16 $\beta$ -Hydroxyoestron erfolgte mit der Kober-Reaktion.

ausgeprägtes pH-Optimum; zwischen pH-Werten von 6–8 wurde ein etwa gleich grosser Umsatz beobachtet. Im Bereich von 6.0–4.5 nahm die Aktivität des Enzyms ab; eine Verfolgung der pH-Kurve im alkalischen Bereich über pH 8 war wegen der Instabilität von  $16\beta$ -Hydroxyoestron nicht möglich. Die Michaelis-Menten-Konstante der Steroidepimerase für  $16\alpha$ -Hydroxyoestron beträgt  $3.9 \cdot 10^{-4}$  M. Dieser Wert wurde aus dem Verlauf der Substrat-Umsatz-Kurve mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Transformation (Fig. 3) ermittelt.

#### *Aktivierung und Inaktivierung*

Das Temperaturoptimum der Epimerase liegt bei  $47^\circ$ . Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur im Bereich von  $7$ – $77^\circ$  ist in Fig. 4 wiedergegeben. Die Aktivierungsenergie der Epimerase beträgt  $+13.6$  kcal/Mol ( $24$ – $37^\circ$ ). Im Temperaturbereich von  $10$ – $20^\circ$  wurde ein  $Q_{10}$ -Wert von 2.1, im Bereich von  $24$ – $34^\circ$  ein  $Q_{10}$ -Wert von 3.0 und im Bereich von  $30$ – $40^\circ$  ein  $Q_{10}$ -Wert von 1.6 ermittelt.

Durch  $p$ -Chlormercuribenzoessäure (Endkonzentration  $10^{-3}$  M im alkalischen pH-Bereich) wird die Steroidepimerase (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung) nicht gehemmt.

#### *Stabilität*

Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendete Steroidepimerase der 30–60% Ammoniumsulfat-Fraktion ist weitgehend stabil. Im Verlauf von 3 Monaten wurde bei  $+2^\circ$  kein Aktivitätsverlust beobachtet. Im Gegensatz hierzu nimmt die Aktivität der Steroidepimerase im unbehandelten  $150\,000 \times g$ -Überstand im Verlaufe von 2 Wochen rasch ab.

#### *Molekulargewichtsbestimmung*

Die Molekulargewichtsbestimmung der placentaren Steroidepimerase wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-100 A bzw. G-200 durchgeführt. Die in 0.7 ml 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer gelöste 30–60% Ammoniumsulfat-Fällung wurde mit 3.3 ml 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer verdünnt und die Enzym-Lösung auf die Säule aufgetragen, ohne das Gelbett aufzuwirbeln. Anschliessend erfolgte die Elution bei konstantem hydrostatischen Druck mit 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffer. Die Eluate wurden in Portionen zu je 2.4 ml bzw. 4.8 ml aufgefangen; 0.2 ml dienten zur Eiweissbestimmung durch Messung bei  $278\text{ m}\mu$  und 2.0 ml zur Bestimmung der Epimerase-Aktivität. Die Ergebnisse dieser Versuche sind für die Gelfiltration an Sephadex G-100 A in Fig. 5 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die Aktivität der Steroidepimerase in den Fraktionen 39 bis 47 (entsprechend einem Volumenbereich von 19.2 ml) eluiert wird; in den anderen Fraktionen konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Um das Molekulargewicht der so eluierten Steroidepimerase bestimmen zu können, wurde das Elutionsvolumen (103 ml bei Sephadex G-100 A bzw. 144 ml bei Sephadex G-200) mit den Elutionsvolumina verschiedener Standardproteine mit bekannten Molekulargewichten verglichen. Die Elutionsvolumina sowie die teils nach Gelfiltration, teils mit chemischen oder physikalischen Methoden ermittelten Molekulargewichte sind in Tabelle II zusammengefasst. Die Berechnung der Molekular-



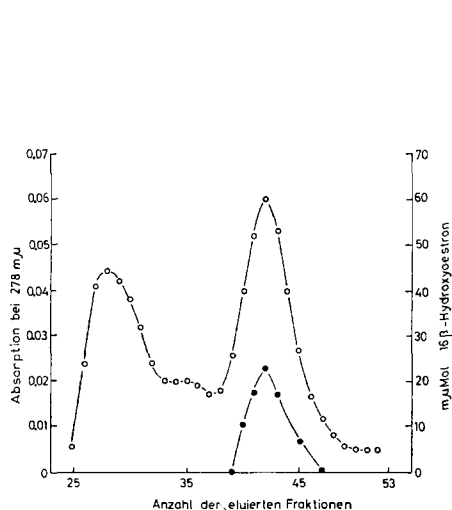


Fig. 5. Verhalten der 30–60% Ammoniumsulfat-Fällung aus menschlicher Placenta bei der Gel-filtration an Sephadex G-100 A. 0.7 ml der Enzympräparation (entsprechend 35 mg Eiweiss) wurden mit 3.3 ml eines 0.15 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.4) verdünnt und auf das 64 cm hohe Gelbett aufgetragen. Es wurde mit 0.07 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.4) eluiert. Die Eluate wurden in Fraktionen zu 2.4 ml aufgefangen. Die Enzymaktivität wurde durch Bestimmung von 16β-Hydroxyoestron ermittelt; Einzelheiten des Inkubationsansatzes vgl. METHODIK. Der Eiweissgehalt der Eluate wurde durch Messung der Absorption bei 278 mμ ermittelt. ●—●, Aktivität der placentaren Steroidepimerasen; ○—○, Eiweissgehalte der Eluate.

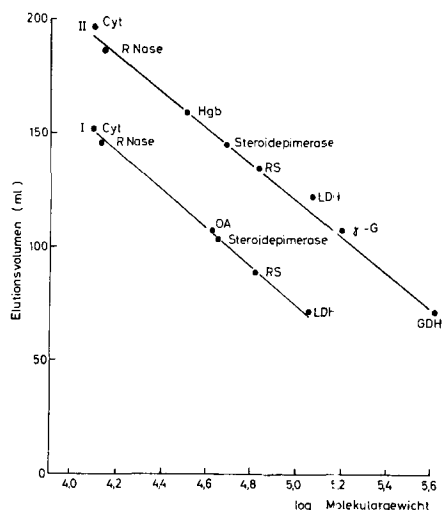


Fig. 6. Beziehungen zwischen Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichtes verschiedener Standardproteine und der placentaren Steroidepimerase des Menschen. Kurve I, Sephadex G-100 A; Kurve II, Sephadex G-200; Cyt, Cytochrom *c*; Hgb, Hämoglobin; RS, Rinder-serumalbumin; RNase, Ribonuclease; OA, Ovalbumin; LDH, Laktatdehydrogenase; γ-G, γ-Globulin; GDH, Glutamatdehydrogenase.

gewichte erfolgte auf Grund der Elutionsvolumina nach der von ANDREWS<sup>8,9</sup> angegebenen Beziehung:  $V_E = k \times \log M$ . Wie aus Fig. 6 zu ersehen ist, gehorchen die geprüften Standardproteine dieser rechnerischen Beziehung in den hier untersuchten Molekulargewichtsbereichen von etwa 12 000 bis 270 000. Sowohl für Sephadex G-100 A (Molekulargewichtsbereich 12 000 bis 120 000) als auch für Sephadex G-200 (Molekulargewichtsbereich 12 000 bis 270 000) bestand Linearität zwischen den Elutionsvolumina und den Logarithmen der Molekulargewichte. Das für die Steroidepimerase ermittelte Molekulargewicht liegt zwischen 45 800 (Sephadex G-100 A) und 48 500 (Sephadex G-200).

## DISKUSSION

Seit der Isolierung von 16α-Hydroxyoestron<sup>14</sup> und 16β-Hydroxyoestron<sup>15</sup> ist der Stoffwechsel dieser Verbindungen *in vivo* und *in vitro* untersucht worden (vgl. Lit. 16). Dabei hat sich gezeigt, dass beide Hydroxyketone durch 17β-Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen in Gegenwart von NAD(P)<sup>+</sup> und/oder NAD(P)H rasch zu den entsprechenden Triolen (Oestriol und 16-*epi*-Oestriol) reduziert werden. Eine gegenseitige Umwandlung von 16α- und 16β-Hydroxyoestron unter diesen Bedingungen erscheint zwar auf Grund theoretischer Überlegungen möglich (16α-Hydroxyoestron  $\rightleftharpoons$  Oestriol

TABELLE II

BESTIMMUNG DER MOLEKULARGEWICHTE DER PLACENTAREN STEROIDEPIMERASE (30–60% AMMONIUMSULFAT-FÄLLUNG) SOWIE VERSCHIEDENER STANDARDPROTEINE (EIWEISSE UND ENZYME) NACH GELFILTRATION AN SEPHADEX G-100 A UND G-200

Einzelheiten vgl. METHODIK.

Enzym bzw. Protein	Elutionsvolumen (ml) an Sephadex		Molekulargewicht ermittelt durch		Physikalische oder chemische Methoden
	G-100 A	G-200	Gelfiltration an Sephadex		
			G-100 A	G-200	
Steroidpimerase aus Placenta (30–60% Ammoniumsulfat-Fällung)	103	144	45 800	48 500	—
Cytochrom c (Pferdeherz)	150–152	194–195	—	—	12 384 (Lit. 6)
Ribonuclease (Rinderpankreas)	145	182–187	—	—	13 683 (Lit. 7)
Hämoglobin (Ochsenblut)	—	158	—	32–34 000 (Lit. 8, 9)	68 000
Ovalbumin	101–103	146–149	—	—	43 800 (Lit. 10)
Rinderserumalbumin (monomer)	87–89	134	—	—	67 000 (Lit. 11)
Laktatdehydrogenase (Kaninchen- muskel)	72	122	—	116 000 (Lit. 12)	—
$\gamma$ -Globulin (Mensch)	—	106–108	—	—	150 000 (Lit. 9)
Glutamatdehydrogenase (Rinderleber)	—	82	—	270 000 (Lit. 13)	1 000 000 (Lit. 13)

$\rightleftharpoons$  16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$   $\rightleftharpoons$  16-*epi*-Oestriol  $\rightleftharpoons$  16 $\beta$ -Hydroxyoestron), ist jedoch weder bisher im Detail diskutiert noch experimentell bewiesen worden. Dies dürfte durch die Tatsache bedingt sein, dass zwar 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron schnell zu Oestriol und 16-*epi*-Oestriol reduziert werden, die Triole jedoch nur in geringem Umfange—wenn überhaupt—zu 16,17-Ketolen rückoxidiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nunmehr der Nachweis geführt werden, dass 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron durch die Cytoplasma-Fraktion verschiedener Organe enzymatisch ineinander umgewandelt werden. Diese Reaktion verläuft allerdings in Abwesenheit von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotiden. Damit scheidet die oben angegebene Reaktionsfolge über die Triole und 16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$  aus; ein weiterer Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme ergibt sich aus Versuchen, in denen aus 16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$  nach Inkubation mit Cytoplasma in Abwesenheit der Co-faktoren weder 16 $\alpha$ - noch 16 $\beta$ -Hydroxyoestron entstanden. Diese Feststellung führt notwendigerweise zu dem Schluss, dass die Interconversion von 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxyoestron durch ein eigenes Enzym, nämlich eine Steroidpimerase, katalysiert wird. Um die Möglichkeit weitgehend auszuschliessen, dass es sich hierbei um eine Reaktion handelt, die nicht durch eine spezifische Steroidpimerase, sondern durch unspezifische Eiweisse oder durch chemische Einflüsse bedingt ist, wurden entsprechende Versuche mit verschiedenen Proteinen und mit Puffer-Lösungen im pH-Bereich von 5.5–8.0 durchgeführt. In keinem Falle konnte eine Umwandlung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron und umgekehrt beobachtet werden. Von Bedeutung

ist auch die Feststellung, dass eine Epimerisierung nur in den Cytoplasma-Fractionen, nicht aber in den Mikrosomen-Fractionen stattfindet.

Von den untersuchten Organen wurde eine vergleichsweise hohe Aktivität der Steroidepimerase in der menschlichen Placenta gefunden. Aus diesem Grunde und wegen der Bedeutung der Placenta für den Oestrogenstoffwechsel wurde der Versuch unternommen, die Steroidepimerase aus dem  $150\,000 \times g$ -Überstand anzureichern. Durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat wurde eine etwa 3-fache Anreicherung (30–60% Ammoniumsulfat-Fraktion) erzielt. Die so gewonnene Präparation der Steroidepimerase zeigt kein deutliches pH-Optimum, wird durch *p*-Chlormercuribenzoessäure (Endkonzentration  $10^{-3}$  M) nicht gehemmt und besitzt einen  $K_m$ -Wert von  $3,9 \cdot 10^{-4}$  M für  $16\alpha$ -Hydroxyoestron. Die Steroidepimerase weist ein Temperatur-optimum bei  $47^\circ$  auf; die  $Q_{10}$ -Werte schwanken zwischen 3 und 1,6 ( $10$ – $40^\circ$ ). Die Molekulargewichtsbestimmung des Enzyms durch Gelfiltration ergab Werte von 45 800 und 48 500. Die Richtigkeit dieser Molekulargewichte setzt die Annahme voraus, dass es sich bei der Steroidepimerase um ein globuläres Protein handelt. Ausserdem scheint das Enzym während der Gelfiltration seine Einheitlichkeit nicht zu verlieren (Bildung von Monomeren und Polymeren), wie das z.B. bei Hämoglobin<sup>8,4</sup> und bei Glutamatdehydrogenase<sup>13</sup> der Fall ist.

Epimerasen sind bisher bei Säugetieren wie auch bei Bakterien und höheren Pflanzen beschrieben worden (zur Übersicht vgl. Lit. 17 und Lit. 18). Diese Enzyme, die vorwiegend im Kohlenhydratstoffwechsel vorkommen, katalysieren die (reversible) Epimerisierung einer sekundär-alkoholischen Hydroxylgruppe. Die pH-Kurven der Epimerasen verlaufen über einen breiten Bereich; die pH-Optima liegen im allgemeinen bei pH 7. Die Michaelis-Menten-Konstanten dieser Enzyme zeigen, ähnlich wie diejenige der hier charakterisierten placentaren Steroidepimerase, Werte in der Grössenordnung von  $10^{-4}$  M. Über den Reaktionsmechanismus der Epimerasen ist bisher nichts sicheres bekannt geworden; eine Oxidoreduktion der sekundär-alkoholischen Hydroxylgruppe am C-Atom des jeweiligen Zuckermoleküls wird als wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus angenommen (vgl. Lit. 18).

Zum Reaktionsmechanismus der Epimerisierung von  $16\alpha$ -Hydroxyoestron zu  $16\beta$ -Hydroxyoestron und umgekehrt sei folgendes bemerkt. Eine Epimerisierung durch Austausch von Hydroxylgruppen nach einem  $SN_1$ - oder  $SN_2$ -Mechanismus scheidet bei den hier untersuchten  $16,17$ -Hydroxyketonen aus. Der Angriff eines  $H^+$ -Ions am  $16\alpha$ -Hydroxyoestron oder  $16\beta$ -Hydroxyoestron bewirkt keine Ausbildung

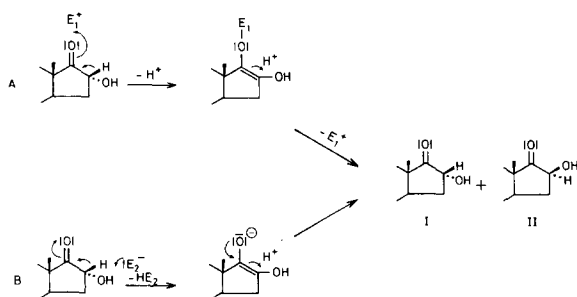


Fig. 7. Mögliche Reaktionsmechanismen der enzymatischen Epimerisierung von  $16\alpha$ -Hydroxyoestron. A, kationischer Mechanismus; B, anionischer Mechanismus.  $E_1$ , Enzym 1;  $E_1^+$ , Enzymkation 1;  $E_2$ , Enzym 2;  $E_2^-$ , Enzym-Anion 2. I,  $16\alpha$ -Hydroxyoestron; II,  $16\beta$ -Hydroxyoestron.

eines Carbkations am C-Atom 16, wie es der  $SN_1$ -Mechanismus fordert, sondern vielmehr die Bildung des Enols durch Angriff des  $H^+$ -Ions am Carbonylsauerstoff. Beim  $SN_2$ -Mechanismus muss ein  $OH^-$ -Ion die C-16-Hydroxylgruppe verdrängen; wegen der Nachbarstellung der Carbonylgruppe wird aber der acide C-16-Wasserstoff unter Bildung des Enolations entfernt, wobei die C-16-Hydroxylgruppe erhalten bleibt. Ein Mechanismus, der über die Enolform verläuft, erscheint demnach naheliegend (vgl. Fig. 7). Ein Enzym könnte entweder am Carbonyl-Sauerstoff (Reaktionsweg A) oder an dem zur Carbonylgruppe  $\alpha$ -ständigen C-16-Wasserstoff (Reaktionsweg B) angreifen. Hierbei entsteht entweder eine Enol-Enzym-Verbindung (Reaktionsweg A) oder das Enolat-Ion des 16-Hydroxyoestrone (Reaktionsweg B). Die Bildung von 16 $\alpha$ - bzw. 16 $\beta$ -Hydroxyoestron aus beiden Zwischenverbindungen lässt sich durch die Umkehrung der Bildungsreaktionen erklären, wobei eine Racemisierung auftritt, da beide Zwischenprodukte am C-Atom 16 eine planare Konfiguration haben.

Abschliessend sei noch ein Reaktionsweg diskutiert, der die Anwesenheit einer 16 $\alpha$ - und einer 16 $\beta$ -Oxidoreduktase voraussetzt und über 16-Keto-oestron als Zwischenprodukt verläuft. Wie aus Fig. 8 ersichtlich ist, benötigt diese Reaktion nur katalytische Spuren von  $NAD(P)^+$  oder  $NAD(P)H$ , die als Wasserstoffacceptoren und Wasserstoffdonatoren dienen und im Verlauf der Oxidoreduktion stets wieder regeneriert werden. Dieser Reaktionsweg ist jedoch als Erklärung für die beobachtete Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron wenig wahrscheinlich, da sich in keinem Falle Hinweise für die Bildung von 16-Keto-oestron als dem notwendigen Zwischenprodukt ergaben.

Über die physiologische Bedeutung der hier erstmalig beschriebenen Steroidepimerase im Stoffwechsel der Oestrogene kann noch nichts endgültiges gesagt werden. Möglicherweise spielt die Epimerisierung und die damit verbundene Veränderung des Steroidmusters bei einem relativen Cofaktormangel eine Rolle.

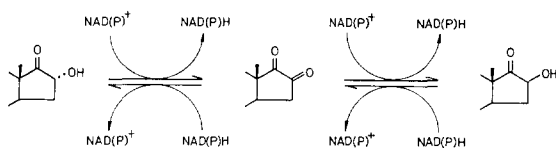


Fig. 8. Epimerisierung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron und umgekehrt in Gegenwart von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotiden. Dieser Reaktionsweg erfordert nicht die Anwesenheit einer Epimerase.

#### DANK

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Dipl.-Chem. W. SCHINDELHAUER sind wir für wertvolle Hinweise zu Dank verpflichtet.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Nach Inkubation von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron mit dem  $150\,000 \times g$ -Überstand (Cytoplasma-Fraktion) der menschlichen Placenta entsteht 16 $\beta$ -Hydroxyoestron als

Metabolit. Die Reaktion ist umkehrbar und erfordert weder  $\text{NAD(P)}^+$  noch  $\text{NAD(P)H}$  als Cofaktoren. Die Bildung von 16-Oxo-oestradiol-17 $\beta$  als Intermediärprodukt wurde nicht beobachtet. Die enzymatische Umwandlung von 16 $\alpha$ -Hydroxyoestron zu 16 $\beta$ -Hydroxyoestron wird durch eine Steroidpimerase katalysiert, die ausschliesslich in der Cytoplasma-Fraktion lokalisiert ist. Leber und Dünndarm des Menschen enthalten ebenso wie Leber und Niere von Ratte und Meerschweinchen das Enzym in unterschiedlichem Ausmass; wie in der Placenta findet sich auch hier die enzymatische Aktivität ausschliesslich im  $150\,000 \times g$ -Überstand (Cytoplasma-Fraktion).

Zur Anreicherung der Steroidpimerase wurde der  $150\,000 \times g$ -Überstand der menschlichen Placenta der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat unterworfen; dabei konnte in der Fraktion, die zwischen 30 und 60% Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfiel, eine gegenüber der Cytoplasma-Fraktion 3-fache Anreicherung erzielt werden. Die so gereinigte Steroidpimerase weist ein breites pH-Optimum zwischen pH 6 und 8 auf. Die Michaelis-Menten-Konstante besitzt einen Wert von  $3.9 \cdot 10^{-4}$  M. Das Enzym ist bei  $+2^\circ$  länger als 2 Monate aktiv; im Gegensatz zu den 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen lässt sich die Steroidpimerase durch *p*-Chlormercuribenzoat ( $10^{-3}$  M) nicht hemmen. Die  $Q_{10}$ -Werte schwanken zwischen 3.0 (24–34 $^\circ$ ) und 1.6 (30–40 $^\circ$ ). Das Temperaturoptimum der Steroidpimerase liegt bei 47 $^\circ$ ; für die Aktivierungsenergie wurde ein Wert von 13.6 kcal/Mol im Temperaturbereich von 24–37 $^\circ$  errechnet. Mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-100 A und G-200 wurde das Molekulargewicht der Steroidpimerase bestimmt; es liegt zwischen 45 800 und 48 500.

#### LITERATUR

- 1 H. BREUER UND L. NOCKE, *Acta Endocrinol.*, 29 (1958) 489.
- 2 W. NOCKE, *Biochem. J.*, 78 (1961) 593.
- 3 H. BREUER, in C. A. PAULSEN, *Estrogen Assays in Clinical Medicine*, University of Washington Press, Seattle, 1965, p. 88.
- 4 R. KNUPPEN, *Z. Vitamin-, Hormon- Fermentforschg.*, 12 (1962/63) 355.
- 5 F. L. MITCHELL UND R. E. DAVIES, *Biochem. J.*, 56 (1954) 690.
- 6 E. MARGOLIAS, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2161.
- 7 C. H. W. HIRS, S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
- 8 P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 91 (1964) 222.
- 9 P. ANDREWS, *Nature*, 196 (1962) 36.
- 10 E. G. YOUNG, in M. FLORKIN UND E. H. STOTZ, *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 7, Elsevier, Amsterdam, 1963.
- 11 R. A. PHELPS UND F. W. PUTNAM, in F. W. PUTNAM, *The Plasma Proteins*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1960, p. 143.
- 12 T. WIELAND, P. DUESBERG UND H. DETERMAN, *Biochem. Z.*, 337 (1963) 303.
- 13 K. S. ROGERS, L. HELLERMAN UND T. E. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 198.
- 14 G. F. MARRIAN, K. H. LOKE, E. J. D. WATSON UND M. PANATTONI, *Biochem. J.*, 66 (1957) 60.
- 15 D. S. LAYNE UND G. F. MARRIAN, *Biochem. J.*, 70 (1958) 244.
- 16 H. BREUER, *Vitamins Hormones*, 20 (1962) 285.
- 17 R. CAPUTTO, in K. LANG UND E. LEHNARTZ, *Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chemischen Analyse*, 6. Band/Teil C, Springer, Berlin, 1966, S. 718.
- 18 E. S. MAXWELL, in P. D. BOYER, H. LARDY UND K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 5, Academic Press, New York, 1961, p. 443.