

17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Humanplacenta-Mikrosomen, II

## Kinetische Untersuchungen und Charakterisierung der solubilisierten Oestradiol- bzw. Testosteron-„sensitiven“ 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten

Microsome-Associated 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases of Human Placenta, II

Kinetic Studies and Characterization of the Solubilized Estradiol-  
and Testosterone-“Sensitive” 17 $\beta$ -HSD-Activities

Kunhard Pollow, Wilfried Runge und Barbara Pollow

Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforsch. 30 c, 17–24 [1975]; eingegangen am 2. August/24. September 1974)

17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Human-Placenta, Microsomes, Enzyme Kinetics

Detailed enzyme kinetic parameters of the reactions catalyzed by the two 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (17 $\beta$ -HSD), which were solubilized from the microsomes of human placenta by treatment with phospholipase A, followed by enrichment and separation were determined. Both enzymes are strictly substrate specific. The most active substrate of one of the 17 $\beta$ -HSD (fraction A) is estradiol-17 $\beta$ , the other 17 $\beta$ -HSD (fraction B) is sensitive to testosterone.

Both NAD and NADP can serve as hydrogen transferring coenzymes, the latter giving about one-third of the initial rate of the former.

With respect to the influence of temperature, different buffers and pH values, Michaelis constants [ $K_m$ ] with estradiol-17 $\beta$  and testosterone as substrates, the solubilized and separated microsomal 17 $\beta$ -HSD behave like those isolated from the cytoplasmic fraction.

The two 17 $\beta$ -HSD, after solubilization from the microsomal fraction of human placenta, enrichment and separation from each other, show only a little activity for the transfer of hydrogen between C<sub>17</sub> of estradiol-17 $\beta$  and C<sub>17</sub> of androstenedione. On the other hand, intact microsomes and an integrated system prepared by recombination of the 17 $\beta$ -enzymes by preincubation in phosphate buffer are able to catalyse very actively the transfer of hydrogen between estradiol-17 $\beta$  and androstenedione.

The effect of temperature and time on the recombination of the two enriched and separated microsomal enzyme activities and the determination of the pH-optimum of the hydrogen transfer reaction are described. Finally it is proposed that the hydrogen transfer between steroid hormones represents an aspect of the true reaction mechanism of steroid hormones: Steroid hormones function as hydrogen transferring coenzymes by forming part of a chain of hydrogen carriers.

In der vorangehenden Mitteilung<sup>1</sup> wurde der Zusammenhang zwischen der Struktur der Phospholipoide und ihrer Wirkung als Aktivatoren der im endoplasmatischen Retikulum der Humanplacenta gebundenen 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 $\beta$ -HSD) durch gezielte Hydrolyse der Phospholipoide mit Phospholipase A bzw. D untersucht. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die unter Phospholipase A erfolgende Abspaltung von Fettsäuren an C-1 unter Bildung von Lysolipiden zu einer Strukturauflösung der Mikrosomenlamelle führt, verbunden mit der Solubilisierung der membrangebundenen 17 $\beta$ -HSD. Das solubilisierte Enzymprotein konnte durch fraktionierte  $[NH_4]_2SO_4$ -

Fällung, säulenchromatographische und elektrophoretische Trennverfahren in eine Oestradiol-„sensitive“ und eine Testosteron-„sensitive“ 17 $\beta$ -HSD separiert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die enzymkinetischen Parameter der gereinigten und separierten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten ermittelt. Außerdem wird der Versuch unternommen, die Frage nach der biologischen Bedeutung zweier streng substratspezifisch arbeitender 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten (Oestradiol- bzw. Testosteron-„sensitiv“) zu beantworten.

### Material und Methodik

#### Abkürzungen und Trivialnamen

17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, 17 $\beta$ -HSD; Oestron, E<sub>1</sub>; Oestradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</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.

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

### Steroide

[ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]- $\text{E}_2$  (S.A. 58 mCi/mmol), [ $17\alpha\text{-}^3\text{H}$ ]- $\text{E}_2$  (S.A. 3 Ci/mmol), [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]- $\text{E}_1$  (S.A. 58 mCi/mmol), [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Testosteron (S.A. 58,2 mCi/mmol), [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Androstendion (S.A. 60 mCi/mmol) und [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Progesteron (S.A. 60 mCi/mmol) waren Handelspräparate (Radiochemical Centre, Amersham, England). Die Steroide wurden dünnenschichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln auf Reinheit geprüft.

### Enzympräparation

Die Enzympräparation erfolgte nach Pollow et al.<sup>1</sup> durch Solubilisierung der Mikrosomen-Fraktion von Human-Placenta mit Phospholipase A.

### Enzymaktivitätsbestimmungen

#### a. $17\beta$ -HSD

Siehe Pollow et al.<sup>1</sup>.

#### b. „Tranhydrogenase-Aktivität“

Messung des Wasserstofftransfers von C-17 von  $\text{E}_2$  nach C-17 von Androstendion unter Bildung von Testosteron mit Hilfe von in 17-Position  $^3\text{H}$ -markiertem  $\text{E}_2$ . Typischer Inkubationsansatz: 1,5  $\mu\text{Ci}$  [ $17\alpha\text{-}^3\text{H}$ ]- $\text{E}_2$  unter Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  „kaltem“  $\text{E}_2$  in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  nicht radioaktiv-markiertem Androstendion wurden in 0,15 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37 °C unter Luftzutritt, 0,1 mg Coenzym pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml inkubiert. Das Maß für den Wasserstofftransfer war die Ausbeute an  $^3\text{H}$ -markiertem Testosteron.

Einzelheiten zur Isolierung, Identifizierung und quantitativen Erfassung der Steroidmetabolite siehe l. c.<sup>1</sup>.

### Ergebnisse

#### 1. Kinetische Eigenschaften der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen $17\beta$ -HSD

Die in den Abb. mit A und B bezeichneten Enzympräparationen entsprechen den – wie dem Anreicherungsschema der vorangestellten Arbeit zu entnehmen ist – nach Isoelektrofokussierung angereicherten und separierten mikrosomalen  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten.

Wie Tab. I zeigt, ist die aus der Mikrosomenfraktion isoliert dargestellte  $17\beta$ -HSD (Fraktion A) relativ stabil. Nach 24 h Aufbewahrung bei 4 °C wurde

Tab. I. Stabilisierungseffekt verschiedener Substanzen auf die mikrosomale  $17\beta$ -HSD-Aktivität (Fraktion A nach Isoelektrofokussierung). Gemessen wurde die  $17\beta$ -HSD-Aktivität für  $\text{E}_2$  und NAD(P) nach Aufbewahren der Enzympräparation für 1, 12 bzw. 24 Stunden bei 4 °C. Einzelheiten vergleiche „Material und Methoden“.

Substanzen	Konzentration	Restaktivität nach Aufbewahren bei 4 °C für		
		1 h	12 h	24 h
keine	—	98	89	82
NAD <sup>+</sup>	10 $\mu\text{M}$	100	96	91
NADP <sup>+</sup>	10 $\mu\text{M}$	100	100	97
$\text{E}_2$	10 $\mu\text{M}$	100	100	100
Glycerin	10%	98	87	83
	20%	98	92	85

eine Aktivitätsabnahme von 18% beobachtet.  $\text{E}_2$  und NAD(P) zeigen einen Stabilisierungseffekt, Glycerin ist weitgehend wirkungslos.

### Proteinmenge und Zeit

Abb. 1 zeigt, daß die Beziehung zwischen Oxidation von  $\text{E}_2$  bzw. Testosteron und der Enzymprotein-Konzentration bis zu einer Menge von 0,023 mg (0,05 ml) Enzymprotein pro Ansatz linear ist. Nach Abb. 2 verläuft die Reaktion bis 15 min linear. Damit ist sichergestellt, daß bei 15 min Inkubationsdauer und 0,05 ml Enzimlösung Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymreaktionen gemessen werden.

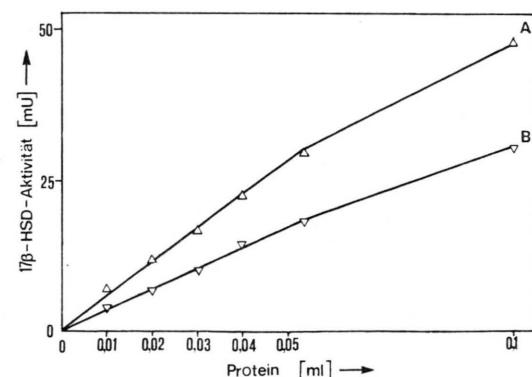


Abb. 1. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von  $\text{E}_2$  ( $\Delta$ ) und Testosteron ( $\nabla$ ) in Abhängigkeit von der Proteinmenge der nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A: Fraktion A nach Isoelektrofokussierung; B: Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Inkubation: 10  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{E}_2$  bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]Testosteron, 0,1 mg NAD<sup>+</sup>/Ansatz wurden für 15 min bei 37 °C unter Luftzutritt in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml inkubiert. 0,1 ml entsprechend 45  $\mu\text{g}$  angereicherten Enzymproteins.

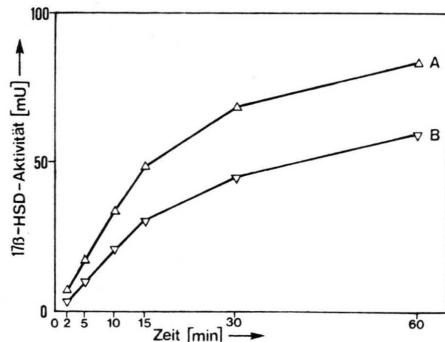


Abb. 2. Zeitabhängigkeit der Oxidation von  $E_2$  ( $\Delta$ ) und Testosteron ( $\nabla$ ) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierte, angereicherte und separierte  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B wie in Legende zu Abb. 1. Inkubation: je 0,1 ml (= 45  $\mu$ g Enzymprotein) wurden in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 4,1 ml unter Luftpzutritt inkubiert. 0,1 mg  $NAD^+$  pro Ansatz, 10  $\mu$ M [ $^{14}C$ ] $E_2$  bzw. [ $^{14}C$ ]Testosteron.

#### pH - Optimum

Abb. 3 zeigt den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und der Pufferzusammensetzung auf die Aktivität der angereicherten  $17\beta$ -HSD. In Glycin/NaOH-Puffer liegt das pH-Optimum der enzymatischen Transformation von  $E_2$  nach  $E_1$  bzw. Testosteron nach Androstendion zwischen pH 9,3 und pH 9,6.

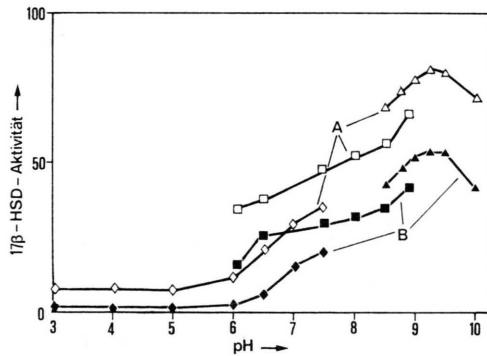


Abb. 3. pH-Optima der Oxidation von  $E_2$  ( $\Delta$   $\square$   $\diamond$ ) und Testosteron ( $\blacktriangle$   $\blacksquare$   $\blacklozenge$ ) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten. A und B wie in Legende zu Abb. 1. Inkubationen wie in Legende zu Abb. 2. Inkubationsdauer 15 min. ■  $\square$ : 0,15 M Phosphat-Puffer,  $\blacktriangle$   $\triangle$ , 0,1 M Glycin/NaOH;  $\blacklozenge$   $\diamond$ , 0,2 M  $Na_2HPO_4$ /Citronensäure.

#### Temperaturopimum und Hitzestabilität

Bei steigenden Temperaturen wurden in Gegenwart von Sättigungskonzentrationen von  $E_2$  und Testosteron die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten (Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung)

von der Temperatur gemessen (Abb. 4). Beide Enzymproteine zeigten einen Anstieg der Produktausbeuten bis ca. 42 °C.

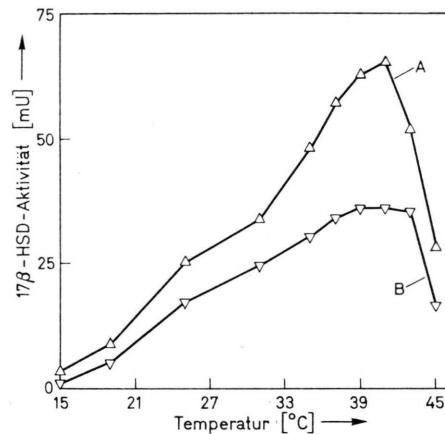


Abb. 4. Temperaturopimum der Oxidation von  $E_2$  ( $\Delta$ ) und Testosteron ( $\nabla$ ) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B wie in Legende zu Abb. 1. Inkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 2, Inkubationsdauer 15 min.

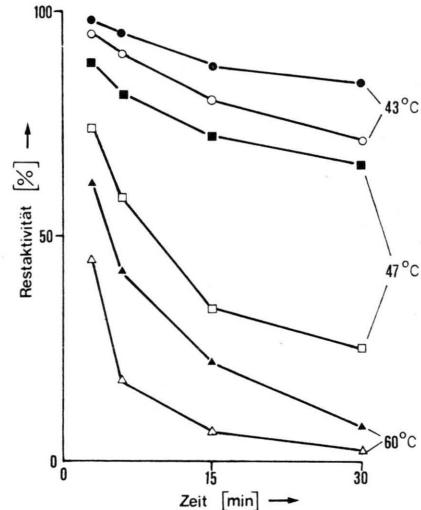


Abb. 5. Hitzestabilität der nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. ○  $\square$   $\triangle$ ,  $E_2 \rightarrow E_1$ , Fraktion A nach Isoelektrofokussierung; ●  $\blacksquare$   $\blacktriangle$ , Testosteron  $\rightarrow$  Androstendion, Fraktion B nach Isoelektrofokussierung. Die im Endschritt durch Isoelektrofokussierung angereicherten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten wurden bei verschiedenen Temperaturen in 0,15 M Phosphat-Puffer bis 30 min ohne Substrat vorinkubiert (0,1 ml = 45  $\mu$ g angereichertes Enzymprotein). Enzymaktivitätsbestimmung vergleiche Legende zu Abb. 2.

Auffallend ist die Hitzestabilität der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen  $17\beta$ -HSD. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, muß die Enzymlösung zur vollständigen Inaktivierung des katalytisch wirksamen Proteins mindestens 30 min auf 60 °C erhitzt werden.

#### Bestimmung der Michaelis-Konstanten für $E_2$ und Testosteron

Die Michaelis-Konstanten ( $K_m$ -Werte) der solubilisierten und angereicherten mikrosomalen  $17\beta$ -HSD (Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung) für

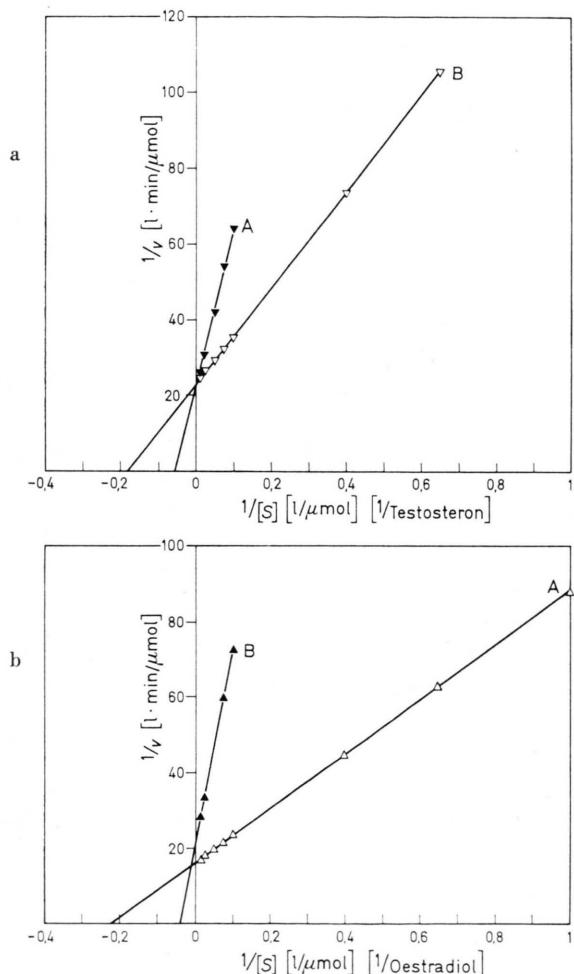


Abb. 6. Bestimmung scheinbarer  $K_m$ -Werte für die Oxidation von  $E_2$  (▲, Δ) und Testosteron (▼, ▽) durch die nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. A und B vergleiche Legende zu Abb. 1. Inkubationsbedingungen: 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, 37 °C, 0,1 mg NAD<sup>+</sup>/Ansatz, Gesamtvolumen 4,1 ml, Proteingehalt der angereicherten Enzymaktivitäten: 0,1 ml entsprechend 45 μg.

$E_2$  bzw. Testosteron und NAD<sup>+</sup> wurden aus den Reaktionsgeschwindigkeiten, die bei jeweils gleichbleibendem Proteingehalt und variabler Substrat- und konstanter Coenzym-Konzentration gemessen worden sind, nach Lineareweaver und Burk graphisch ermittelt (Abb. 6). Sie betragen:

$$K_m(\text{Frakt. A}, E_2) \quad 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ M (Abb. 6 a)}$$

$$K_m(\text{Frakt. B}, E_2) \quad 25,0 \cdot 10^{-6} \text{ M (Abb. 6 a)}$$

$$K_m(\text{Frakt. A}, \text{Testosteron}) \quad 18,2 \cdot 10^{-6} \text{ M (Abb. 6 b)}$$

$$K_m(\text{Frakt. B}, \text{Testosteron}) \quad 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ M (Abb. 6 b)}$$

#### Substrat- und Coenzym-Spezifität

In Tab. II ist das Verhalten der solubilisierten, angereicherten und separierten  $17\beta$ -HSD (Fraktion A und B nach Isoelektrofokussierung) der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta gegenüber verschiedenen Substraten und Coenzymen wiedergegeben. Mit NAD als Wasserstoffacceptor ist  $E_2$  für Fraktion A (isoliertes und gereinigtes Enzymprotein) das bevorzugte Substrat; Fraktion B oxidiert dagegen Testosteron mit wesentlich größerer Ge-

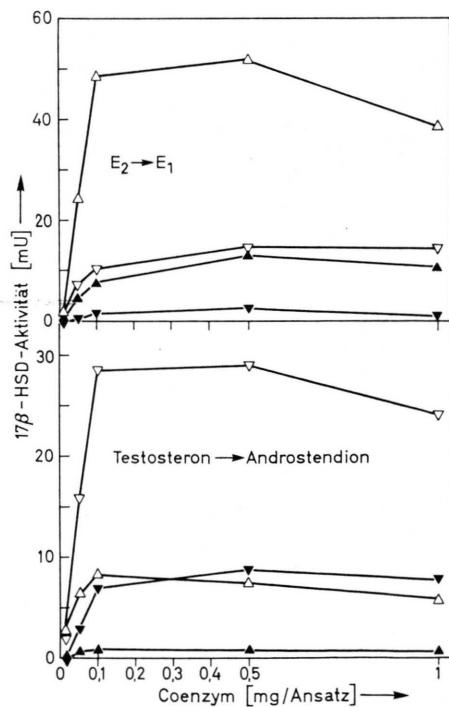


Abb. 7. Coenzymabhängigkeit der durch Isoelektrofokussierung separierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten der Humanplacenta. Inkubation: 10 μM [<sup>14</sup>C] $E_2$  bzw. [<sup>14</sup>C]Testosteron, 45 μg Enzymprotein wurden für 15 min bei 37 °C in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, 4,1 ml Gesamtvolumen, bei steigenden Coenzym-Konzentrationen inkubiert. △, NAD<sup>+</sup>, ▲, NADP<sup>+</sup>, Fraktion A nach Isoelektrofokussierung; ▽, NAD<sup>+</sup>, ▼, NADP<sup>+</sup>, Fraktion B nach Isoelektrofokussierung.

Eingesetztes Steroid [10 $\mu$ M]	Nachgewiesenes Reaktionsprodukt	Coenzym [0,1 mg/Ansatz]	17 $\beta$ -HSD Aktivität	
			Faktion A	Faktion B
			[rel. %]	
Oestradiol-17 $\beta$	Oestron	NAD	100	12
		NADP	32	3,8
Testosteron	Androstendion	NAD	17	100
		NADP	6,8	23
Oestron	Oestradiol-17 $\beta$	NAD	56	8,7
		NADPH	18	1,9
Androstendion	Testosteron	NADH	6,2	48
		NADPH	1,3	12
Progesteron	20 $\alpha$ -Hydroxy-4-pregn-3-on	NADH	2,8	3,5
		NADPH	0,5	1,2

schwindigkeit als  $E_2$ . Alle geprüften Substrate zeigen mit NADP(H) einen geringeren Umsatz als mit NAD(H). Bei hohen NADP-Konzentrationen wurde Coenzymhemmung beobachtet (Abb. 7).

## 2. Wasserstofftransfer zwischen C-17 von $E_2$ und C-17 von Androstendion

Die in Tab. III zusammengefaßten Wasserstofftransfer-Eigenschaften verschiedener Enzympräparationen der Mikrosomenfraktion der Humanplacenta (Wasserstoffübergang von der C-17-Position von  $E_2$  auf die C-17-Oxogruppe von Androstendion unter Bildung von Testosteron) zeigen, daß die aus der Mikrosomenfraktion separierten und angereicherten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten (Fraktion A und B) isoliert für sich nur einen geringen Wasserstofftransfer katalysieren. Dagegen sind die Original-Mikrosomen und die freien isolierten Einzelenzyme nach Rekombination durch 15-minütige Inkubation bei 37 °C in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, in der Lage, einen hochaktiven Wasserstofftransfer zwischen C-17 von  $E_2$  und C-17 von Androstendion zu bewirken.

Abb. 8 zeigt die Einflüsse von Temperatur und Zeit auf das Rekombinationsverhalten der aus der Mikrosomenfraktion isolierten 17 $\beta$ -HSD zu einem assoziativen Komplex. 10-minütige Inkubation bei 43 °C in 0,15 M Phosphat-Puffer hat den stärksten Effekt. Verlängerung der Inkubationszeit darüber hinaus führt zu einem steilen Abfall der „Transhydrogenase-Aktivität“ des Rekombinationskomplexes.

In Abb. 9 ist der durch Rekombination der freien aus der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta isolierten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten bewirkte Wasserstofftransfer zwischen  $E_2$  und Androstendion in Ab-

Tab. II. Substratspezifität der nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierten, angereicherten und separierten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. Fraktion A und B: angereicherte 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten nach Isoelektrofokussierung.

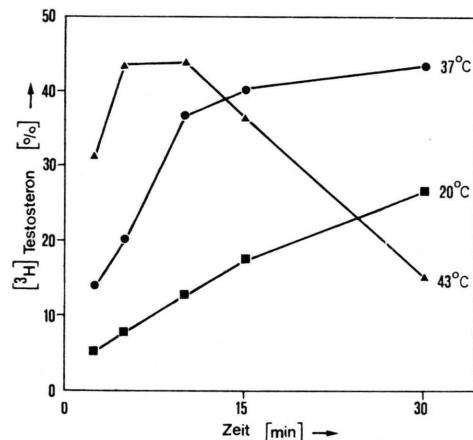


Abb. 8. Einfluß von Zeit und Temperatur auf die Rekombination zweier aus der Mikrosomenfraktion von Humanplacenta nach Phospholipase A-Behandlung solubilisierter, angereicherter und separierter 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten. Zur Rekombination wurden die lyophilisierten Enzympräparationen (Fraktion A und B) in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, gelöst (1 mg/ml) und bei verschiedenen Temperaturen bis 30 min inkubiert. Die „Transhydrogenase-Aktivität“ wurde – wie in „Material und Methodik“ beschrieben – jeweils aus einem Aliquot bestimmt, Inkubationsdauer 10 min bei 37 °C. Die gemessene Größe ist der Einbau von  $E_2$ -Wasserstoff in die C<sub>17</sub>-Position von Androstendion unter Bildung von Testosteron. Ordinate: [<sup>3</sup>H] Testosteron-Bildung in % der eingesetzten [17 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]- $E_2$ -Radioaktivität.

hängigkeit vom Puffersystem und vom pH-Wert dargestellt. Phosphat-Puffer ist wirkungsvoller als Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Citronensäure-Puffer; das pH-Optimum liegt zwischen pH 6,3 und pH 7,0.

Abb. 10 zeigt, daß mit zunehmender  $E_2$ -Konzentration (Wasserstoffdonator) bei konstanter Androstendion-Konzentration (Wasserstoffacceptor) die Ausbeute des Reduktionsäquivalents, spezifische C-17- $E_2$ -Wasserstoffanlagerung an C-17 von Androstendion unter Bildung von Testosteron, zunimmt.

Tab. III. Ausmaß des durch verschiedene Enzympräparationen katalysierten Wasserstoff-Transfers zwischen  $C_{17}$  von  $E_2$  und Androstendion. Wasserstoffdonator:  $[17\alpha^3H]E_2$ , Wasserstoffacceptor: nicht radioaktivmarkiertes Androstendion. Einzelheiten vergleiche „Material und Methodik“.

Enzympräparation	Coenzym [0,1 mg/ Ansatz]	% der einge- setzten $^3H$ -Ak- tivität $[^3H]$ Testo- steron
Native Mikrosomen (zweimal gewaschen)	NAD	68,2
	NADP	12,8
Fraktion A nach Isoelektrofokussierung	NAD	7,8
	NADP	1,2
Fraktion B nach Isoelektrofokussierung	NAD	3,5
	NADP	0,5
15 min bei 37 °C rekombinierte $17\beta$ -HSD- Aktivitäten	NAD	37,3
	NADP	5,2

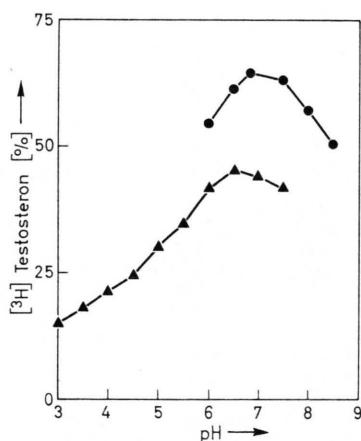


Abb. 9. Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen  $C_{17}$  von  $E_2$  und  $C_{17}$  von Androstendion vom pH-Wert. Enzympräparation: Die bei 37 °C für 15 min in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, rekombinierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. „Transhydrogenase-Aktivitäts“-Bestimmung siehe „Material und Methoden“. Ordinate: [ $^3H$ ] Testosteron-Bildung in % der eingesetzten  $[17\alpha^3H]E_2$ -Radioaktivität. ●, 0,15 M Phosphat-Puffer; ▲, 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Citronensäure}$ .

## Diskussion

In der Tab. IV werden einige Eigenschaften der in der vorangehenden Mitteilung mit A und B bezeichneten durch Isoelektrofokussierung in einem pH-Gradienten 3,5–10 als Endreinigungsschritt rein dargestellten mikrosomalen Enzymproteine mit denjenigen, des analogen, cytoplasmatischen Enzyms der Humanplacenta<sup>3–10</sup> und denjenigen der nativen Mikrosomenfraktion<sup>11–13</sup> verglichen.

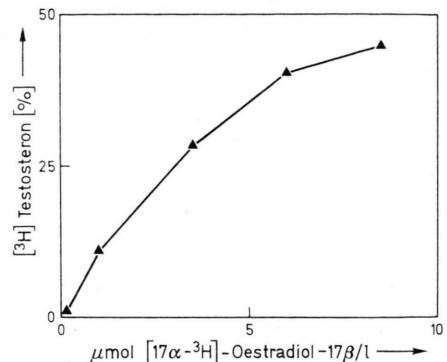


Abb. 10. Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen  $C_{17}$  von  $E_2$  und  $C_{17}$  von Androstendion von der  $E_2$ -Konzentration. Enzympräparation: Die bei 37 °C für 15 min in 0,15 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, rekombinierten  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten aus Humanplacenta-Mikrosomen. „Transhydrogenase-Aktivitäts“-Bestimmung siehe „Material und Methoden“. Ordinate: [ $^3H$ ] Testosteron-Bildung in % der absoluten Menge transferierter  $E_2-C_{17}$ -Wasserstoffs.

Die Interpretation der im direkten Vergleich in Tab. IV gegenübergestellten Wertepaare gestaltet sich schwierig, da störende Einflüsse auf die kinetischen Parameter durch interferierende, in der Membran fixierte Enzymsysteme nicht auszuschließen sind.

Die zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß das lösliche cytoplasmatische und die mikrosomal gebundenen  $17\beta$ -HSD-Aktivitäten nahezu gleiche Michaelis-Menten-Konstanten für  $E_2$  und NAD sowie nahezu gleiche pH- und Temperatur-Optima haben. Beide subzellulär unterschiedlich verteilten Enzyme werden durch vergleichbarer Weise beeinflußt. Das Verhalten der Enzyme gegenüber wasserstoffübertragenden Pyridinnukleotiden zeigt keine Unterschiede. Neben dieser Übereinstimmung in mehreren kinetischen Eigenschaften bestehen aber auch eine Reihe wichtiger Unterschiede zwischen der cytoplasmatischen und der membrangebundenen  $17\beta$ -HSD:

1. Zn-Ionen aktivieren die rein dargestellte cytoplasmatische  $17\beta$ -HSD; auf die mikrosomale  $17\beta$ -HSD haben Zn-Ionen einen hemmenden Einfluß.

2. Nach Zusatz von Phosphatidmicellen erfolgte eine Aktivitätssteigerung der membrangebundenen  $17\beta$ -HSD, dagegen wird die Aktivität der cytoplasmatischen  $17\beta$ -HSD nicht beeinflußt.

3. Aufbewahren des cytoplasmatischen Enzyms für 1 h bei 0 °C hat einen Aktivitätsverlust von 60% zur Folge, die Aktivitätsabnahme der mikrosomalen Enzyme liegt bei weniger als 5%.

Tab. IV. Eigenschaften verschiedener 17 $\beta$ -HSD der Humanplacenta.

Parameter	cytoplasmatische 17 $\beta$ -HSD <sup>3–10</sup>	isolierte und gereinigte mikrosomale 17 $\beta$ -HSD-Frak. tionen		Native Mikrosomen <sup>11, 12</sup>
		A	B	
$K_m$ Oestradiol [NAD] Testosteron [NAD]	$6,6 \cdot 10^{-6}$ M ( $14,4 \cdot 10^{-6}$ M) $400 \cdot 10^{-6}$ M	$4,5 \cdot 10^{-6}$ M $25,0 \cdot 10^{-6}$ M	$18,2 \cdot 10^{-6}$ M $5,6 \cdot 10^{-6}$ M	$2,2 \cdot 10^{-6}$ M
pH-Optimum (Oxidation)	9,8–10,2		9,3–9,6	7,8
Temperaturopimum	41 °C		42 °C	42 °C
Stabilität:				
Kälteinaktivierung	1 h, 0 °C, Abnahme auf 40%		12 h, 4 °C, Abnahme auf 89%	12 h, 4 °C, keine Abnahme
Glycerineffekt	1 h, 0 °C, 20% Glycerin, keine Abnahme		gering	—
Substratspezifität:				
Oestradiol-Umsatz	hochaktiv	aktiv	gering	aktiv
Testosteron-Umsatz	gering	gering	aktiv	aktiv
Coenzymspezifität:				
NAD	wirksam		wirksam	wirksam
NADP	weniger wirksam		weniger wirksam	weniger wirksam
Sulfhydrylreagenzien:				
p-Chlormercuribenzoat	hemmt vollständig ( $10^{-5}$ M)		—	hemmt vollst. ( $10^{-3}$ M)
Jodacetamid	—		—	hemmt zu 68% ( $10^{-3}$ M)
Zn-Ionen ( $10^{-7}$ – $10^{-3}$ M)	Aktivierung um 35%		—	hemmt zu 19% ( $10^{-5}$ M)
Phospholipoide	kein Einfluß		Aktivierung	Aktivierung
Molekulargewicht	62 000–65 000	93 000	192 000	unbekannt

4. 20-prozentiger Glycerin-Zusatz zur cytoplasmatischen Enzympräparation verhindert die Kälteinaktivierung durch Stabilisierung der enzymatisch aktiven Konformation. Der Glycerin-Einfluß auf die Stabilität der mikrosomalen Enzyme ist gering.

5. Untersuchungen zur Substratspezifität bzw. der Vergleich der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten<sup>1, 7</sup> zwischen E<sub>2</sub> und Testosteron zeigen, daß die cytoplasmatische und die mit A bezeichnete isolierte und gereinigte mikrosomale 17 $\beta$ -HSD E<sub>2</sub> spezifisch katalysieren, dagegen die Fraktion B Testosteron bevorzugt.

Bei Verwendung der nativen Mikrosomenpräparation sind die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Substrate etwa gleich groß. Die Unterschiede in der Substratspezifität zwischen der cytoplasmatischen 17 $\beta$ -HSD und der in der Mikrosomenpräparation lokalisierten 17 $\beta$ -HSD-Aktivität sind, wie die vorangehende Mitteilung<sup>1</sup> gezeigt hat, durch die Existenz zweier substratunterschiedlich katalysierender 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bedingt und nicht, wie Untersuchungen an bakteriellen und tierischen Hydrolasen<sup>14, 15</sup> angedeutet haben, einer allosterischen Effektorwirkung der Phospholipoide, die die Substratspezifität herabsetzt, zuzuschreiben. So hydroxyliert aus *Pseudomonas putida* isoliertes Cytochrom P-450 nur Campher zum ent-

sprechenden 5-exo-Alkohol, das strukturgebundene Cytochrom P-450 der Leber-Mikrosomen mehrerer Säugetiere dagegen zahlreiche chemisch völlig verschiedene Metaboliten und Pharmaka.

Abschließend soll die Frage nach der zellphysiologischen Bedeutung zweier membrangebundener, streng substratspezifisch katalysierender 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten des endoplasmatischen Retikulums der Humanplacenta angeschnitten werden. Die Bedeutung liegt möglicherweise in der Katalyse eines spezifischen Wasserstofftransfers zwischen C<sub>17</sub> von E<sub>2</sub> und C<sub>17</sub> von Androstendion (siehe Abb. 8–10). Die Integration von verschiedenen Steroid-Dehydrogenasen in einem mikrosomal-gebundenen Enzymkomplex würde erlauben, Wasserstoff im Rahmen einer „steroidbedingten Wasserstoffüberträgerkette“ zwischen wasserstoffverbrauchenden, stoffwechselaktiven Mikrosomen-Kompartimenten und den im cytoplasmatischen „Sammelbecken“ vorhandenen reduzierten Pyridinnukleotiden zu transferieren, zumal von der in analoger Weise als Doppel-lamelle strukturierten Mitochondrienwand bekannt ist, daß sie für reduzierte Pyridinnukleotide nicht frei diffusibel ist (vgl. Pollow et al.<sup>16, 17</sup>).

Wenzel et al.<sup>18–21</sup> kommen im Rahmen ihrer Untersuchungen zum spezifischen Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen in der Mikrosomenfrak-

tion von Rattenleber in Anlehnung an Untersuchungen von Gershman und Abeles<sup>22</sup> über das kinetische Verhalten von Leber-Alkoholdehydrogenase in Ab- und Anwesenheit von Lactataldehyd zu einer anderen Überlegung: Der spezifische Wasserstofftransfer zwischen Steroidhormonen ist die Folge einer langsamem Dissoziation des binären NADH-Dehydrogenase-Komplexes kombiniert mit einer generellen substratunspezifischen Katalyse der Steroiddehydrogenasen gegenüber verschiedenen Hydroxy-/Oxosteroid-Partnern. Diese pauschale Aussage zur Sub-

stratunspezifität von Steroiddehydrogenasen — als unabdingbare Voraussetzung für den spezifischen Wasserstofftransfer zwischen zwei Steroid-Redox-partnern — trifft zumindest für die in verschiedenen Zellkompartimenten gut untersuchte  $17\beta$ -HSD der Humanplacenta nicht zu<sup>3–13</sup>. Von der  $17\beta$ -HSD ist eine strenge Subrat- und Coenzym-Spezifität bekannt. Es ist daher notwendig, die von Wenzel et al. an einem mikrosomalen Enzymsystem aufgestellte Hypothese an einer hochgereinigten löslichen Steroiddehydrogenase zu überprüfen.

- <sup>1</sup> K. Pollow, W. Runge u. B. Pollow, *Z. Naturforsch.* **30c**, 4 [1975].
- <sup>2</sup> W. C. Schneider, *J. Biol. Chem.* **176**, 259 [1948].
- <sup>3</sup> L. J. Langer u. L. L. Engel, *J. Biol. Chem.* **233**, 583 [1958].
- <sup>4</sup> P. Talalay u. H. G. Williams-Ashman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 15 [1958].
- <sup>5</sup> P. Talalay, B. Hurlock u. H. G. Williams-Ashman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 862 [1958].
- <sup>6</sup> D. D. Hagerman, C. A. Villee u. F. M. Wellington, *J. Biol. Chem.* **234**, 2031 [1959].
- <sup>7</sup> L. J. Langer, J. A. Alexander u. L. L. Engel, *J. Biol. Chem.* **234**, 2609 [1959].
- <sup>8</sup> J. Jarabak, A. E. Seeds u. P. Talalay, *Biochemistry* **5**, 1269 [1966].
- <sup>9</sup> H. J. Karavolas, M. L. Baedecker u. L. L. Engel, *J. Biol. Chem.* **245**, 4948 [1970].
- <sup>10</sup> H. J. Karavolas u. L. L. Engel, *Endocrinology* **88**, 1165 [1971].
- <sup>11</sup> W. D. Lehmann u. H. Breuer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 1633 [1967].
- <sup>12</sup> K. Pollow u. B. Pollow, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1257 [1971].
- <sup>13</sup> K. Pollow, W. Runge, B. Pollow, H. Grunz, W. R. Willems u. J. Schmalbeck, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 705 [1973].
- <sup>14</sup> A. L. Lehninger, *Naturwissenschaften* **53**, 57 [1966].
- <sup>15</sup> M. Katagiri, B. N. Ganguli u. J. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **243**, 3543 [1968].
- <sup>16</sup> K. Pollow, G. Sokolowski, H. Grunz u. B. Pollow, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 501 [1974].
- <sup>17</sup> K. Pollow, G. Sokolowski, J. Schmalbeck u. B. Pollow, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 515 [1974].
- <sup>18</sup> M. Wenzel, B. Bollert u. B. Ahlers, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 969 [1974].
- <sup>19</sup> M. Wenzel, K. Pollow u. T. Ziebarth, *Z. Naturforsch.* **22b**, 894 [1967].
- <sup>20</sup> M. Wenzel u. S. Wolf, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1203 [1969].
- <sup>21</sup> K. Pollow, B. Pollow u. M. Wenzel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 547 [1970].
- <sup>22</sup> H. Gershman u. R. H. Abeles, *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 659 [1973].