

17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Humanplacenta-Mikrosomen, I  
**Solubilisierung, Anreicherung und Separierung zweier 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten nach Phospholipase-Behandlung**

Microsome-Associated 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases of Human Placenta, I  
Solubilization, Enrichment and Separation of Two 17 $\beta$ -HSD-Activities  
after Phospholipase-Treatment

Kunhard Pollow, Wilfried Runge und Barbara Pollow

Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **30 c**, 4–16 [1975]; eingegangen am 2. August/24. September 1974)

17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Human Placenta, Phospholipase, Microsomes

Treatment of human placenta microsomes with phospholipase A or D inhibits the 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase [17 $\beta$ -HSD] activity, parallel with the hydrolysis of membrane phospholipids.

The 17 $\beta$ -HSD activity of phospholipase treated microsomes is reactivated by synthetic phospholipids. The distribution of 17 $\beta$ -HSD activity in subfractions of original microsomes and of phospholipase treated microsomes obtained by zonal centrifugation was studied.

Solubilization of the microsomal 17 $\beta$ -HSD was achieved by phospholipase A treatment. Two 17 $\beta$ -HSD were solubilized from human placenta microsomes by phospholipase A treatment and were further purified by ammonium sulphate precipitation, gel filtration on BioGel A-0.5 m, DEAE-Sephadex chromatography and by isoelectric focusing. The enzymes were purified 25.8 and 17.4 times. The isoelectric points and molecular weights of the two 17 $\beta$ -HSD were determined.

Both enzymes are of a 17 $\beta$ -HSD type. One of the 17 $\beta$ -HSD, however, was sensitive to estradiol-17 $\beta$ , the other to testosterone. The question of whether the two enzymes constitute a monomer and a dimer of the same 17 $\beta$ -HSD or are completely different enzymes, is discussed.

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [17 $\beta$ -HSD] der Humanplacenta verteilt sich als lösliche Enzymaktivität in der Cytoplasma-Fraktion, strukturgebunden im endoplasmatischen Retikulum und ist mit der Außenmembran der Mitochondrien assoziiert<sup>1, 2</sup>. Die hochaktive lösliche 17 $\beta$ -HSD, verschiedentlich hochangereichert und charakterisiert<sup>3–6</sup>, katalysiert Oestradiol-spezifisch den Reaktionsschritt C<sub>17</sub>-Hydroxy nach C<sub>17</sub>-Oxo, was zu der Bezeichnung Oestradiol-„sensitive“-17 $\beta$ -Enzym geführt hat. Dagegen sind die strukturgebundenen 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten nicht an eine spezifische Konformation des Steroidkörpers gebunden; sie katalysieren reversibel die Reaktion C<sub>17</sub>-Hydroxygruppe  $\rightleftharpoons$  C<sub>17</sub>-Oxogruppe mit gleicher Reaktionsgeschwindigkeit von Ring-A-phenolischen Oestrogenen wie von C<sub>19</sub>-Steroiden (z. B. Testosteron). Diese von Lehmann und Breuer<sup>7</sup> und von Pollow *et al.*<sup>8</sup> gemachte Feststellung verbunden mit der Beobachtung, daß in den endoplasmatischen Membranen und in der Mitochondrienfraktion der Humanplacenta ein

spezifischer Wasserstofftransfer zwischen stoffwechselaktiven Positionen von Sexualhormonen (z. B. zwischen der C<sub>17</sub>-Position von Oestradiol-17 $\beta$  und der C<sub>17</sub>-Position von Androstendion) katalysiert wird, führten zu der Vermutung, daß im Membransystem des endoplasmatischen Retikulums zwei substratunterschiedlich arbeitende 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten vorhanden sind: Eine Oestradiol-„sensitive“-17 $\beta$ -HSD und eine Testosteron-„sensitive“-17 $\beta$ -HSD. In der vorliegenden Arbeit wird dieses geprüft. Das besondere Augenmerk liegt auf der Solubilisierung, Anreicherung und Separierung der in der Mikrosomenfraktion fixierten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten.

Die Solubilisierung der 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten wurde durch Phospholipase A- bzw. D-Behandlung erreicht und die Separierung durch Isoelektrofokussierung der durch Ammoniumsulfat-Fällung, Gel-filtration und Ionenaustauschchromatographie angereicherten 17 $\beta$ -HSD.

## Material und Methodik

### Trivialnamen und Abkürzungen

17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 17 $\beta$ -HSD; Oestradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</sub>; Oestrone, E<sub>1</sub>; 17 $\beta$ -Hydroxy-4-

Sonderdruckanforderungen an Ass.-Prof. Dr. K. Pollow,  
Institut für Molekularbiologie und Biochemie der F.U.,  
D-1000 Berlin 33, Arnimallee 22.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

androsten-3-on, Testosteron; 4-Androsten-3,17-dion, Androstendion.

Medium I: 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, pH 7,4, 3 mM Magnesiumacetat, 20-prozentiges Glycerin (v/v).

Medium II: 0,2 M Kaliumphosphat, 0,25 M Saccharose, 20 mM Triäthanolamin, 3 mM Magnesiumacetat, pH 7,4, 20-prozentiges Glycerin (v/v).

#### Steroide

[4- $^{14}\text{C}$ ]-E<sub>2</sub> (S.A. 58 mCi/mmol) und [4- $^{14}\text{C}$ ]-Testosteron (S.A. 58,2 mCi/mmol) waren Handelspräparate (Radiochemical Centre, Amersham, England). Die Steroide wurden dünnenschichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln auf Reinheit geprüft.

#### Substanzen

Cytochrom c, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Aldolase, Katalase, Phospholipase A aus *Crotalus terr. terr.* (200 U/mg), Phospholipase D aus Weißkohl (0,5 U/mg), NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>: Boehringer, Mannheim.

Sphingomyelin, Lecithin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin (Reinheitsgrad 96-prozentig): Applied Science Laboratories, Inc., State College, Pennsylvania, USA.

Ampholin pH 3,5 – 10: LKB Producter AB, Stockholm, Schweden. BioGel A-0,5 m (200 – 400 mesh): Bio Rad Laboratories, Richmond, Calif. DEAE-Sephadex A-50: Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.

Lichtgrün SF, Phenazin Methosulfat, Acrylamid, N,N-Methylen-bis-acrylamid: Serva, Heidelberg.

Phenyltetrazoliumchlorid: Schuchardt, München.

Alle übrigen Substanzen und organischen Lösungsmittel waren von p.a. Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt).

#### Gewebepräparation

Die normal ausgestoßenen Humanplacenten (Frauenklinik Charlottenburg der F.U. Berlin) wurden unter Eiskühlung zum Labor transportiert, von fetalen Membranen, Nabelschnur und bindegewebigen Septen befreit und mit der Schere zerkleinert. Das zerschnittene Material wurde mit 0,25 M Saccharose-Lösung (1:1, g/v) versetzt, für 3 × 10 sec im Ultra-Turrax (220 V) zerkleinert und anschließend im Glashomogenisator (Fa. Braun-Melsungen) bei 1000 U/min durch 5-maligen Vor- und Rücklauf homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Gaze filtriert und bei 20 000 × g für 30 min (Sorvall Kühlzentrifuge RC-2, Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für 60 min bei 105 000 × g (Spinco Ultrazentrifuge L2-65B, Rotor

30, Fa. Beckman) zentrifugiert; das Sediment (Mikrosomenfraktion) wurde zweimal mit 0,25 M Saccharose-Lösung gewaschen (native Mikrosomen).

#### Phospholipase A-Behandlung

In einem Gesamtvolumen von 30 ml wurden 222 mg gewaschenes Mikrosomenprotein mit 1,1 mg Phospholipase A und 2,5 · 10<sup>-3</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0, bis zu 120 min bei 37 °C inkubiert. Vor der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch im Glashomogenisator suspendiert. Nach der Inkubation wurde die Phospholipase A durch Chelatisierung der Ca-Ionen mit 6,6 · 10<sup>-3</sup> M EDTA inaktiviert.

#### Phospholipase D-Behandlung

Für die Inkubation der Mikrosomenfraktion mit Phospholipase D wurden im Gesamtvolumen von 30 ml 222 mg Mikrosomenprotein mit 37 mg Phospholipase D und 2,5 · 10<sup>-3</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 0,1 M Acetat-Puffer, pH 5,6, suspendiert und bis zu 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phospholipase D erfolgte wie für Phospholipase A beschrieben.

#### Phospholipoidbestimmung

Die mit Phospholipase behandelten Mikrosomenfraktionen wurden bei 158 000 × g für 60 min zentrifugiert; das Sediment in 8 ml bidest. Wasser homogenisiert, mit 1 ml 20-prozentiger (g/v) Trichloressigsäure versetzt, rezentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewaschene Sediment wurde nach Folch *et al.*<sup>10</sup> mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert und die Extrakte mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen.

Zur Bestimmung des Phosphorgehalts wurde die Methode von Bartlett<sup>11</sup> nach Pollow *et al.*<sup>9</sup> modifiziert.

#### Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteine erfolgte nach Lowry *et al.*<sup>12</sup>, als Eiweißprotein diente Rinderserumalbumin.

#### Reaktivierung der Phospholipase-behandelten Mikrosomenfraktion

Die Phospholipoide wurden in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, durch Beschallung (25 kHz) für 1 min unter Eiskühlung (Sonifer L 75, Branson Instr. Inc., Dunbury, Conn., USA) suspendiert. Jeweils 22 mg Mikrosomenprotein wurden unter optimalen Pufferbedingungen für 30 min mit Phospholipase A bzw. Phospholipase D inkubiert, anschließend bei 158 000 × g sedimentiert und das zweimal gewaschene Sediment in 2 ml 0,15 M Phosphat-Puf-

fer, pH 7,4,  $6,6 \cdot 10^{-3}$  M EDTA, im Glashomogenisator homogenisiert. Die Homogenate wurden mit Phospholipoid-Suspension auf 5 ml verdünnt und für 30 min zur Reaktivierung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die 17 $\beta$ -HSD-Aktivität bestimmt.

#### 17 $\beta$ -HSD-Aktivitätsbestimmung

Die 17 $\beta$ -HSD-Aktivität wurde bestimmt durch Messung der Transformation von E<sub>2</sub> nach E<sub>1</sub> bzw. Testosteron nach Androstendion. Pro Inkubationsansatz wurde 0,1  $\mu$ Ci <sup>14</sup>C-markiertes Steroid unter Zusatz von 10  $\mu$ mol nicht radioaktiv-markiertem authentischem Steroid/l eingesetzt.

Die Inkubationen wurden in einem Warburg-Schüttelthermostaten unter Luftzutritt bei 37 °C in Gegenwart von 0,1 mg NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> pro Ansatz durchgeführt. Als Inkubationsmedium diente, wenn nicht anders angegeben, 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4. Die in Äthanol gelösten Steroide wurden nach dem Abdampfen des Lösungsmittels in 0,1 ml Propylenglykol aufgenommen (Endkonzentration des Propylenglykols 2,4%). Das Gesamtvolumen der Inkubationsansätze betrug 4,1 ml. Die Inkubationen wurden durch Einbringen der Reaktionsgefäße in Eiswasser beendet. Die Steroide wurden 3-mal mit je 5 ml Äther/Chloroform 3:1 extrahiert und die Extrakte bis zur Trockene unter Stickstoff eingeengt.

#### Dünnschichtchromatographie der Steroid-Metaboliten

Als Trägermaterial diente Kieselgel F<sub>254</sub> (Woelm, Eschwege), Schichtdicke 0,25 mm. Chromatographiert wurde im geschlossenen System aufsteigend in den Laufmitteln: Cyclohexan/Essigester 1:1, Benzol/Methanol 19:1, Chloroform/Aceton 17:3. Die Steroide wurden mit äthanolischer Schwefelsäure bzw. durch auffallendes UV-Licht sichtbar gemacht.

#### Radioaktivitätsmessung

Die Bestimmung der radioaktiv-markierten Verbindungen erfolgte auf der Dünnschichtplatte mit dem Dünnschicht-Scanner der Fa. Berthold, Wildbad (LB 2723), mit einem fensterlosen Methan-Durchflußzähler und gleichzeitiger Integration der einzelnen Substanzgipfel mit dem Berthold-Integrationschreiber. Die Zählausbeute wurde mit externen <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-Standards bestimmt: <sup>14</sup>C = 18%, <sup>3</sup>H = 1,2%.

#### Faktionierung der Mikrosomen

##### a. Zonenzentrifugation

In den mit 3000 U/min laufenden Zonal-Rotor (Ti 14, Fa. Beckman) wurde über die Fülleinhaltung

ein linearer Saccharose-Dichtegradient (12- bis 55-prozentig, g/v) mit der Beckman-Gradienten-Pumpe (Modell 141) gepumpt (Pumpgeschwindigkeit: 1 l/h). An diesen Gradienten schloß sich nach außen ein Polster aus 60-prozentiger Saccharose-Lösung an, das die Sedimentation schwerer Partikel auf den Rotorboden verhindern sollte. Nach innen schloß sich an den Gradienten die Probe an: a. 222 mg natives Mikrosomenprotein in 30 ml 8,5-prozentiger Saccharose-Lösung, b. je 222 mg Mikrosomenprotein wurden – wie beschrieben – 30 min mit Phospholipase A bzw. D inkubiert; anschließend die Phospholipasen durch Zusatz von  $6,6 \cdot 10^{-3}$  M EDTA inaktiviert und das Inkubationsgemisch bei 158 000  $\times$  g für 60 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml 8,5-prozentiger Saccharose-Lösung aufgenommen. Der Probe folgten 40 ml „Overlay“ aus 1-prozentiger Saccharose-Lösung.

Nach der Zentrifugation (12 h, 30 000 U/min, 5 °C, Spinco Ultrazentrifuge Modell L2-65B) wurde der Rotor bei 3000 U/min mit dest. Wasser (Core B 29) von innen nach außen ausgepumpt und das gesamte Rotorvolumen in 5-ml-Fraktionen mit dem LKB-Faktionensammler gesammelt.

Der Dichtegradient wurde über den Brechungsindex [n<sub>D</sub><sup>20</sup>] der einzelnen Fraktionen mit dem Abbé-Refraktometer (Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.) bestimmt.

##### b. [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Präzipitation

Die Fraktionen 60 – 75 (Abb. 6), durch Zonallauf separierte Phospholipase A-behandelte Mikrosomenfraktion) wurden gegen Medium I dialysiert und einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen.

##### c. Gelchromatographie

Das (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Präzipitat (35- bis 50-prozentige Sättigung) wurde in 3 ml Medium I gelöst und auf eine mit Medium I äquilierte BioGel A-0,5 m Chromatographie-Säule (90 cm  $\times$  1,5 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit dem äquilibrierenden Puffer; die Durchflußgeschwindigkeit betrug etwa 20 ml/h. Die Eluate wurden in Fraktionen von etwa 1,5 ml in einem LKB-Ultra-Rac-Faktionensammler aufgefangen.

##### d. DEAE-Chromatographie

Die nach Gelfiltration gewonnenen enzymaktiven Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingeengt, auf eine mit Medium I äquilierte DEAE-Sephadex-Säule (30 cm  $\times$  1,5 cm) aufgetragen und mit 50 ml des äquilibrierenden Puffers in den Ionen-austauscher eingewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Puffer-Gradienten, der

durch das Mischen zweier konstanter Volumina (100 ml) von Medium I und II hergestellt wurde.

#### e. Isoelektrofokussierung

Die nach Ionenaustauschchromatographie erhaltenen enzymaktiven Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingeengt und nach Vesterberg und Svensson<sup>13</sup> in einer 110 ml Säule (Fa. LKB Producter AB, Stockholm, Schweden) bei 4 °C in einem automatisch hergestellten Saccharose-Dichte-Gradienten, dem 20-prozentiges Glycerin (v/v) zugesetzt wurde, isoelektrofokussiert. Zur Ausbildung der pH-Gradiente wurden Trägerampholyte (Standardampholin (40%) der Fa. LKB) für den pH-Bereich 3,5–10 verwendet. Anodenpuffer: *o*-Phosphorsäure, Kathodenpuffer: Äthyldiamin. Nach Abfall der Stromstärke auf einen konstanten Wert wurde für 36 h bei 800 V isoelektrofokussiert. 3 ml-Fraktionen wurden gesammelt und der pH-Wert, die  $17\beta$ -HSD-Aktivität und der Proteingehalt bestimmt.

#### f. Gelektrophorese

Zur Isoelektrofokussierung der gereinigten  $17\beta$ -HSD in Polyacrylamid wurden die Methoden von Wrigley<sup>14</sup> und Rodbard und Chrambach<sup>15</sup> modifiziert. Durchführung: Fokussierung bei 20 °C für 3 h bei 1,0 mA/Gel, 0,5 ml Enzymlösung wurde auf den Gelzylinder (Durchmesser 8 mm) aufgetragen (5% Acrylamid – 0,2% Bis-acrylamid, 20% (v/v) Glycerin, 1% Ampholin, pH 3,5–10), Photopolymerisation mit Riboflavin (4 mg/100 ml). Als Anodenlösung diente 0,02% *o*-Phosphorsäure, als Kathodenlösung 0,02% Äthanolamin. Zur Darstellung der  $17\beta$ -HSD-Aktivität wurden die Gele bei 37 °C für 2 h in der Dunkelheit in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung inkubiert: 5 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,4, 0,5 ml NAD (5 mg/ml), 0,25 ml Phenazin Methosulfat (0,25 mg/ml), 1,5 ml Nitroblautetrazolium (1,7 mg/ml) und 0,4 ml Steroid (2,7 mg/ml Äthanol).

#### Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der aus der Mikrosomenfraktion separierten und angereicherten  $17\beta$ -HSD-Aktivität wurde mit Hilfe von Eichproteinen durch Gelfiltration an BioGel A-0,5 m vorgenommen (Chromatographiesäule: 90 cm × 1,5 cm).

Die Elutionsvolumina der Enzymaktivitäten und der Eichproteine zeigten gut reproduzierbare Werte.

#### Ergebnisse

##### 1. Einfluß von Phospholipase A bzw. D auf den Phospholipidgehalt in Humanplacenta-Mikrosomen

Wie Tab. I zeigt, nimmt durch Phospholipase-Hydrolyse der Gehalt an Phospholipiden, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums fixiert sind, in unterschiedlichem Ausmaß – bezogen auf die Einzelphosphatide – ab; so werden durch Phospholipase A innerhalb von 60 min 74% des Lecithins abgebaut, durch Phospholipase D 82%. Die Phospholipase-Hydrolyse ist mit einem Verlust von Protein verbunden, das im Waschwasser des 158 000 × g-Sediments Phospholipase-behandelter Mikrosomen nachweisbar ist. Da keine proteolytischen Fremdaktivitäten in den Phospholipase-Präparationen feststellbar waren, ist der Proteinverlust auf die Zerstörung der Mikrosomenlamelle durch die Hydrolyse der Phospholipide, die an der Stabilisierung der komplexen Struktur beteiligt sind, zurückzuführen. Wie für micellar verteilt Phospholipid liegt das pH-Optimum der Hydrolyse mikrosomal gebundener Phospholipide durch Phospholipase D zwischen 5,2 und 5,8, für Phospholipase A zwischen 7,6 und 8,4 (Abb. 1). Das Maß für die Phospholipase-Aktivität war die Aktivitätsabnahme der

Tab. I. Phospholipidgehalt nativer und mit Phospholipase A bzw. D behandelter Mikrosomen aus der Humanplacenta. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“.

	Zeitdauer [min]	Gesamt- Protein [mg/0,1 ml]	Gesamt- Phospho- lipoid	Sphingo- myelin [nÄquiv. P/mg Protein]	Lecithin [nÄquiv. P/mg Protein]	Phospha- tidylinosit + Phospha- tidylserin	Phospha- tidyläthanol- amin
Native							
Mikrosomen	—	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9
Nach Phospholipase A-Behandlung	30	0,92	469,0	138,7	121,3	68,2	140,8
Nach Phospholipase D-Behandlung	60	0,78	330,9	111,3	48,8	49,1	121,7
Native							
Mikrosomen	—	1,21	434,9	126,1	103,9	61,8	143,1
Nach Phospholipase A-Behandlung	30	1,03	298,6	98,7	33,7	37,5	128,7
Nach Phospholipase D-Behandlung	60						

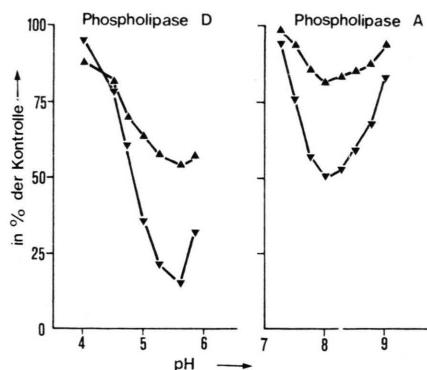


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Inaktivierung der  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A bzw. D. Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg (22 U) Phospholipase A (0,01 M Tris/HCl-Puffer) bzw. 3,7 mg (1,85 U) Phospholipase D (0,1 M Acetat-Puffer) in 3 ml, 37 °C, Inkubationsdauer: 30 min. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“. ▲,  $E_2 \rightarrow E_1$ ,  $17\beta$ -HSD; ▼, Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion,  $17\beta$ -HSD. Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (= 100%).

mikrosomalen  $17\beta$ -HSD, die – wie Extraktionsstudien gezeigt haben<sup>9</sup> – in linearer Beziehung korreliert ist mit dem Phospholipoidgehalt der Mikrosomenfraktion.

## 2. Inaktivierung der mikrosomalen $17\beta$ -HSD durch Phospholipase A bzw. D

Abb. 2 zeigt, daß nach 30 min Phospholipase A-Behandlung eine Restaktivität für die  $17\beta$ -HSD mit

$E_2$  als Substrat von 61%, für Testosteron von 13% meßbar ist (Coenzym: NAD). Phospholipase D-Behandlung ergab nach 30 min für  $E_2$  und NAD 71% Restaktivität; für Testosteron lag der Wert bei 27%. Eine vollständige Inaktivierung wurde unter Phospholipase A-Behandlung nach 120 min erreicht, wenn Testosteron als Substrat der  $17\beta$ -HSD eingesetzt wurde.

Bei einem Verhältnis von Mikrosomenprotein (in mg) zu Phospholipase-Aktivität (in Units) von 5:1 für Phospholipase A bzw. 100:1 für Phospholipase D wird die Geschwindigkeit der Phospholipid-Hydrolyse bzw. der Inaktivierung der  $17\beta$ -HSD soweit herabgesetzt, daß die Kinetik der Inaktivierung als Reaktion nullter Ordnung sich darstellt (Abb. 3). Bei Verwendung höherer Phospholipase-Aktivitäten fällt die Aktivität der  $17\beta$ -HSD sprunghaft in bezug auf die Ausgangsaktivität ab.

### 3. Reaktivierung der mikrosomalen $17\beta$ -HSD nach Inaktivierung durch Phospholipase A bzw. D

Die nach Einwirkung von Phospholipase A bzw. D für 30 min partiell inaktivierte  $17\beta$ -HSD konnte durch Inkubation mit micellar verteilten definierten Phospholipoiden bzw. einer Phospholipoidgesamtfraktion aus Humanplacenta-Mikrosomen bei pH 7,4 (0,15 M Phosphat-Puffer) in unterschiedlichem Ausmaß reaktiviert werden (Abbn. 4 a und 4 b). Um einen maximalen Wert zu erreichen, müssen 0,1 – 0,4 mg Phospholipoid pro ml Inkubationslösung den Reaktivierungsansätzen zugesetzt werden. Auf-

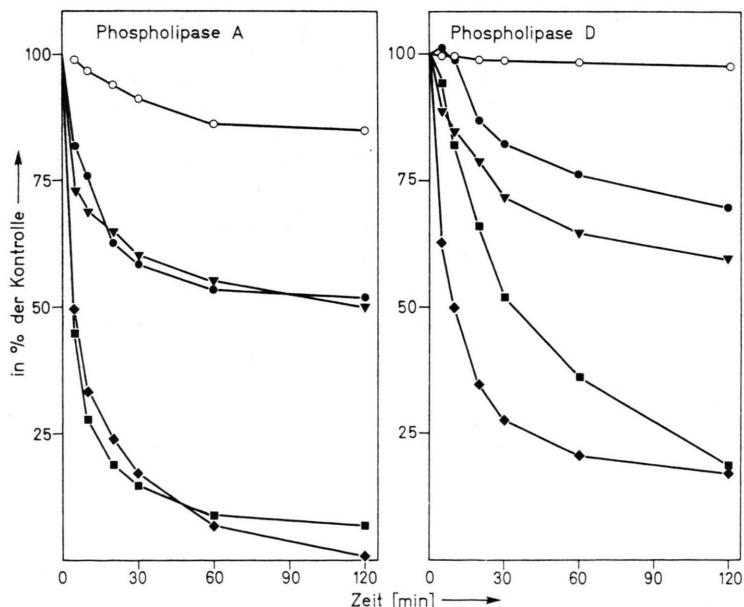


Abb. 2. Zeitliche Abhängigkeit der Inaktivierung der  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten der Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A bei pH 8,0 und Phospholipase D bei pH 5,6. Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg Phospholipase A bzw. 3,7 mg Phospholipase D in 3 ml, 37 °C. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“. ●, NADP, ▽ NAD ( $E_2 \rightarrow E_1$ ,  $17\beta$ -HSD); □, NADP, ◆, NAD (Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion,  $17\beta$ -HSD); ○, Kontrolle ohne Phospholipasen,  $E_2 \rightarrow E_1$ ,  $17\beta$ -HSD. Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (= 100%).

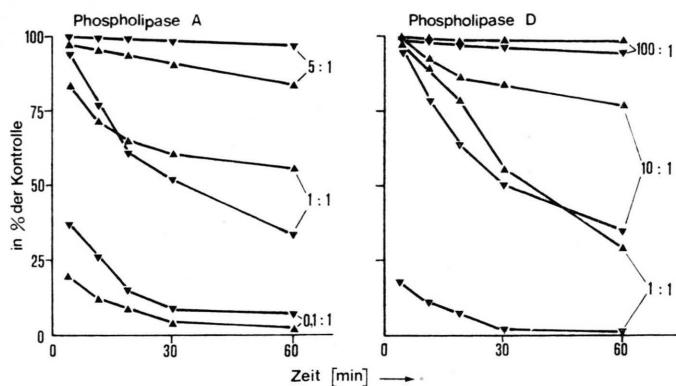


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten in Abhängigkeit vom Verhältnis Mikrosomenprotein (in mg) zu Phospholipase A- bzw. D-Aktivität (in Units). Versuchsbedingungen: 22 mg Mikrosomenprotein in 3 ml (Phospholipase A: 0.01 M Tris/HCl, pH 8.0, Phospholipase D: 0.1 M Acetat-Puffer, pH 5.6), 37 °C, 30 min. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“. ▲,  $E_2 \rightarrow E_1$ ,  $17\beta$ -HSD; ▼, Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion,  $17\beta$ -HSD. Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (= 100%).

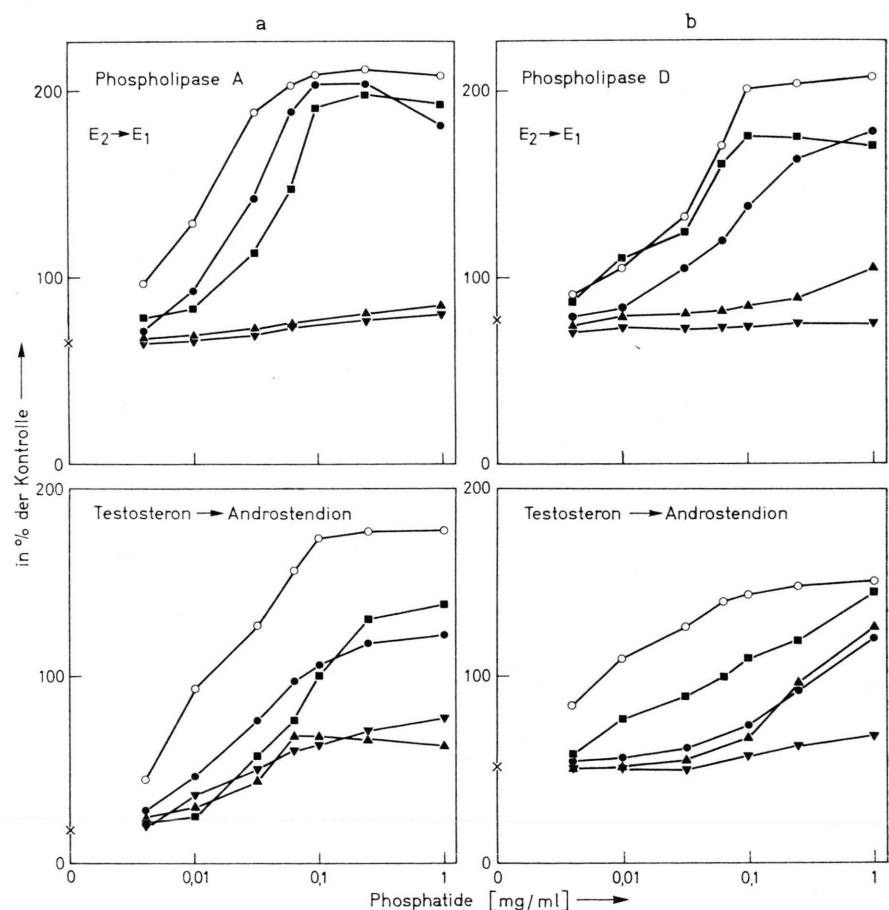


Abb. 4. Reaktivierung der durch Phospholipase A (Abb. 4 a) bzw. Phospholipase D (Abb. 4 b) inaktivierten mikrosomalen  $17\beta$ -HSD durch Phospholipide. Versuchsbedingungen vergleiche „Material und Methodik“.

●, Lecithin;  
■, Sphingomyelin;  
▲, Phosphatidyläthanolamin;  
▲, Phosphatidyläthanol- $\alpha$ min;  
○, Gesamtporpholipide der Humanplacenta-Mikrosomen, die durch Extraktion nach Folch<sup>15</sup> gewonnen wurden.

Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (=100%).

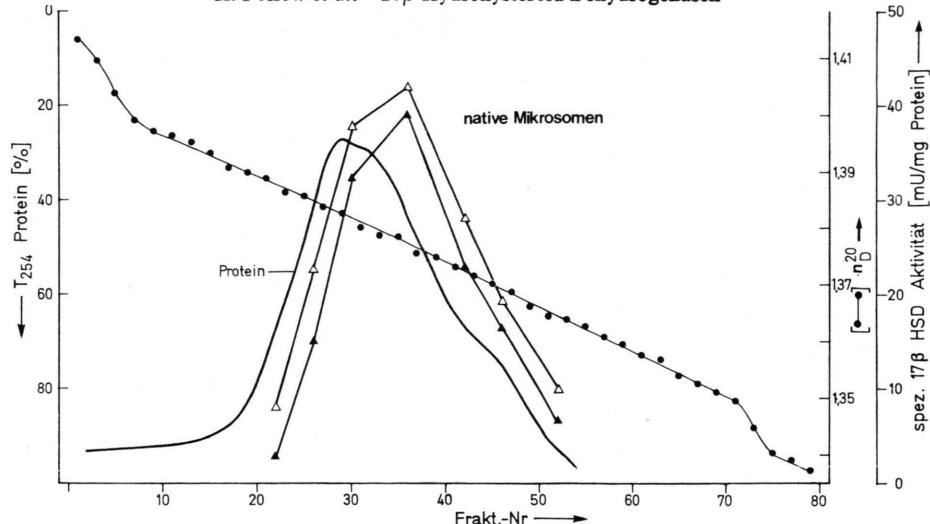


Abb. 5. Zonentrifugation zweimal gewaschener nativer Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten (12–55 proz. G/V). Einzelheiten siehe „Material und Methodik“. Ordinaten: Proteingehalt der Mikrosomenfraktion in % der Transmission bei 254 nm, Dichte des Mediums ( $n_D^{20}$ ), spezifische  $17\beta$ -HSD-Aktivität ( $\Delta$ ,  $E_2 \rightarrow E_1$ ,  $\blacktriangle$ , Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion). Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

fallend ist, daß nach Sphingomyelin-, Lecithin- und Mikrosomengesamtphospholipoid-Zusatz die spezifische Aktivität der  $17\beta$ -HSD höher liegt als in un behandelten Mikrosomen (= Kontrolle).

#### 4. Phospholipoid- und $17\beta$ -HSD-Aktivitätsverteilung in nativen und Phospholipase A- bzw. D-behandelten Mikrosomen nach Zonalzentrifugation

Werden die zweimal gewaschenen nativen Mikrosomen in einem linear ansteigenden Dichtegradienten

aus Saccharose unter den im methodischen Teil beschriebenen Bedingungen zentrifugiert (Abb. 5), zeigt sich eine kontinuierliche Verteilung der einzelnen Proteinfraktionen zwischen 1,36 bis 1,39 ( $n_D^{20}$ ). Das Maximum der spezifischen  $17\beta$ -HSD-Aktivität fällt nicht mit dem Maximum der Proteinelutionskurve zusammen; es ist einer weniger dichten Partikelpopulation zuzuordnen. Nach Phospholipase A- bzw. D-Behandlung der Mikrosomenfraktion sedimentieren die mikrosomalen Subpartikel in den ver

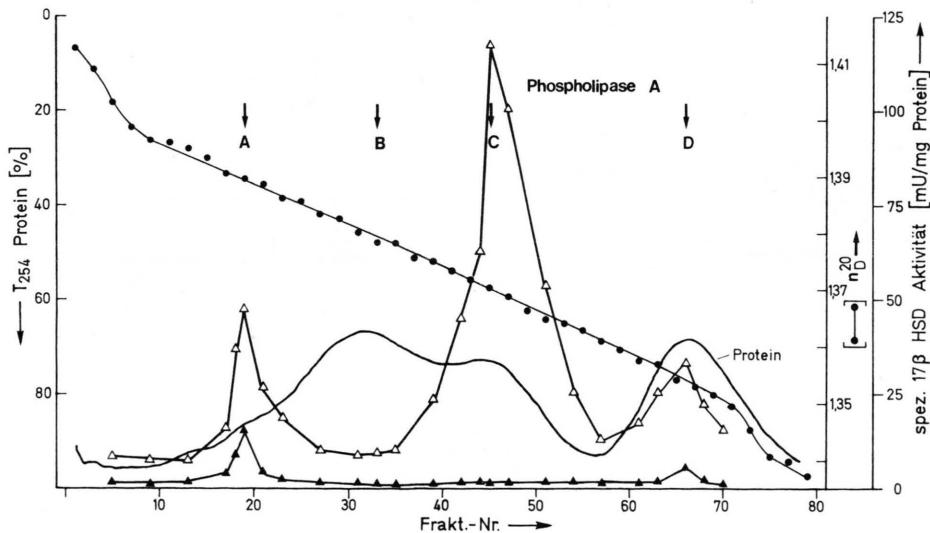


Abb. 6. Zonentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml  $0,01 \text{ M}$  Tris/HCl,  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 8,0, bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $1,1 \text{ mg}$  Phospholipase A inkubiert. Die Reaktion wurde durch  $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  EDTA-Zugabe beendet. Einzelheiten siehe „Material und Methodik“, Symbole vergleiche Legende zu Abb. 5. Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

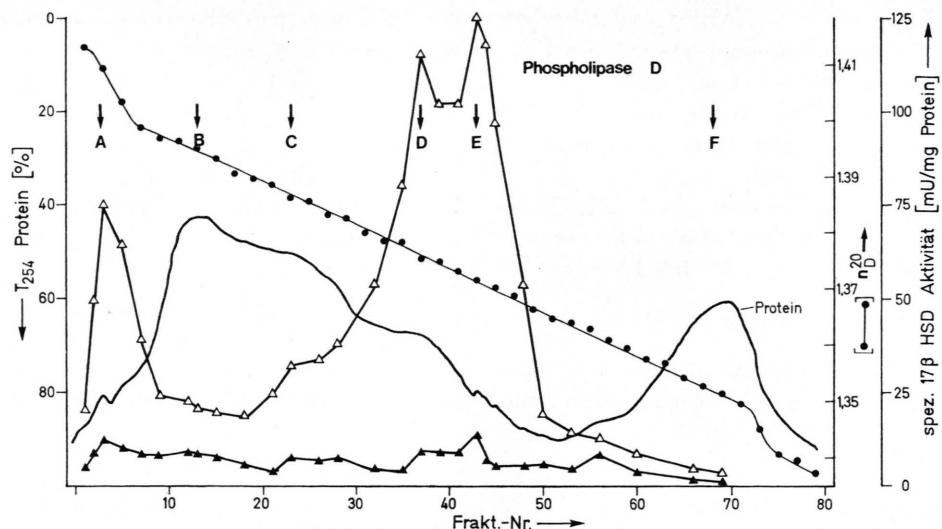


Abb. 7. Zonentrifugation Phospholipase D-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml 0,1 M Acetat-Puffer,  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{CaCl}_2$ , pH 5,6, bei 37 °C mit 37 mg Phospholipase D inkubiert. Einzelheiten siehe „Material und Methodik“. Symbole vergleiche Legende zu Abb. 5. Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

schiedenen Fraktionen des Dichtegradienten in einer heterogenen Verteilung (Abbn. 6 und 7). Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 36 h hat keinen zusätzlichen Einfluß auf das Sedimentationsverhalten. Die  $17\beta$ -HSD zeigt eine über die verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten unterschiedliche Verteilung auf schwere und weniger schwere Mikrosomensubfraktionen. Die  $E_2$ -umsetzende  $17\beta$ -HSD

reagiert gegenüber Phospholipase-Hydrolyse weniger empfindlich als das Testosteron-umsetzende Enzym.

Die Tab. II enthält Angaben über die spezifische  $17\beta$ -HSD-Aktivität und den Phospholipoidgehalt der Original-Mikrosomen und der in Abb. 6 und Abb. 7 bezeichneten Fraktionen des Dichtegradienten. Nach diesen Ergebnissen wird nach Phospholipase-Hy-

Tab. II. Phospholipoidgehalt und  $17\beta$ -HSD-Aktivitätsverteilung verschiedener Fraktionen von Zonalläufen Phospholipase A- bzw. D-behandelter Humanplacenta-Mikrosomen (Abbn. 6 und 7). I:  $E_2 \rightarrow E_1$ , II: Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion.

Fraktionen	Protein [mg/ 0,1 ml]	Gesamt- Phospho- lipoid	Sphingo- myelin [nÄquiv. P/mg Protein]	Lecithin	Phospha- tidylinosit + Phospha- tidylserin	Phospha- tidyl- äthanol- amin	Spez. Akt. $17\beta$ -HSD I [mU/mg Protein]	Spez. Akt. $17\beta$ -HSD II [mU/mg Protein]
Native Mikrosomen	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9	42	40,2
Phospholipase A-Zonal- lauf (Abbn. 6)								
A	0,15	23	15,7	15,3	2,7	7,9	48	18,3
B	0,59	88	5,1	7,3	33,4	27,5	9,8	1,0
C	0,45	67	21,8	25,3	6,8	9,2	123	0,8
D	0,53	79	11,3	18,8	12,8	19,1	42	6,8
Phospholipase D-Zonal- lauf (Abbn. 7)								
A	0,14	21	17,3	15,3	2,3	5,6	81,8	10,3
B	0,72	108	7,3	5,8	33,8	34,6	23,2	7,8
C	0,57	86	11,4	9,5	13,7	22,3	32,6	6,3
D	0,29	43	18,1	21,3	6,1	10,8	116,8	8,4
E	0,15	23	28,3	21,7	3,3	7,3	124,4	10,1
F	0,52	78	8,6	3,8	18,1	33,2	4,1	1,0

droylse die E<sub>2</sub>-„sensitive“ 17 $\beta$ -HSD gegenüber der Aktivität in nativen Mikrosomen etwa 3-fach angereichert (jeweils aktivste Fraktion). Außerdem wird deutlich, daß die nach Phospholipase-Hydrolyse sich in den Dichtegradienten heterogen verteilenden Mikrosomen-Subfraktionen unterschiedliche Phospholipoid-Muster aufweisen, wobei ein relativ hoher Sphingomyelin- bzw. Lecithin-Gehalt mit einer relativ hohen spezifischen Enzymaktivität korreliert ist.

### 5. Reinigung der mikrosomalen 17 $\beta$ -HSD

Die nach Aufschluß der Mikrosomen mit Phospholipase A und anschließender Zonalzentrifugation

der hydrolysierten Mikrosomen in einem linearen Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 6) erhaltene Fraktion D (Frakt. Nr. 60–75) wurde zur Anreicherung der E<sub>2</sub>- und der Testosteron-„sensitiven“ 17 $\beta$ -HSD vier Einzelschritten, die in der Tab. III zusammengefaßt dargestellt sind, unterworfen: Fraktionierte (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Isoelektrofokussierung.

Das nach 40–50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sättigung gewonnene enzymaktive Präzipitat wurde an BioGel A-0,5 m chromatographiert (Abb. 8). Die 17 $\beta$ -HSD eluierte als einheitlicher Gipfel, die Enzympräpara-

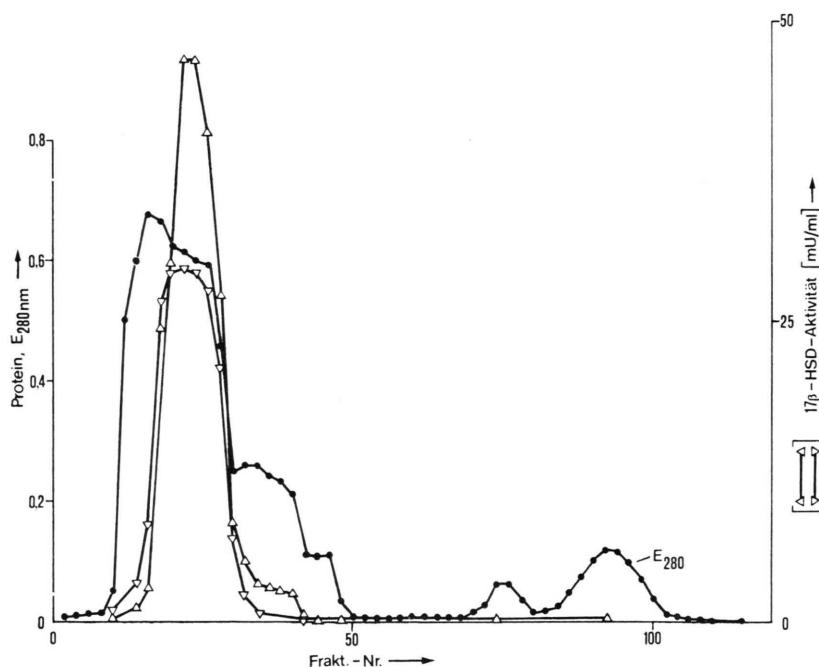


Abb. 8. Agarose-Gelfiltration eines (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Präzipitats mikrosomaler Subpartikel, die nach Zonenzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhalten wurden. Die nach Zonenzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhaltenen Fraktionen (60–75, Abb. 6) wurden durch Dialyse gegen Medium I einer fraktionierten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung unterworfen. Das enzymaktive Präzipitat (40–50-prozentige Sättigung) wurde in 3 ml Medium I gelöst und auf eine BioGel A-0,5 m Säule (90 cm × 1,5 cm) aufgetragen und mit äquilibrierendem Puffer (Medium I) eluiert. Einzelheiten siehe „Material und Methodik“. ●, Protein, E<sub>280</sub>; △, E<sub>2</sub> → E<sub>1</sub>, 17 $\beta$ -HSD; ▽, Testosteron → Androstendion, 17 $\beta$ -HSD.

Tab. III. Isolierung, Anreicherung und Ausbeute der E<sub>2</sub>- bzw. der Testosteron-„sensitiven“ 17 $\beta$ -HSD aus Humanplacenta-Mikrosomen. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“.

Reinigungsstufe	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [nU] E <sub>2</sub>	Gesamtaktivität [nU] Test.	Spez. Aktivität [mU/mg Prot.] E <sub>2</sub>	Spez. Aktivität [mU/mg Prot.] Test.	Ausbeute [%] E <sub>2</sub>	Ausbeute [%] Test.	Anreicherung [n-fach] E <sub>2</sub>	Anreicherung [n-fach] Test.
Native Mikrosomen	112	4704	4502	42	40,2	100	100	—	—
Fraktion D nach Zonal-lauf Phospholipase A-behandelter Mikrosomen (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40%–50% Sättigung	28	924	713	33	25,5	19,6	24,3	—	—
Agarose	11,3	814	511	72	45,2	17,3	18,1	1,7	1,1
DEAE-Sephadex	3,8	802	468	211	123	17	15,9	5,0	3,1
Isoelektrofokussierung (aktivste Fraktion)	1,2	502	391	418	324	10,7	14,6	10,0	8,1
	0,45	487	314	1083	698	10,4	12,9	25,8	17,4

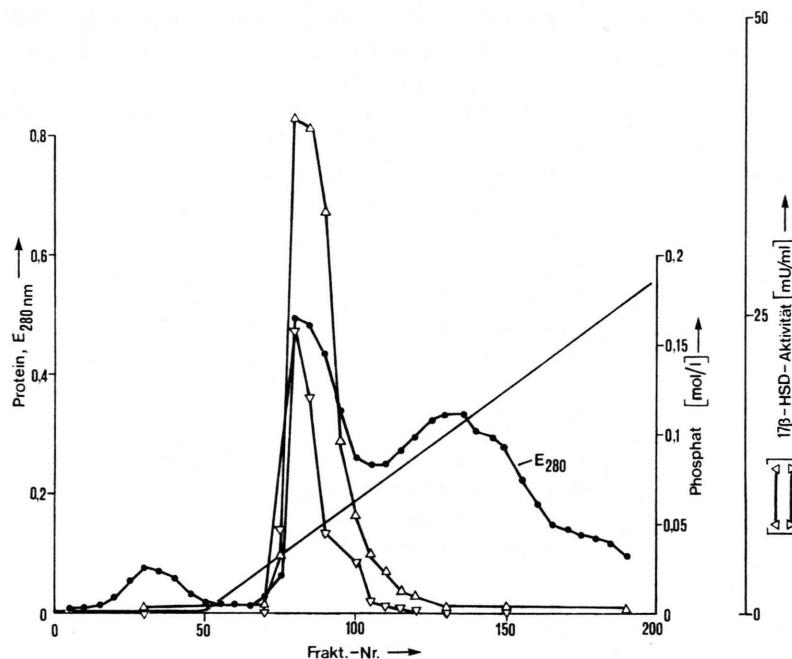


Abb. 9. DEAE-Sephadex-Ionenaustrauschchromatographie der enzymaktiven Fraktionen nach Agarose-Gelfiltration (Abb. 8). Die Chromatographiesäule (30 cm × 1,5 cm) wurde mit Medium I äquilibriert, die Enzympräparation (Agarose-säulenluft) mit 50 ml Medium I in die Säule eingewaschen und die Proteine mit einer linearen Puffergradienten aus Medium I und II eluiert. Einzelheiten siehe „Material und Methoden“. Symbole vergleiche Abb. 8.

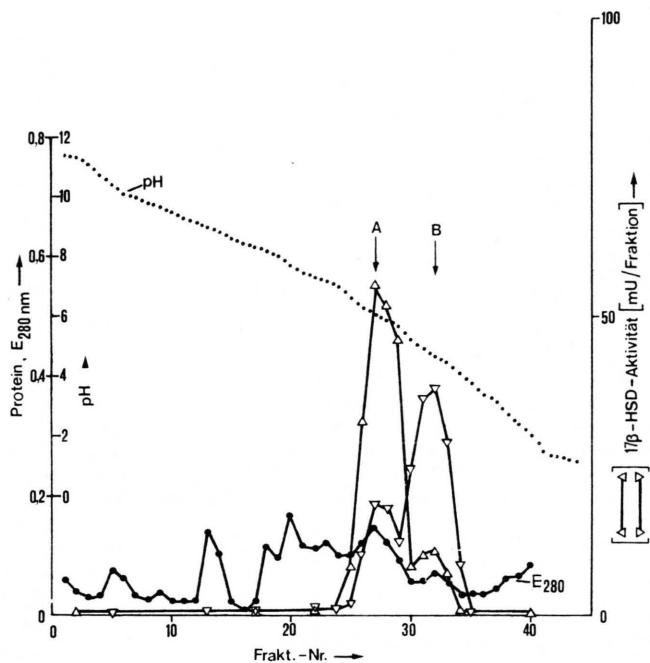


Abb. 10. Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten 3,5–10 der enzymaktiven Fraktionen nach DEAE-Sephadex-Ionenaustrauschchromatographie. 110 ml LKB Elektrofokussiersäule, automatisch hergestellte Saccharose-Dichtegradienten, Trägerampholite pH 3,5–10. Einzelheiten siehe „Material und Methoden“. pH-Wert wurde in jeder Einzelfraktion bestimmt. Symbole vergleiche Abb. 8.

tion wurde anschließend über eine DEAE-Sephadex-Säule mit einem linearen Phosphat-Konzentrationsgradienten eluiert (Abb. 9). Die so gewonnene Enzympräparation wurde durch Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten von 3,5–10 in zwei

$17\beta$ -HSD aktive Proteinfaktionen separiert, wobei die bei pH 6,0 präzipitierende die  $E_2$ -„sensitive“  $17\beta$ -HSD-Aktivität enthielt und die bei pH 4,9 die Testosteron-„sensitive“ (Abb. 10). Die  $E_2$ -„sensitive“  $17\beta$ -HSD (Fraktion A) wurde 25,8-fach und

die Testosteron-„sensitiven“ 17 $\beta$ -HSD (Fraktion B) 17,4-fach angereichert (Tab. III).

Der gesamte Reinigungsvorgang dauerte ca. 7 Tage. Die proteinchemische Einheitlichkeit der gereinigten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten wurde durch Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgel geprüft. Die Lage des enzymatischen Proteinpräzipitats wurde durch enzymspezifische Anfärbung *in vitro* – wie im methodischen Teil beschrieben – ermittelt. Zwei dicht beieinanderliegende Proteinbanden unterschiedlicher Farbintensität bei pH 6,0 und pH 4,9 repräsentierten die 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten (Abb. 11\*). Verunreinigungen durch Fremdproteine waren in den reinsten Präparationen zu vernachlässigen.

### 6. Molekulargewicht

Die Molekulargewichte der E<sub>2</sub>-„sensitiven“ bzw. Testosteron-„sensitiven“ 17 $\beta$ -HSD wurden mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichts durch vergleichende Gelfiltration an Agarose-Gel (BioGel A-0,5 m) zu 93 000 bzw. 192 000 ermittelt (Abb. 12).

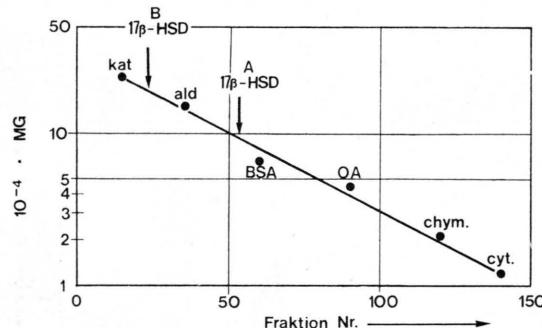


Abb. 12. Bestimmung der Molekulargewichte der aus der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta separierten 17 $\beta$ -HSD durch Gelfiltration. A: Fraktion A nach Isoelektrofokussierung; B: Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Bedingungen: BioGel A-0,5 m (Säule: 90 × 1,5 cm), Temperatur 4 °C. Elution mit Medium I. Eichproteine: kat.: Katalase, ald.: Aldolase, BSA: Rinderserumalbumin, OA: Ovalbumin, chym.: Chymotrypsinogen A, cyt.: Cytochrom c, 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Zur weiteren Absicherung der Molekulargewichte müßten allerdings weitere Methoden, wie z. B. Verhalten bei Dichtegradienten-Zentrifugation und Dodecylsulfat-Elektrophorese herangezogen werden.

### Diskussion

Die Ergebnisse, wonach die im endoplasmatischen Retikulum der Humanplacenta strukturgebundene

17 $\beta$ -HSD durch Inkubation mit Phospholipase A bzw. D inaktiviert wird, bestätigen eine frühere Untersuchung von Pollow *et al.*<sup>9</sup>, daß Membranlipide aktivierend auf die mikrosomale 17 $\beta$ -HSD wirken.

Die mikrosomal gebundenen Phospholipide sind – wie an Hand von Modellversuchen entwickelte Vorstellungen vermuten lassen – durch hydrophobe Wechselwirkung, Wasserstoff-Brücken und ionische Bindungen („ion pairing“ zwischen den basischen Aminosäureresten und den Phosphatgruppen der Phospholipide) mit den Membranlipiden verknüpft<sup>16–20</sup>. Phospholipase A hydrolysiert die an C-1 gebundene Fettsäure der Phospholipide unter Bildung von Lysolipiden; Phospholipase D spaltet den zwitterionischen Rest unter Bildung von Phosphatidsäuren ab.

Die Inaktivierung der mikrosomalen 17 $\beta$ -HSD als Folge des Phospholipoidverlustes ist reversibel. Durch Rekombination Phospholipase-behandelter Mikrosomen mit isolierten und gereinigten Phospholipiden oder mit einer durch Extraktion der Mikrosomen gewonnenen Fraktion natürlicher Membranlipide, kann die Inaktivierung aufgehoben werden. Die Reaktivierung mit Lecithin oder Sphingomyelin ist wirkungsvoller als mit Phosphatidyläthanolamin oder Phosphatidylserin. Die spezifische Aktivität der reaktivierten 17 $\beta$ -HSD liegt höher als in unbehandelten Mikrosomen. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist einmal in der Tatsache zu suchen, daß durch Phospholipase-Behandlung Proteine verlorengehen, die Fremdaktivitäten bzw. Strukturproteine darstellen. Zum anderen ist nicht auszuschließen, daß die Phospholipide nicht als Strukturelemente im Mikrosomenaufbau fungieren, sondern durch Wechselwirkung mit den strukturgebundenen Enzymaktivitäten eine Aktivierung und Stabilisierung der enzymatisch aktiven Konformation der Membranproteine erreichen.

Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Duterra *et al.*<sup>17</sup>, Martonosi *et al.*<sup>18</sup> und Staudinger *et al.*<sup>19</sup>, die sich mit der Korrelation zwischen Phospholipidgehalt und Enzymaktivität von membrangebundenen Enzymen (Glukose-6-Phosphatase, ATPase, NADH-Cytochrom-c-Reduktase, 3-Oxo-steroid- $\Delta^4$ -Dehydrogenase, NADH: Semidehydroascorbinsäure-Oxidoreduktase) befaßt haben.

\* Abb. 11 siehe Tafel auf S. 16 a.

Aus der Wirkung der Phospholipasen vom Typ A bzw. D auf die Aktivität der mikrosomal gebundenen  $17\beta$ -HSD lassen sich Aussagen über den Mechanismus der Aktivierung mikrosomaler Enzymaktivitäten durch Phospholipoide ableiten: 1. Es ist wahrscheinlich, daß die  $17\beta$ -HSD als stöchiometrischer Komplex des Enzymproteins mit Sphingomyelin bzw. Lecithin, also als „Lipoproteid-Enzym“ aufgefaßt werden kann, und nicht – wie von Staudinger *et al.*<sup>20</sup> für die NADH: Semidehydroascorbinsäure-Oxidoreduktase beschrieben – auf micellarer Ebene von den Membranlipoiden als oberflächenaktive Substanzen unspezifisch beeinflußt wird. 2. Die nach Hydrolyse gebildeten Lysolipide und Phosphatidsäuren stabilisieren die enzymatisch aktive Konformation der in der phospholipoidreichen Mikrosomenlamelle fixierten  $17\beta$ -HSD nicht.

Die Zonalzentrifugationen haben gezeigt, daß durch Phospholipase-Hydrolyse von Original-Mikrosomen unterschiedlich dichte Partikelpopulationen, die von der Größe der mikrosomalen Vesikel abhängen, gebildet werden. Die Mehrigkeit der Verteilung der  $17\beta$ -HSD-Aktivität in den fragmentierten Mikrosomen – im Gegensatz zu der kontinuierlichen Aktivitätsverteilungskurve bei Auf trennung von unbehandelten Original-Mikrosomen durch Zonalzentrifugation – zeigt, daß Partikelpopulationen mit unterschiedlichem Enzymbesatz entstehen. Die im Startgipfel (Fraktion D, Abb. 6) des Zonal laufs Phospholipase A-behandelter Mikrosomen repräsentierten Partikelpopulationen niedriger Dichte bzw. Proteine, die aus dem durch Phospholipase-Hydrolyse zerstörten integrierten Membranverband abgelöst wurden, wurden durch klassische Methoden der Reinigung von löslichen Enzymaktivitäten in ein E<sub>2</sub>-„sensitives“ und ein Testosteron-„sensitives“  $17\beta$ -Enzym separiert. Der Reinheitsgrad war charakterisiert durch einen Anreicherungsfaktor von 25,8 für E<sub>2</sub>- $17\beta$ -HSD bzw. 17,4 für Testosteron- $17\beta$ -HSD.

Offen bleiben muß die Frage, ob die im Endreinigungsschritt durch Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten 3,5 – 10 im Säulen- bzw. Poly-

acrylamidgel-Verfahren gewonnenem isoelektrischen Punkte für die  $17\beta$ -HSD-aktiven Fraktionen A und B, denen der „natürlichen“ in die Membran eingebetteten Enzymproteine entsprechen. Es muß in Betracht gezogen werden, daß die mit der Proteinstruktur eng verflochtenen Phospholipoide Teile der Proteinoberfläche maskieren, so daß nach partiellem Proteinverlust durch Phospholipase-Hydrolyse Proteinbezirke freigesetzt werden, die eine Veränderung des Wanderungsverhaltens der separierten mikrosomalen  $17\beta$ -HSD-Enzymproteide im elektrischen Feld bewirken. Argumente hierfür liefert die Beobachtung von Pollow *et al.*<sup>9</sup>, daß nach Aceton-Extraktion der Mikrosomenmembran, die zu einem Gesamtphospholipoid-Verlust von ca. 65% führt, die gewonnenen  $17\beta$ -HSD-aktiven Proteinzenonen nach Isoelektrofokussierung bei anderen isoelektrischen Punkten (pH 7,2 und pH 5,8) präzipitieren.

Die Frage, ob das Vorliegen multipler Enzymformen der mikrosomalen  $17\beta$ -HSD mit verschiedenen isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten strukturelle Ursachen hat oder ob es sich um verschiedene Assoziationsformen der gleichen Unter einheit handelt, muß offenbleiben, da noch zu wenige Befunde darüber vorliegen. Für die zweite Möglichkeit spricht, daß der nach Gelfiltration zur weiteren Präparation vereinigte Molekulargewichtsbereich von etwa 85 000 bis 120 000 nach Ionenaustauschchromatographie und Isoelektrofokussierung in zwei  $17\beta$ -HSD-aktive Proteinfraktionen separierbar ist, die die Molekulargewichte von 192 000 bzw. 93 000 aufweisen. Das bedeutet, daß während der Reinigungsprozedur eine höhermolekulare Assoziationsform des „Untereinheitengewichts“ von ca. 93 000 entstanden ist.

Über die enzymkinetischen Parameter der gereinigten und separierten  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta und über die zellphysiologische Funktion zweier substratunterschiedlich katalysierender  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten wird in der nachfolgenden Arbeit<sup>21</sup> berichtet werden.

<sup>1</sup> K. Pollow, G. Sokolowski, H. Grunz u. B. Pollow, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **355**, 501 [1974].

<sup>2</sup> L. J. Langer u. L. L. Engel, J. Biol. Chem. **233**, 583 [1958].

<sup>3</sup> J. Jarabak, J. A. Adams, H. G. Williams-Ashman u. P. Talalay, J. Biol. Chem. **237**, 345 [1962].

<sup>4</sup> H. J. Karavolas, M. L. Baedecker u. L. L. Engel, J. Biol. Chem. **245**, 4948 [1970].

<sup>5</sup> D. J. W. Burns, L. L. Engel u. J. L. Bethune, Biochemistry **11**, 2699 [1972].

<sup>6</sup> Ch. Chang-chen u. J. C. Warren, Steroids **22**, 373 [1973].

<sup>7</sup> W. D. Lehmann u. H. Breuer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **348**, 1633 [1967].

<sup>8</sup> K. Pollow u. B. Pollow, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 1257 [1971].

- <sup>9</sup> K. Pollow, W. Runge, B. Pollow, H. Grunz, W. R. Willem u. J. Schmalbeck, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 705 [1973].
- <sup>10</sup> J. Folch, M. Lees u. G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem. **226**, 497 [1957].
- <sup>11</sup> G. R. Bartlett, J. Biol. Chem. **234**, 466 [1959].
- <sup>12</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1951].
- <sup>13</sup> O. Vesterberg u. H. Svensson, Acta Chem. Scand. **20**, 820 [1966].
- <sup>14</sup> C. Wrigley, Sci. Tools **15**, 17 [1968].
- <sup>15</sup> D. Rodbard u. A. Chrambach, Anal. Biochem. **40**, 95 [1971].
- <sup>16</sup> A. Martonosi, J. Biol. Chem. **243**, 71 [1968].
- <sup>17</sup> S. M. Duttera, W. L. Byrne u. M. C. Ganoza, J. Biol. Chem. **243**, 2216 [1968].
- <sup>18</sup> A. Martonosi, J. Donley u. R. A. Halpin, J. Biol. Chem. **243**, 61 [1968].
- <sup>19</sup> H.-U. Schulze u. Hj. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **352**, 309 [1971].
- <sup>20</sup> H.-U. Schulze, H. Gallenkamp u. Hj. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 391 [1973].
- <sup>21</sup> K. Pollow, W. Runge u. B. Pollow, Z. Naturforsch. **30 c**, 17 [1975].

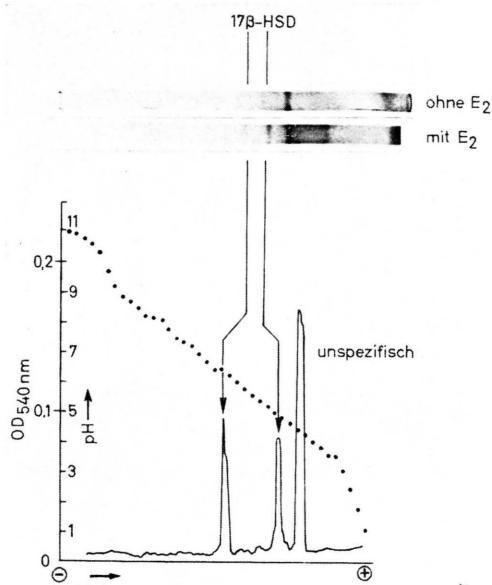


Abb. 11. Densitometrie der nach DEAE-Sephadex-Chromatographie durch Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung, pH 3,5–10, separierten aktiven Fraktion. Spezifische 17 $\beta$ -HSD-Aktivitätsfärbung mit E<sub>2</sub> als Substrat und NAD als Coenzym. Einzelheiten sind detailliert in „Material und Methodik“ dargestellt.

