

Solubilisierung, Anreicherung und Separierung zweier 17 β -HSD-Aktivitäten nach Phospholipase-Behandlung

Microsome-Associated 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases of Human Placenta, I
Solubilization, Enrichment and Separation of Two 17 β -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 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Human Placenta, Phospholipase, Microsomes

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

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

Solubilization of the microsomal 17 β -HSD was achieved by phospholipase A treatment. Two 17 β -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 β -HSD were determined.

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

Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [17 β -HSD] der Humanplacenta verteilt sich als lösliche Enzymaktivität in der Cytoplasma-Fraktion, strukturgebunden im endoplasmatischen Retikulum und ist mit der Außenmembran der Mitochondrien assoziiert^{1,2}. Die hochaktive lösliche 17 β -HSD, verschiedentlich hochangereichert und charakterisiert^{3–6}, katalysiert Oestradiol-spezifisch den Reaktionsschritt C₁₇-Hydroxy nach C₁₇-Oxo, was zu der Bezeichnung Oestradiol-„sensitives“-17 β -Enzym geführt hat. Dagegen sind die strukturgebundenen 17 β -HSD-Aktivitäten nicht an eine spezifische Konformation des Steroidkörpers gebunden; sie katalysieren reversibel die Reaktion C₁₇-Hydroxygruppe \rightleftharpoons C₁₇-Oxogruppe mit gleicher Reaktionsgeschwindigkeit von Ring-A-phenolischen Oestrogenen wie von C₁₉-Steroiden (z.B. Testosteron). Diese von Lehmann und Breuer⁷ und von Pollow *et al.*⁸ 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 C₁₇-Position von Oestradiol-17 β und der C₁₇-Position von Androstendion) katalysiert wird, führten zu der Vermutung, daß im Membransystem des endoplasmatischen Retikulums zwei substratunterschiedlich arbeitende 17 β -HSD-Aktivitäten vorhanden sind: Eine Oestradiol-„sensitives“-17 β -HSD und eine Testosteron-„sensitives“-17 β -HSD. In der vorliegenden Arbeit wird dieses geprüft. Das besondere Augenmerk liegt auf der Solubilisierung, Anreicherung und Separierung der in der Mikrosomenfraktion fixierten 17 β -HSD-Aktivitäten.

Die Solubilisierung der 17 β -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 β -HSD.

Material und Methodik

Trivialnamen und Abkürzungen

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 17 β -HSD;
Oestradiol-17 β , E₂; Oestron, E₁; 17 β -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 digitalized 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.

androst-3-on, Testosteron; 4-Androst-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

[4-¹⁴C]-E₂ (S.A. 58 mCi/mmol) und [4-¹⁴C]-Testosteron (S.A. 58,2 mCi/mmol) waren Handelspräparate (Radiochemical Centre, Amersham, England). Die Steroide wurden dünnschichtchromatographisch 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⁺, NADP⁺: 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 · 10⁻³ M CaCl₂, 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 · 10⁻³ 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 · 10⁻³ M CaCl₂, 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.*¹⁰ mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert und die Extrakte mit CaCl₂-Lösung gewaschen.

Zur Bestimmung des Phosphorgehalts wurde die Methode von Bartlett¹¹ nach Pollow *et al.*⁹ modifiziert.

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteine erfolgte nach Lowry *et al.*¹², als Eichprotein diente Rinderserumalbumin.

Reaktivierung der Phospholipase-behandelten Mikrosomenfraktion

Die Phospholipide 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 β -HSD-Aktivität bestimmt.

17 β -HSD-Aktivitätsbestimmung

Die 17 β -HSD-Aktivität wurde bestimmt durch Messung der Transformation von E₂ nach E₁ bzw. Testosteron nach Androstendion. Pro Inkubationsansatz wurde 0,1 μ Ci ¹⁴C-markiertes Steroid unter Zusatz von 10 μ 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⁺/NADP⁺ 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 eingengt.

Dünnschichtchromatographie der Steroid-Metaboliten

Als Trägermaterial diente Kieselgel F₂₅₄ (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 ¹⁴C- und ³H-Standards bestimmt: ¹⁴C = 18%, ³H = 1,2%.

Fraktionierung der Mikrosomen

a. Zonenzentrifugation

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

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-Fraktionensammler gesammelt.

Der Dichtegradient wurde über den Brechungsindex [n_D^{20}] der einzelnen Fraktionen mit dem Abbé-Refraktometer (Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.) bestimmt.

b. [NH₄]₂SO₄-Präzipitation

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

c. Gelchromatographie

Das (NH₄)₂SO₄-Präzipitat (35- bis 50-prozentige Sättigung) wurde in 3 ml Medium I gelöst und auf eine mit Medium I äquilibrierte 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-Fraktionensammler aufgefangen.

d. DEAE-Chromatographie

Die nach Gelfiltration gewonnenen enzymaktiven Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingengt, auf eine mit Medium I äquilibrierte DEAE-Sephadex-Säule (30 cm \times 1,5 cm) aufgetragen und mit 50 ml des äquilibrierenden Puffers in den Ionenaustauscher 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 Gefrier-trocknung eingengt und nach Vesterberg und Svensson¹³ 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-Gradienten wurden Trägerampholyte (Standard-ampholin (40%) der Fa. LKB) für den pH-Bereich 3,5–10 verwandt. Anodenpuffer: *o*-Phosphorsäure, Kathodenpuffer: Äthylendiamin. Nach Abfall der Stromstärke auf einen konstanten Wert wurde für 36 h bei 800 V isoelektrofokussiert. 3 ml-Frak-tionen wurden gesammelt und der pH-Wert, die 17 β -HSD-Aktivität und der Proteingehalt bestimmt.

f. Gelelektrophorese

Zur Isoelektrofokussierung der gereinigten 17 β -HSD in Polyacrylamid wurden die Methoden von Wrigley¹⁴ und Rodbard und Chrambach¹⁵ modifi-ziert. 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), Photopoly-merisation mit Riboflavin (4 mg/100 ml). Als Anodenlösung diente 0,02% *o*-Phosphorsäure, als Kathodenlösung 0,02% Äthanolamin. Zur Darstel-lung der 17 β -HSD-Aktivität wurden die Gele bei 37 °C für 2 h in der Dunkelheit in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung inkubiert: 5 ml H₂O, 2 ml 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,4, 0,5 ml NAD (5 mg/ml), 0,25 ml Phenazin Metho-sulfat (0,25 mg/ml), 1,5 ml Nitroblautetrazolium (1,7 mg/ml) und 0,4 ml Steroid (2,7 mg/ml Ätha-nol).

Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der aus der Mikrosomenfraktion separierten und angereicherten 17 β -HSD-Aktivität wurde mit Hilfe von Eichpro-teinen durch Gelfiltration an BioGel A-0,5 m vorge-nommen (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 Phospholipoidgehalt in Humanplacenta-Mikro-somen

Wie Tab. I zeigt, nimmt durch Phospholipase-Hydrolyse der Gehalt an Phospholipoiden, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums fixiert sind, in unterschiedlichem Ausmaß – bezo-gen 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 proteolyti-schen Fremdaktivitäten in den Phospholipase-Präpa-rationen feststellbar waren, ist der Proteinverlust auf die Zerstörung der Mikrosomenlamelle durch die Hydrolyse der Phospholipide, die an der Stabilisie-rung der komplexen Struktur beteiligt sind, zurück-zuführen. Wie für micellar verteiltes Phospholipoid liegt das pH-Optimum der Hydrolyse mikrosomal gebundener Phospholipoide durch Phospholipase D zwischen 5,2 und 5,8, für Phospholipase A zwis-chen 7,6 und 8,4 (Abb. 1). Das Maß für die Phos-pholipase-Aktivität war die Aktivitätsabnahme der

Tab. I. Phospholipoidgehalt 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	Phospha- tidylinosit + Phospha- tidylserin	Phospha- tidyläthanol- amin
Native							
Mikrosomen	—	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9
Nach Phospholipase	30	0,92	469,0	138,7	121,3	68,2	140,8
A-Behandlung	60	0,78	330,9	111,3	48,8	49,1	121,7
Nach Phospholipase	30	1,21	434,9	126,1	103,9	61,8	143,1
D-Behandlung	60	1,03	298,6	98,7	33,7	37,5	128,7

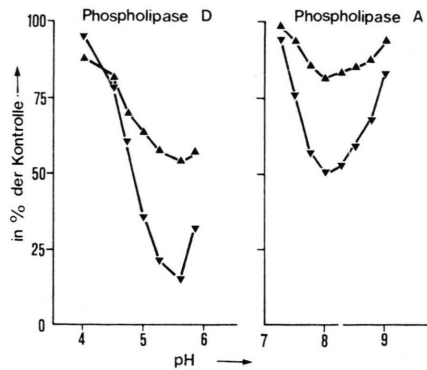


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Inaktivierung der 17 β -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A bzw. D. Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg (22 U) Phospholipase A (0,01 M Tris/HCl-Puffer) bzw. 3,7 mg (1,85 U) Phospholipase D (0,1 M Acetat-Puffer) in 3 ml, 37 °C,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

mikrosomalen 17 β -HSD, die – wie Extraktionsstudien gezeigt haben⁹ – in linearer Beziehung korreliert ist mit dem Phospholipoidgehalt der Mikrosomenfraktion.

2. Inaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD durch Phospholipase A bzw. D

Abb. 2 zeigt, daß nach 30 min Phospholipase A-Behandlung eine Restaktivität für die 17 β -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 β -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 Phospholipoid-Hydrolyse bzw. der Inaktivierung der 17 β -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 β -HSD sprunghaft in bezug auf die Ausgangsaktivität ab.

3. Reaktivierung der mikrosomalen 17 β -HSD nach Inaktivierung durch Phospholipase A bzw. D

Die nach Einwirkung von Phospholipase A bzw. D für 30 min partiell inaktivierte 17 β -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-

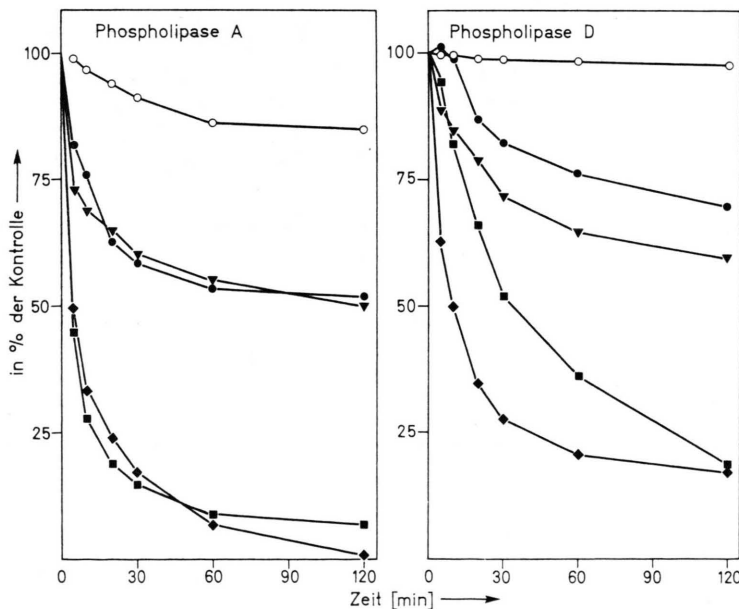


Abb. 2. Zeitliche Abhängigkeit der Inaktivierung der 17 β -HSD-Aktivitäten der Humanplacenta-Mikrosomen durch Phospholipase A bei pH 8,0 und Phospholipase D bei pH 5,6. Reaktionsansätze: 22 mg Mikrosomenprotein und 0,11 mg Phospholipase A bzw. 3,7 mg Phospholipase D in 3 ml, 37 °C. Einzelheiten vergleiche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

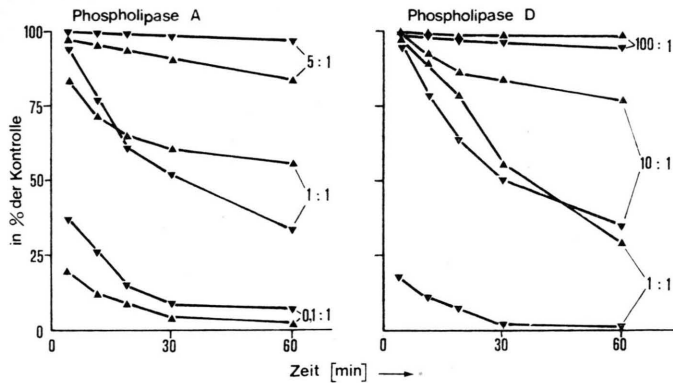
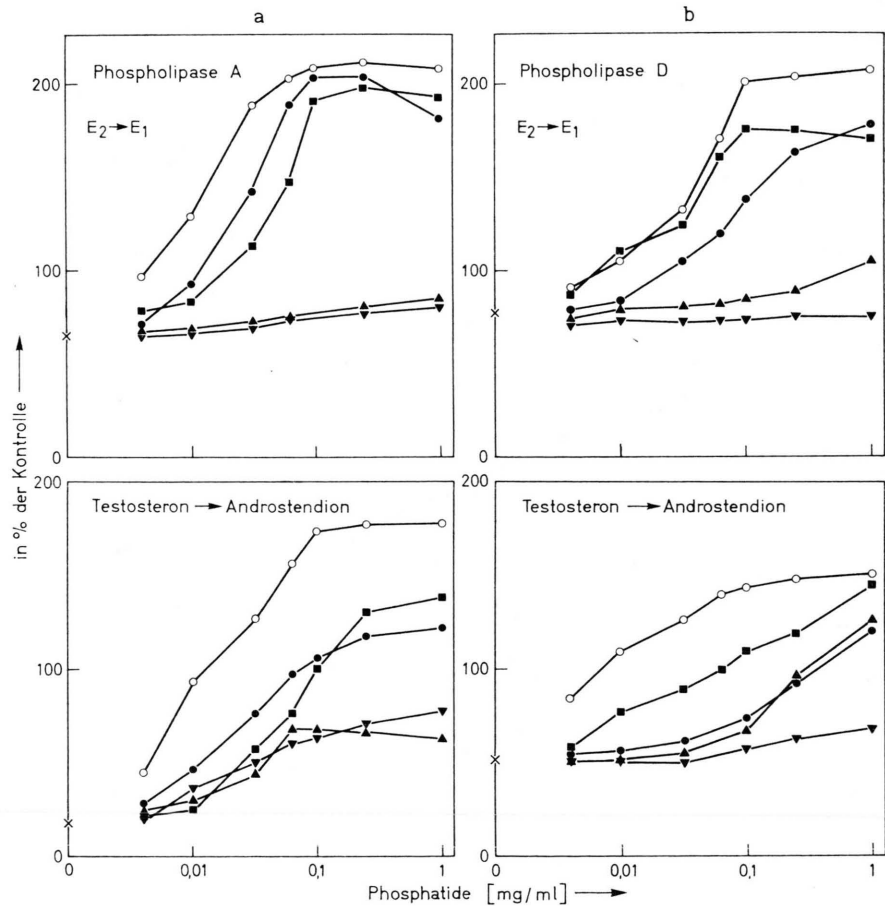


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der 17 β -HSD-Aktivitäten in Abhängigkeit vom Verhältnis Mikrosomenprotein (in mg) zu Phospholipase A- bzw. D-Aktivität (in Units). Versuchsbedingungen: 22 mg Mikrosomenprotein in 3 ml (Phospholipase A: 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0, Phospholipase D: 0,1 M Acetat-Puffer, pH 5,6), 37 °C, 30 min. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“. \blacktriangle , $E_2 \rightarrow E_1$, 17 β -HSD; \blacktriangledown , Testosteron \rightarrow Androstendion, 17 β -HSD. Ordinate: in % der spezifischen Enzymaktivitäten nativer Mikrosomen (= 100%).



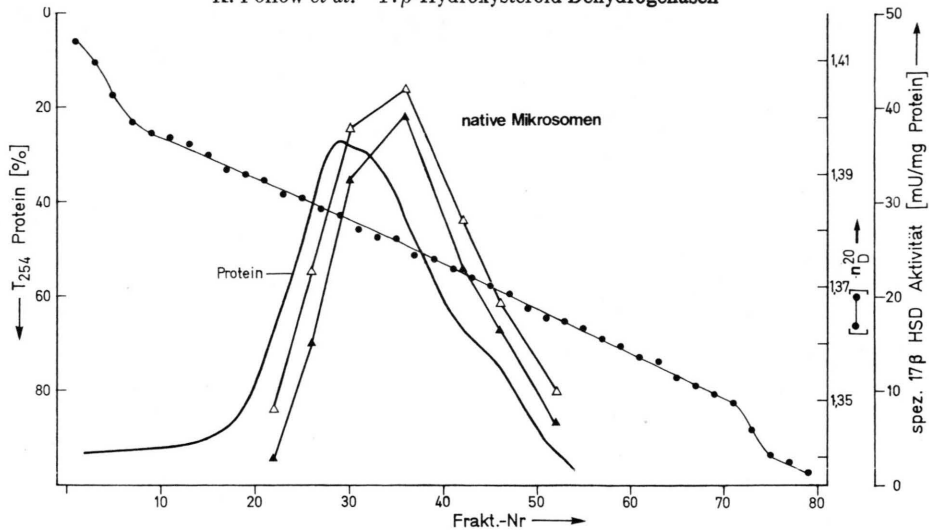


Abb. 5. Zonenzentrifugation zweimal gewaschener nativer Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten (12–55-proz. G/V). Einzelheiten siehe „Material und Methodik“. Ordinate: Proteingehalt der Mikrosomenfraktion in % der Transmission bei 254 nm, Dichte des Mediums (n_D^{20}), spezifische 17 β -HSD-Aktivität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

fallend ist, daß nach Sphingomyelin-, Lecithin- und Mikrosomengesamtpospholipoid-Zusatz die spezifische Aktivität der 17 β -HSD höher liegt als in unbehandelten Mikrosomen (= Kontrolle).

4. Phospholipoid- und 17 β -HSD-Aktivitätsverteilung in nativen und Phospholipase A- bzw. D-behandelten Mikrosomen nach Zonazentrifugation

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 Proteinfractionen zwischen 1,36 bis 1,39 (n_D^{20}). Das Maximum der spezifischen 17 β -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-

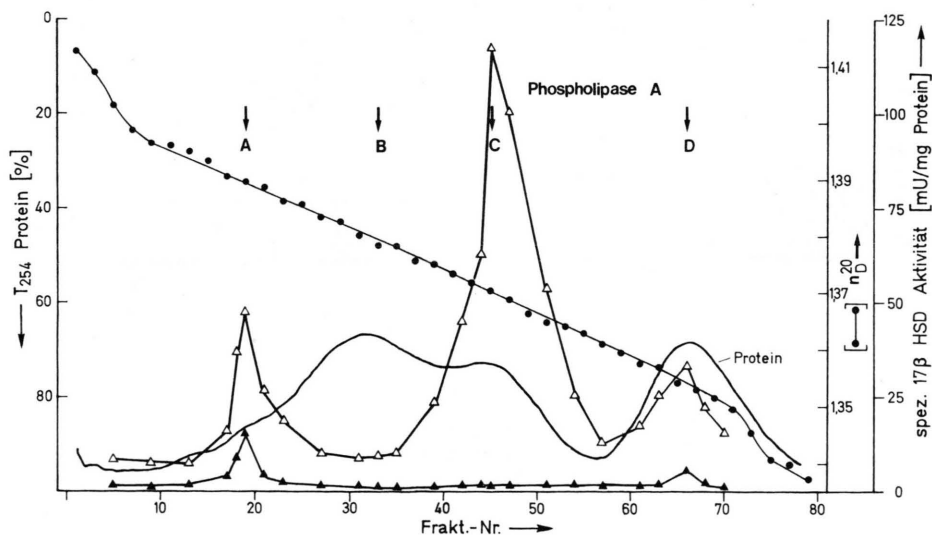


Abb. 6. Zonenzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml 0,01 M Tris/HCl, $2,5 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2 , pH 8,0, bei 37 °C mit 1,1 mg Phospholipase A inkubiert. Die Reaktion wurde durch $6,6 \cdot 10^{-3}$ M EDTA-Zugabe beendet. Einzelheiten siehe „Material und Methodik“, Symbole vergleiche Legende zu Abb. 5. Typisches Elutionsprofil aus drei Zonalläufen.

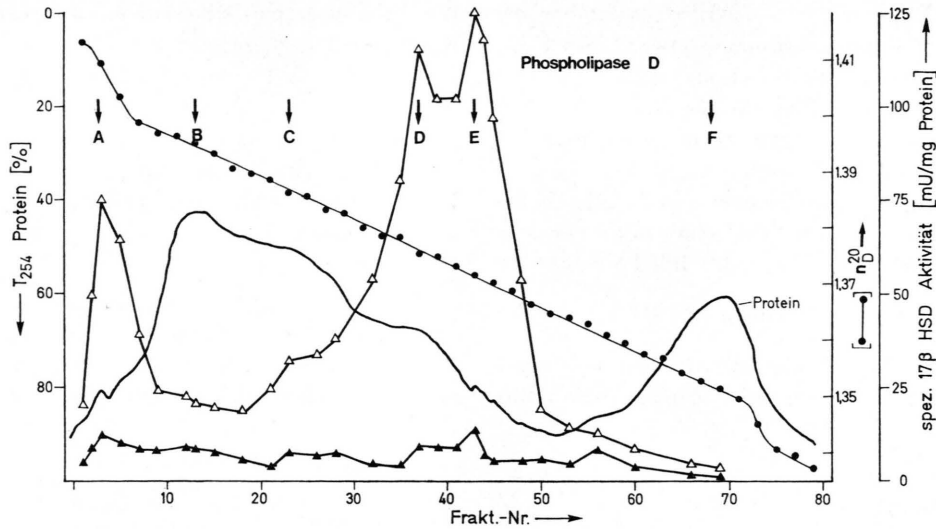


Abb. 7. Zonenzentrifugation Phospholipase D-behandelter Mikrosomen in einem Saccharose-Dichtegradienten. 222 mg Mikrosomenprotein wurde für 30 min in 30 ml 0,1 M Acetat-Puffer, $2,5 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2 , pH 5,6, bei 37 °C mit 37 mg Phospholipase D inkubiert. Einzelheiten siehe „Material und Methodik“. 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 β -HSD zeigt eine über die verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten unterschiedliche Verteilung auf schwere und weniger schwere Mikrosomensubfraktionen. Die E_2 -umsetzende 17 β -HSD

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

Die Tab. II enthält Angaben über die spezifische 17 β -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 β -HSD-Aktivitätsverteilung verschiedener Fraktionen von Zonalläufen Phospholipase A- bzw. D-behandelter Humanplacenta-Mikrosomen (Abbn. 6 und 7). I: $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$, II: Testosteron \rightarrow Androstendion.

Fraktionen	Protein [mg/ 0,1 ml]	Gesamt- Phospho- lipoid	Sphingo- myelin [nÄquiv. P/mg Protein]	Lecithin [nÄquiv. P/mg Protein]	Phospha- tidylinosit + Phospha- tidylserin	Phospha- tidyl- äthanol- amin	Spez. Akt. 17 β -HSD	
							I	II
Native Mikrosomen	1,43	560,4	149,6	185,5	71,4	153,9	42	40,2
Phospholipase A-Zonal- lauf (Abb. 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 (Abb. 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

drolyse die E₂-„sensitive“ 17 β -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 β -HSD

Die nach Aufschluß der Mikrosomen mit Phospholipase A und anschließender Zonzentrifugation

der hydrolysierten Mikrosomen in einem linearen Saccharose-Dichtegradienten (Abb. 6) erhaltene Fraktion D (Frakt. Nr. 60–75) wurde zur Anreicherung der E₂- und der Testosteron-„sensitiven“ 17 β -HSD vier Einzelschritten, die in der Tab. III zusammengefaßt dargestellt sind, unterworfen: Fraktionierte (NH₄)₂SO₄-Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Isoelektrofokussierung.

Das nach 40–50% (NH₄)₂SO₄-Sättigung gewonnene enzymaktive Präzipitat wurde an BioGel A-0,5 m chromatographiert (Abb. 8). Die 17 β -HSD eluierte als einheitlicher Gipfel, die Enzympräpara-

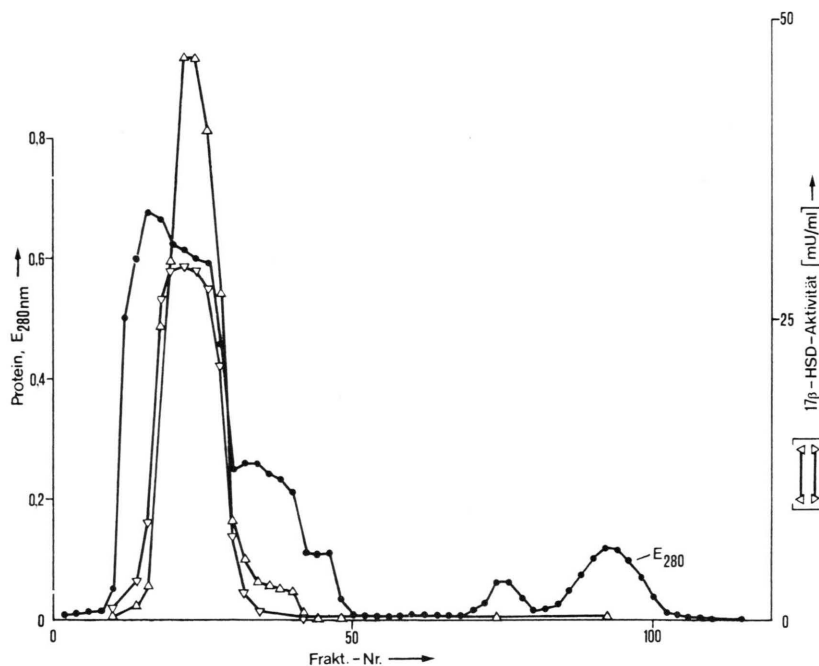


Abb. 8. Agarose-Gelfiltration eines (NH₄)₂SO₄-Präzipitats mikrosomaler Subpartikel, die nach Zonzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhalten wurden. Die nach Zonzentrifugation Phospholipase A-behandelter Mikrosomen erhaltenen Fraktionen (60–75, Abb. 6) wurden nach Dialyse gegen Medium I einer fraktionierten (NH₄)₂SO₄-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, E₂₈₀; △, E₂ → E₁, 17 β -HSD; ▽, Testosteron → Androstendion, 17 β -HSD.

Tab. III. Isolierung, Anreicherung und Ausbeute der E₂- bzw. der Testosteron-„sensitiven“ 17 β -HSD aus Humanplacenta-Mikrosomen. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“.

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

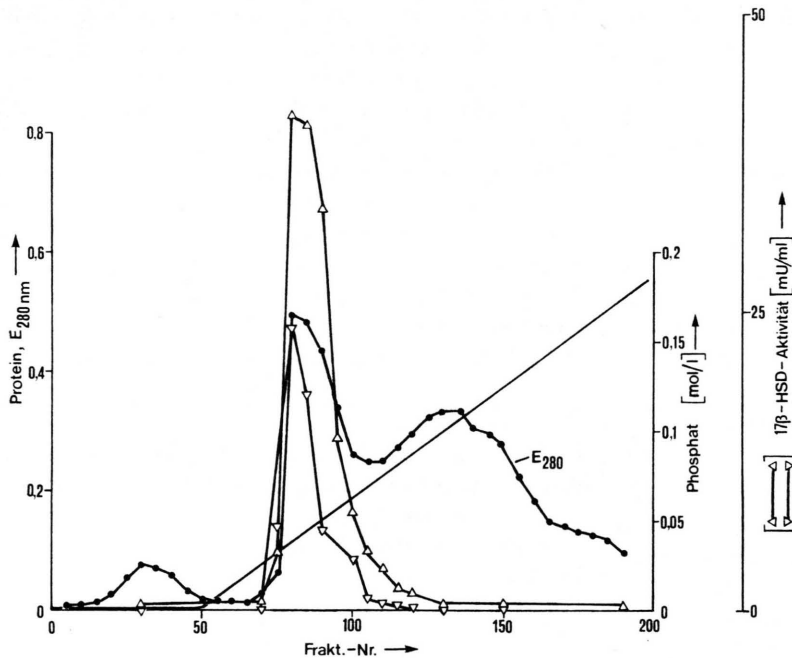


Abb. 9. DEAE-Sephadex-Ionenaustauschchromatographie der enzymaktiven Fraktionen nach Agarose-Gelfiltration (Abb. 8). Die Chromatographiesäule (30 cm \times 1,5 cm) wurde mit Medium I äquilibriert, die Enzympräparation (Agarose-säuleneluat) mit 50 ml Medium I in die Säule eingewaschen und die Proteine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

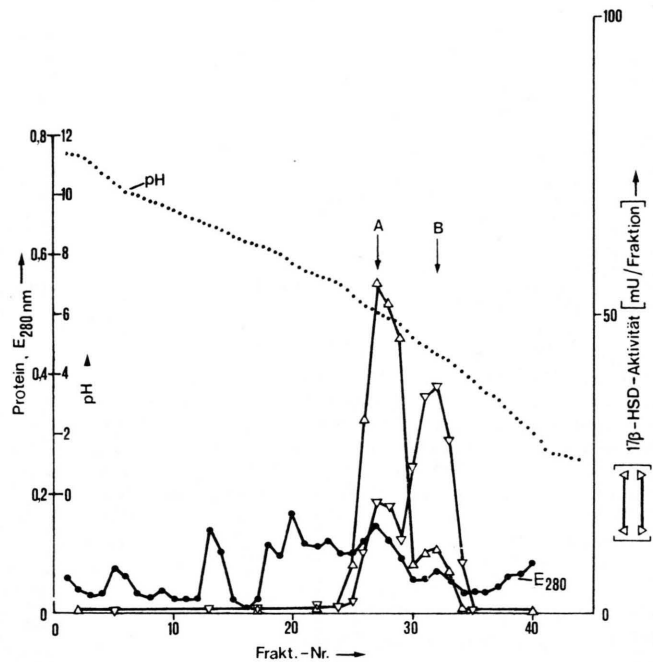


Abb. 10. Isolektrofokussierung in einem pH-Gradienten 3,5–10 der enzymaktiven Fraktionen nach DEAE-Sephadex-Ionenaustauschchromatographie. 110 ml LKB Elektrofokussiersäule, automatisch hergestellte Saccharose-Dichtegradienten, Trägerampholite pH 3,5–10. Einzelheiten siehe „Material und Methoden“. pH-Wert wurde in jederzelfraktion 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 Isolektrofokussierung in einem pH-Gradienten von 3,5–10 in zwei

17 β -HSD aktive Proteinfractionen separiert, wobei die bei pH 6,0 präzipitierende die E₂-„sensitive“ 17 β -HSD-Aktivität enthielt und die bei pH 4,9 die Testosteron-„sensitive“ (Abb. 10). Die E₂-„sensitive“ 17 β -HSD (Fraktion A) wurde 25,8-fach und

die Testosteron-„sensitive“ 17 β -HSD (Fraktion B) 17,4-fach angereichert (Tab. III).

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

6. Molekulargewicht

Die Molekulargewichte der E₂-„sensitiven“ bzw. Testosteron-„sensitiven“ 17 β -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).

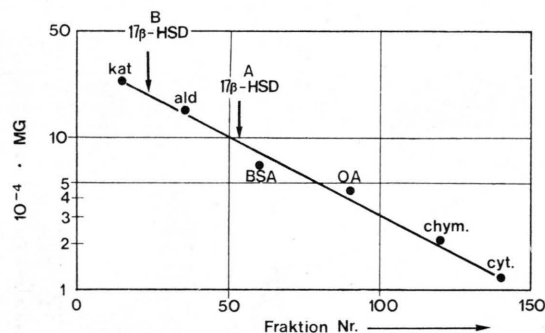


Abb. 12. Bestimmung der Molekulargewichte der aus der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta separierten 17 β -HSD durch Gelfiltration. A: Fraktion A nach Isoelektrofokussierung; B: Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Bedingungen: BioGel A-0,5 m (Säule: 90 × 1,5 cm), Temperatur 4 °C. Elution mit Medium I. Eichproteine: kat.: Katalase, ald: Aldolase, BSA: Rinderserumalbumin, OA: Ovalbumin, chym.: Chymotrypsinogen A, cyt.: Cytochrom c, 17 β -HSD: 17 β -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 β -HSD durch Inkubation mit Phospholipase A bzw. D inaktiviert wird, bestätigen eine frühere Untersuchung von Pollow *et al.*⁹, daß Membranlipide aktivierend auf die mikrosomale 17 β -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^{16–20}. 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 β -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 β -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 Duttera *et al.*¹⁷, Martonosi *et al.*¹⁸ und Staudinger *et al.*¹⁹, die sich mit der Korrelation zwischen Phospholipoidgehalt und Enzymaktivität von membrangebundenen Enzymen (Glukose-6-Phosphatase, ATPase, NADH-Cytochrom-c-Reduktase, 3-Oxo-steroid- Δ^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 β -HSD lassen sich Aussagen über den Mechanismus der Aktivierung mikrosomaler Enzymaktivitäten durch Phospholipide ableiten: 1. Es ist wahrscheinlich, daß die 17 β -HSD als stöchiometrischer Komplex des Enzymproteins mit Sphingomyelin bzw. Lecithin, also als „Lipoprotein-Enzym“ aufgefaßt werden kann, und nicht – wie von Staudinger *et al.*²⁰ für die NADH: Semidehydroascorbinsäure-Oxidoreduktase beschrieben – auf micellarer Ebene von den Membranlipiden 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 β -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 Mehrgipfigkeit der Verteilung der 17 β -HSD-Aktivität in den fragmentierten Mikrosomen – im Gegensatz zu der kontinuierlichen Aktivitätsverteilungskurve bei Auftrennung von unbehandelten Original-Mikrosomen durch Zonalzentrifugation – zeigt, daß Partikelpopulationen mit unterschiedlichem Enzymbesatz entstehen. Die im Startgipfel (Fraktion D, Abb. 6) des Zonalaufs 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 E₂-„sensitives“ und ein Testosteron-„sensitives“ 17 β -Enzym separiert. Der Reinheitsgrad war charakterisiert durch einen Anreicherungsfaktor von 25,8 für E₂-17 β -HSD bzw. 17,4 für Testosteron-17 β -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 β -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 Phospholipide Teile der Proteinoberfläche maskieren, so daß nach partiellem Proteinverlust durch Phospholipase-Hydrolyse Proteinbezirke freigesetzt werden, die eine Veränderung des Wanderungsverhaltens der separierten mikrosomalen 17 β -HSD-Enzymproteide im elektrischen Feld bewirken. Argumente hierfür liefert die Beobachtung von Pollow *et al.*⁹, daß nach Aceton-Extraktion der Mikrosomenmembran, die zu einem Gesamtpospholipoid-Verlust von ca. 65% führt, die gewonnenen 17 β -HSD-aktiven Proteinzone nach Isoelektrofokussierung bei anderen isoelektrischen Punkten (pH 7,2 und pH 5,8) präzipitieren.

Die Frage, ob das Vorliegen multipler Enzymformen der mikrosomalen 17 β -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 β -HSD-aktive Proteinfractionen 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 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta und über die zellphysiologische Funktion zweier substratunterschiedlich katalysierender 17 β -HSD-Aktivitäten wird in der nachfolgenden Arbeit²¹ berichtet werden.

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

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

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

⁴ H. J. Karavolas, M. L. Baedeker u. L. L. Engel, J. Biol. Chem. **245**, 4948 [1970].

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

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

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

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

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

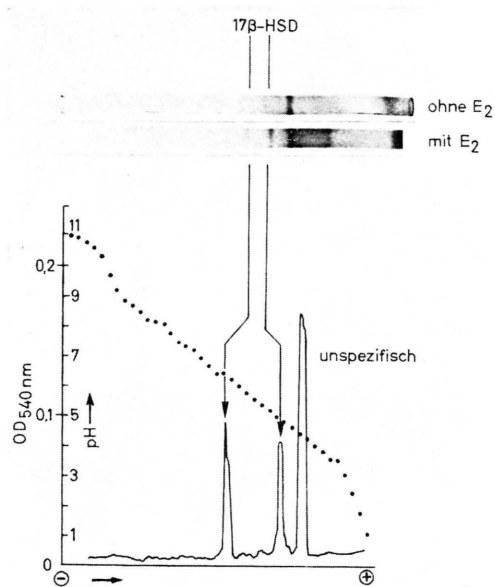


Abb. 11. Densitometrie der nach DEAE-Sephadex-Chromatographie durch Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung, pH 3,5–10, separierten aktiven Fraktion. Spezifische 17β -HSD-Aktivitätsfärbung mit E₂ als Substrat und NAD als Coenzym. Einzelheiten sind detailliert in „Material und Methodik“ dargestellt.

