Enzyme des Steroid-Stoffwechsels im Blut des Menschen

I. Charakterisierung und Kinetik einer 17 β -Hydroxysteroid: NAD(P)-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau

Von J. BREUER, W. MEUSERS und H. BREUER

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Bonn

(Eingegangen am 2. Februar 1968)

Im Serum der schwangeren Frau wurde eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase nachgewiesen, die eine ausgeprägte Substratspezifität besitzt und nur mit phenolischen, nicht aber mit neutralen Steroiden reagiert; darüber hinaus zeigt das Enzym eine Stereospezifität für die 17 β -Hydroxygruppe. Die 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase oxydiert [4-¹⁴C]17 β -Östradiol zu [4-¹⁴C]Östron in Gegenwart von NAD⁺ etwas schneller als in Gegenwart von NADP⁺; bei der Reduktion von [4-¹⁴C]Östron zu [4-¹⁴C]17 β -Östradiol wurden mit NADPH größere Umsätze beobachtet als mit NADH. Das Optimum der Oxydation der 17 β -Hydroxygruppe liegt bei einem pH-Wert von 9,0, das Optimum der Reduktion der 17-Oxogruppe bei einem pH-Wert von 6,0. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante beträgt bei einem pH-Wert von 8,6 für 17 β -Östradiol $5,7 \cdot 10^{-6}$ M. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum bei 45°; für die Aktivierungsenergie wurde ein Wert von +10 Kcal/Mol ermittelt. Die Q_{10} -Werte schwanken zwischen 1,5 und 1,7. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen 17 β -Östradiol und Östron ist nach etwa 7 Stdn. erreicht; die Gleichgewichtskonstante K_H hat einen Wert von $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}$ M. Durch Zusatz von SH-Gruppen blockierenden Verbindungen wird die Aktivität des Enzyms gehemmt. Die 17 β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums kann durch Fällung mit Ammoniumsulfat 3—4fach bei einer 50proz. Ausbeute angereichert werden. Die höchste spezifische Aktivität findet sich in der 40—60proz. Ammoniumsulfat-Fraktion. Sowohl das im Serum befindliche Enzym als auch die mit Ammoniumsulfat gefällte Enzympräparation werden schnell inaktiviert; Glycerin hat keinen stabilisierenden Einfluß, wohl aber der Zusatz von 17 β -Östradiol.

Die Aktivität des Serumenzym nimmt vom 3.—10. Schwangerschaftsmonat um etwa das 10fache zu und ist 18 Stdn. post partum nicht mehr nachweisbar. Dieses Verhalten und die übrigen enzymkinetischen Untersuchungen zeigen, daß die im Serum der Schwangeren nachgewiesene 17 β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase placentaren Ursprungs und mit der in der Placenta des Menschen nachgewiesenen 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase (Östradiol-17 β -Dehydrogenase; EC 1.1.1.62) weitgehend identisch ist.

The serum of pregnant women contains a 17 β -hydroxysteroid-oxidoreductase which shows a high substrate specificity and which reacts only with phenolic, but not with neutral steroids; in addition, the enzyme exhibits stereospecificity for the 17 β -hydroxy group. The 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase oxidises [4-¹⁴C]oestradiol-17 β to [4-¹⁴C]oestrone more rapidly with NAD⁺ than with NADP⁺. When [4-¹⁴C]oestrone is reduced to [4-¹⁴C]oestradiol-17 β by the enzyme, NADPH is a somewhat more efficient cofactor than NADH. The oxidation of the 17 β -hydroxyl group shows a maximum at pH 9.0, whereas the reduction of the 17-oxo group is optimal at pH 6.0. At pH 8.6, the MICHAELIS-MENTEN constant was found to be $5.7 \cdot 10^{-6}$ M. The enzyme has a temperature optimum at 45° and an activation energy of +10 Kcal/Mol. The Q_{10} -values vary between 1.5 and 1.7. The equilibrium between oestradiol-17 β and oestrone is reached after 7 hr; the equilibrium constant is $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}$ M. The activity of the enzyme is inhibited by SH-blocking agents. Addition of ammonium sulphate to the serum of pregnant women (last month of pregnancy) resulted in a 3—4fold purification of the 17 β -hydroxysteroid : NAD(P) oxidoreductase with an overall yield of 50%. The highest specific activity is found in the 40—60 per cent ammonium sulphate fraction. The serum enzyme and also the ammonium sulphate preparations are rapidly inactivated. The enzyme is stabilised by oestradiol-17 β , but not by the addition of glycerol.

The activity of the serum enzyme shows a 10 fold increase between the 3rd. and 10th. month of pregnancy; 18 hr. after delivery, all the activity has disappeared from the serum. This finding and the results of the kinetic studies suggest that the 17 β -hydroxysteroid : NAD(P) oxidoreductase, present in serum of pregnant women, is of placental origin and may be identical with the 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase (oestradiol-17 β -dehydrogenase; EC 1.1.1.62) of human placenta.

Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß in den Erythrocyten des Menschen Enzyme vorhanden sind, welche die gegenseitige Umwandlung von 17 β -Östradiol und Östron katalysieren (1—5); außerdem konnten unter Verwendung verschiedener Substrate weitere Enzyme des Östrogen-Stoffwechsels in den roten Blutkörperchen des Menschen nachgewiesen werden (6—8). Über die Anwesenheit einer 17 β -Östradiol-Oxydoreduktase im Plasma des Menschen wurde ebenfalls berichtet (8), während entsprechende Untersuchungen im menschlichen Serum bisher nicht vorliegen.

Im Hinblick auf die Bedeutung, die den Steroidhormonen beim Menschen zukommt, erscheint die Frage von Interesse, ob und unter welchen Bedingungen eine Enzymdiagnostik des Steroid-Stoffwechsels im Blut (Erythrocyten und/oder Serum) möglich ist. Nachdem sich Hinweise dafür ergeben hatten, daß im Serum schwangerer Frauen eine 17 β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase vorhanden ist, wurde der Versuch unternommen, dieses Enzym durch kinetische Untersuchungen

näher zu charakterisieren; außerdem sollte festgestellt werden, ob sich die Aktivität des nachgewiesenen Enzyms während des Verlaufes der Schwangerschaft ändert.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß im Serum der Schwangeren eine 17 β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase¹⁾ vorkommt, die offenbar placentaren Ursprungs ist und nur mit phenolischen, nicht aber mit neutralen Steroiden reagiert. Die Aktivität des Enzyms nimmt vom 3. bis 10. Schwangerschaftsmonat um etwa das 10fache zu.

Methodik

Steroide

[4-¹⁴C]Östron [Östra-1.3.5(10)-trien-3-ol-17-on]
(spez. Aktivität 29,5 mC/mMol)
[4-¹⁴C]17 β -Östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17 β -diol]
(spez. Aktivität 31,8 mC/mMol)
[4-¹⁴C]Östriol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.16 α .17 β -triol]
(spez. Aktivität 29,4 mC/mMol)

¹⁾ EC 1.1.1.62.

[4-¹⁴C] Testosteron [Androst-4-en-17 β -ol-3-on]
(spez. Aktivität 29,2 mC/mMol)
[4-¹⁴C] Δ^4 -Androstendion [Androst-4-en-3.17-dion]
(spez. Aktivität 28,5 mC/mMol)
[4-¹⁴C] Dehydroepiandrosteron [Androst-5-en-3 β -ol-17-on]
(spez. Aktivität 27,2 mC/mMol)
wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen.
[4-¹⁴C] 16-Oxo-17 β -östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17 β -diol-16-on]
(spez. Aktivität 0,07 mC/mMol)
wurde nach HUFFMAN und LOTT (9)
[4-¹⁴C] 17 α -Östradiol [Östra-1.3.5(10)-trien-3.17 α -diol]
(spez. Aktivität 31,8 mC/mMol) nach (10) hergestellt.
Alle radioaktiven Steroide wurden vor den Versuchen papierchromatographisch auf Reinheit geprüft.

Reagenzien, Lösungsmittel und Puffer

Mit Ausnahme von FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz (11) waren alle Reagenzien von p. a. Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt). Die organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. NAD⁺, NADH, NADP⁺ und NADPH wurden von Biochemica Boehringer, Mannheim, bezogen. Folgende Puffer wurden verwendet: 0,3M Citrat-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0—7,4) (12), 0,2M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0—7,4) (13), 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4—9,0) (14), 0,6M Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH-Bereich 9,0—10,5) (15).

Gewinnung des Serums

Zur Gewinnung des Serums wurde venöses Blut unmittelbar nach der Entnahme 10 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Das Blut stammte von gesunden schwangeren Frauen (Durchschnittsalter 28,2 Jahre), die sich routinemäßig in der Universitäts-Frauenklinik Bonn untersuchen ließen. Die Zeit zwischen der Entnahme des Blutes und dem Beginn der Inkubationsversuche betrug 30—40 Min. Die verwendeten Serumproben waren weder hämolytisch, lipämisch noch ikterisch.

Inkubationsbedingungen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Versuche bei 37° für 120 Min. in einem Schüttelthermostat unter Luft durchgeführt. Jeweils 100 nC [4-¹⁴C] Steroid, gelöst in etwa 0,02 ml Propylen-glykol, wurden mit 1,0 ml Serum in Gegenwart von 4,5 μ Mol NAD⁺ und 2 ml 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert.

Aufarbeitung der Versuchsansätze

Die Inkubationslösungen wurden dreimal mit jeweils 10 ml Äther/Chloroform (3:1 v/v) extrahiert, die Extrakte vereinigt und bei 35° eingedampft. Die Extraktückstände wurden in etwa 0,5 ml Methanol aufgenommen.

Fällung mit Ammoniumsulfat

12 ml Serum wurden im Verlaufe von 20 Min. unter ständigem Rühren mit 2,9 g fein gepulvertem Ammoniumsulfat bis zur 40proz. Sättigung versetzt. Die Lösung wurde anschließend 20 Min. bei 150000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde im glycerinhaltigen Medium B (16) (pH 8,6) aufgenommen (40proz. Ammoniumsulfat-Fällung). Der Überstand der 40proz. Fällung wurde mit 1,6 g Ammoniumsulfat bis zur 60proz. Sättigung versetzt und der entstandene Niederschlag (60proz. Ammoniumsulfat-Fällung) in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet. Durch Zusatz von 1,7 g Ammoniumsulfat zu dem Überstand der 60proz. Fällung wurde schließlich die 80proz. Ammoniumsulfat-Fällung erhalten, die nach entsprechender Aufarbeitung wie die beiden vorausgegangenen Fällungen im glycerinhaltigen Medium B (16) gelöst wurde. Die so gewonnenen drei Ammoniumsulfat-Fällungen wurden bis zur Verwendung bei 0° aufbewahrt.

Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgte bei 25—27° auf formamid-imprägniertem Papier (Schleicher & Schüll 2043 b Mgl) mit Monochlorbenzol oder Chloroform (zur Auftrennung der phenolischen

Steroide) oder auf propylen-glykolimprägniertem Papier mit Benzol/Cyclohexan (4:1 v/v) (zur Auftrennung der neutralen Steroide). Die Lokalisierung der Steroide erfolgte durch Messung der Radioaktivität und Vergleich der *R_F*-Werte bzw. Wanderungsgeschwindigkeiten mit denjenigen der authentischen nichtradioaktiven Referenzsubstanzen. Die phenolischen Steroide wurden mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz (17), die neutralen Steroide entweder durch UV-Kontaktphotographie oder Anfärben mit Antimontrichlorid (ges. Lösung von SbCl₃ in Chloroform) (18) sichtbar gemacht.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der Steroide erfolgte nach Papierchromatographie durch Auszählung der Radioaktivität auf 3 cm breiten und 50 cm langen Papierstreifen mit einem Radiopapierchromatographen der Fa. Friesche und Höpfner (Erlangen/Bruck), ausgerüstet mit einem fensterlosen Methan-Durchflußzähler (4 π -Zählgeometrie) und einem Kompensations-Linien-Schreiber der Fa. Dr.-Ing. W. Höfler (Ettlingen/Baden) mit Integrator. Die Zählausbeute für ¹⁴C betrug 14—15%. Die Stickstoffbestimmungen erfolgten nach KJELDAHL (19).

Ergebnisse

Nachweis einer 17 β -Hydroxysteroid: NAD(P)-Oxydoreduktase

Nach 120 Min. Inkubation von 3,1 nMol (100 nC) [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol mit 0,5 ml Serum (10. Schwangerschaftsmonat) und 4,5 μ Mol NAD⁺ in 3,5 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) wurden 0,86 nMol [4-¹⁴C] Östron nachgewiesen; dieses entspricht einer etwa 28proz. Ausbeute. Bei Verwendung von 4,5 μ Mol NADP⁺ als Cofaktor betrug die nachgewiesene Menge 0,72 nMol [4-¹⁴C] Östron, entsprechend einer 23proz. Ausbeute. Nach Inkubation von 3,4 nMol (100 nC) [4-¹⁴C] Östron mit 0,5 ml Serum (10. Schwangerschaftsmonat) und 4,5 μ Mol NADH in 3,5 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 6,0) entstanden 0,74 nMol [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol; dies entspricht einer etwa 22proz. Ausbeute. Bei Zusatz von 4,5 μ Mol NADPH wurden 0,97 nMol [4-¹⁴C] Östron gebildet, entsprechend einer 29proz. Ausbeute. Unter den gewählten Versuchsbedingungen entstanden aus [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol nur [4-¹⁴C] Östron und aus [4-¹⁴C] Östron nur [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol. Die Gesamtwiederfindung der eingesetzten Radioaktivität (¹⁴C) betrug in allen Versuchen etwa 90%. Daraus geht hervor, daß weitere Reaktionen der jeweils eingesetzten Substrate oder der gebildeten Reaktionsprodukte nicht stattfanden. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte [4-¹⁴C] Östron und [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol erfolgte auf Grund ihres Verhaltens bei der Papierchromatographie und durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität.

Kinetische Untersuchungen

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, zeigt die Oxydation von [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol ein Maximum bei einem pH-Wert von etwa 9; für die Reduktion von [4-¹⁴C] Östron wurde ein Maximum bei einem pH-Wert von 6,0 gefunden. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Oxydation von [4-¹⁴C] 17 β -Östradiol zu [4-¹⁴C] Östron ist in Abbildung 2 dargestellt; es wurde ein stetiger Anstieg beobachtet, der jedoch nach 2stdg. Inkubationsdauer deutlich abflacht. Abbildung 3 zeigt, daß im Bereich von 0—0,5 ml Schwangerenserum Linearität zwischen der eingesetzten

Enzympräparation und der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ bestand.

Die Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration des Substrates ($[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol) ist in Form der LINEWEAVER-BURK-Transformation in Abbildung 4 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 8,6 beträgt der K_m -Wert für 17β -Östradiol $5,7 \cdot 10^{-6}\text{M}$. Die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion

wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$K_H = \frac{[\text{Östron}] [\text{NADH}] [\text{H}^+]}{[17\beta\text{-Östradiol}] [\text{NAD}^+]}$$

Abb. 1

Abhängigkeit der Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) von der Wasserstoffionenkonzentration

Kurve 1 (○—○): Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 0,5 ml Schwangersenserum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0—7,4) bzw. 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4—9,0) bzw. 0,6M Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH-Bereich 9,0—10,5) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ gemessen

Kurve 2 (●—●): Jeweils 3,4 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ wurden mit 0,5 ml Schwangersenserum, 4,5 μMol NADH und 0,3M Citrat-Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,0—7,4) bzw. Tris-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,4—9,0) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol gemessen. Alle Versuche wurden in 3,5 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte aus Messungen an 3 verschiedenen Serumproben

Abb. 3

Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der eingesetzten Serummenge. Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit steigenden Mengen Serum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ gemessen. Alle Versuche wurden in 4,0 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Abb. 4

Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Steigende Mengen von inaktivem 17β -Östradiol sowie 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Serum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Abb. 5

Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung der Reaktion $17\beta\text{-Östradiol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Östron} + \text{NADH} + \text{H}^+$ durch 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). 1,55 nMol (50 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol und 1,70 nMol (50 nC) $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ wurden mit 1,0 ml Serum, 4,5 μMol NAD^+ , 4,5 μMol NADH und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Um das Gleichgewicht möglichst rasch zu erreichen, wurde die Reaktion mit 1,70 nMol $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ und 1,55 nMol $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol gestartet. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde das Gleichgewicht nach etwa 7 Std. erreicht (Abb. 5); die Gleichgewichtskonstante beträgt $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}\text{M}$ bei 37° .

Untersuchungen zur Substratspezifität

Um die Substratspezifität der im Serum der Schwangeren nachgewiesenen 17β -Hydroxysteroid: NAD(P) -Oxydoreduktase zu prüfen, wurden folgende Substrate mit dem Enzym inkubiert: $[4-^{14}\text{C}]\text{Testosteron}$, $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -Östradiol und $[4-^{14}\text{C}]\text{Östriol}$ unter oxydierenden Bedingungen (Cofaktor NAD^+ , pH 8,6); $[4-^{14}\text{C}]\Delta^4$ -Androstendion, $[4-^{14}\text{C}]\text{Dehydroepiandrosteron}$ und $[4-^{14}\text{C}]16\text{-Oxo-}17\beta$ -östradiol unter reduzierenden Bedingungen (Cofaktor NADH , pH 6,8). In allen Versuchen wurden die eingesetzten Substrate quantitativ wiedergefunden; es ergaben sich auch bei Erhöhung der Enzymmenge (2—5 ml Serum) keine Anhaltspunkte für

Abb. 2

Zeitlicher Verlauf der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangersenserum, 4,5 μMol NAD^+ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]\text{Östron}$ gemessen. Alle Versuche wurden in 3,0 ml bei 37° durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

die Bildung von Oxydations- oder Reduktionsprodukten. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die 17β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase eine ausgeprägte Substratspezifität hat und die Anwesenheit einer 16-Oxogruppe die Reaktion zwischen Enzym und Substrat auch bei phenolischen Steroiden verhindert.

Versuche zur Aktivierung und Inaktivierung

Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 45° . Die Abhängigkeit der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron von der Temperatur im Bereich von $7-57^\circ$ ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Aktivierungsenergie des Enzyms beträgt unter den vorliegenden Versuchsbedingungen $+10,2$ Kcal/Mol, die Inaktivierungsenergie $-39,4$ Kcal/Mol. Im Temperaturbereich von $27-37^\circ$ wurde ein Q_{10} -Wert von 1,7, im Temperaturbereich $37-47^\circ$ ein Q_{10} -Wert von 1,5 ermittelt. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zur Aktivierung und Inaktivierung zusammengestellt. Keine der untersuchten Verbindungen hatte einen aktivierenden Einfluß auf die 17β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase des Schwangerenserums. In Endkonzentrationen von $10^{-3}-10^{-5}$ Mol/l wurden ausschließlich Hemmungen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Aktivität des Enzyms in unbehandelten Seren rasch abnimmt; dies ist auch der Fall, wenn das Serum bei -18° aufbewahrt wird. Offenbar ist die Schnelligkeit der Inaktivierung während der ersten 2 Std. bei den einzelnen Serumproben verschieden groß (vgl. Probe A und B).

Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat konnte eine 3–4fache Anreicherung der 17β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase bei etwa 50proz. Ausbeute erzielt werden. Die höchste spezif. Aktivität fand sich in der 40–60proz. Ammoniumsulfat-Fraktion.

Abb. 6

Abhängigkeit der Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) von der Temperatur. Jeweils $3,1$ nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit $1,0$ ml Schwangerenserum, $4,5$ μ Mol NAD $\oplus$ und $0,2$ M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Alle Versuche wurden in $3,0$ ml 120 Min. lang durchgeführt. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Abb. 7

Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsmonat. Jeweils $3,1$ nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit $1,0$ ml Schwangerenserum, $4,5$ μ Mol NAD $\oplus$ und $0,2$ M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) in einem Gesamtvolumen von $3,0$ ml 120 Min. lang bei 37° inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen

Abb. 8

Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau unter der Geburt. Jeweils $3,1$ nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit $1,0$ ml Schwangerenserum, $4,5$ μ Mol NAD $\oplus$ und $0,2$ M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) in einem Gesamtvolumen von $3,0$ ml 120 Min. lang bei 37° inkubiert; es wurde die Bildung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gemessen. Die Punkte der Kurve sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Zeit 0 bezeichnet den Zeitpunkt zwischen der Entbindung des Kindes und der Lösung der Placenta

Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase während der Schwangerschaft und unter der Geburt

Die Aktivität des Enzyms ist zu Beginn des 3. Schwangerschaftsmonates in 1 ml Serum mit Sicherheit nachweisbar; sie steigt mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an und erreicht die höchsten Werte unmittelbar ante partum (Abb. 7). Der Mittelwert der Enzymaktivität (nMol $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gebildet/ml Serum und 2 Std.) betrug zu diesem Zeitpunkt $1,98$ bei Schwankungen von $1,74$ bis $2,33$ (8 Serumproben). Ein Teil der relativ großen Schwankungen kann durch die Instabilität des Enzyms erklärt werden. Unmittelbar post partum erfolgt ein starker Abfall der Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase; 18 Std. post partum ist im Serum mit der hier gewählten Versuchsanordnung keine Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 8).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß im Serum der schwangeren Frau ein Enzym vorkommt, welches 17β -Östradiol zu Östron oxydiert und Östron zu 17β -Östradiol reduziert; die Oxydoreduktion erfolgt sowohl mit NAD(H) als auch mit NADP(H) als Co-faktoren. Damit wurde unseres Wissens zum erstenmal ein Enzym des Steroidstoffwechsels im Serum des Menschen nachgewiesen. Die 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase besitzt eine ausgeprägte Substratspezifität: Sie reagiert nach den bisher vorliegenden Befunden nur mit phenolischen C_{18} -Steroiden (17β -Östradiol und Östron), nicht aber mit neutralen C_{19} -Steroiden (Testosteron und Δ^4 -Androstendion, Dehydroepiandrosteron). Darüber hinaus zeigt das Enzym auch eine deutliche Stereospezifität; 17α -Östradiol, das biologisch inaktive Isomere von 17β -Östradiol, wird nicht angegriffen. Diese Feststellung sowie die Tatsache, daß die Aktivität der 17β -Hydroxysteroid : NAD(P)-Oxydoreduktase im Verlaufe der Schwangerschaft zunimmt,

Tab. 1

Wirkung verschiedener Substanzen auf die Oxydation von $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μMol NAD⁺ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt

Zugesetzte Verbindung	Endkonzentration [Mol/l]	Gebildete Menge $[4-^{14}\text{C}]$ Östron in nMol	Änderung gegenüber dem Kontrollwert [%]
keine	—	1,88	—
Jodessigsäure	10 ⁻³	1,82	0
	10 ⁻⁵	1,84	0
Jodacetamid	10 ⁻³	1,67	-11
	10 ⁻⁵	1,80	0
<i>o</i> -Phenanthrolinhydrochlorid	10 ⁻³	1,08	-43
	10 ⁻⁵	1,77	-5
ZnCl ₂	10 ⁻³	0,39	-79
	10 ⁻⁵	1,84	0
HgCl ₂	10 ⁻³	0	-100
	10 ⁻⁵	1,02	-44
MgCl ₂	10 ⁻³	1,86	0
	10 ⁻⁵	1,90	0
<i>p</i> -Chlormercuribenzoat	10 ⁻³	0	-100
	10 ⁻⁵	1,50	-20

Tab. 2

Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase im Serum der schwangeren Frau (10. Schwangerschaftsmonat) in Abhängigkeit von der Dauer und der Temperatur der Aufbewahrung. Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 1,0 ml Schwangerenserum, 4,5 μMol NAD⁺ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 3,0 ml 120 Min. lang bei 37° durchgeführt. Das bei -18° gehaltene Serum wurde in einzelnen Portionen eingefroren; diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetaut und zum Versuch verwendet

Serumprobe	Aufbewahrungs-Temperatur vor Inkubation in °C	Dauer der Aufbewahrung in Stdn.	Gebildete Menge $[4-^{14}\text{C}]$ Östron in nMol	Änderung gegenüber dem Ausgangswert [%]
A	+20	0	2,10	—
		2	1,49	-29
		6	0,78	-64
		22	0,09	-96
		46	0	-100
B	+5	0	1,90	—
		5	0,37	-80
		22	0,19	-90
		120	0,07	-96
		382	0	-100
	-18	0	1,90	—
		5	0,58	-69
		22	0,58	-69
		120	0,47	-75
		382	0,39	-79
		990	0,37	-80

Tab. 3

Gesamtaktivitäten und spezif. Aktivitäten der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase in verschiedenen Präparationen des Schwangerenserums (10. Schwangerschaftsmonat). Jeweils 3,1 nMol (100 nC) $[4-^{14}\text{C}]17\beta$ -Östradiol wurden mit 0,5 ml der Enzympräparation, 4,5 μMol NAD⁺ und 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 8,6) inkubiert. Alle Versuche wurden in 2,5 ml 60 Min. lang bei 37° durchgeführt. AS = Ammoniumsulfat. Weitere Einzelheiten s. Methodik

Präparation	Gebildete Menge $[4-^{14}\text{C}]$ Östron [nMol/0,5 ml u. Stde.]	Eiweißgehalt [mg/0,5 ml]	Gesamtaktivität [nMol $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gebildet/Stde.]	Spezif. Aktivität [pMol $[4-^{14}\text{C}]$ Östron gebildet/mg Eiweiß u. Stde.]
Serum	0,217	38,0	5,21	5,7
40proz. AS-Fällung	0,326	35,5	1,30	9,2
60proz. AS-Fällung	0,620	31,5	2,48	19,7
80proz. AS-Fällung	0,170	32,8	0,68	5,2

ihre höchsten Werte unmittelbar ante partum erreicht und etwa 18 Stdn. post partum nicht mehr nachweisbar ist, sprechen für den placentaren Ursprung des Enzyms. Wie aus den Arbeiten von ENGEL und Mitarbeitern (20, 21) und von TALALAY und Mitarbeitern (16) bekannt ist, verfügt nämlich die Placenta des Menschen über eine sehr aktive 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase — auch als Östradiol- 17β -Dehydrogenase bezeichnet (20, 21) —, die um etwa das 2500fache angereichert (16) und inzwischen in kristalliner Form (22) erhalten wurde; das Placentaenzym reagiert ebenfalls nur mit der 17β -Hydroxygruppe von 17β -Östradiol und ist gegenüber 16-Oxo- 17β -östradiol und Testosteron genau so inaktiv (21) wie das Serumenzym. Es liegt demnach nahe anzunehmen, daß die placentare 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase aus dem Gewebe in das Blut übertritt und somit im Serum der Schwangeren nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen liefern weitere Hinweise für die placentare Herkunft des hier beschriebenen Serumenzym. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten für 17β -Östradiol betragen beim placentaren Enzym $4,5 \cdot 10^{-6}$ M (21) und beim Serumenzym $5,7 \cdot 10^{-6}$ M. Beide 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktasen reagieren sowohl mit NAD(H) als auch mit NADP(H), wobei allerdings geringfügige quantitative Unterschiede bestehen. So wird Östron durch das Serumenzym in Gegenwart von NADPH schneller reduziert als in Gegenwart von NADH; das hochgereinigte placentare Enzym verhält sich umgekehrt (16). Dagegen wurde für die Oxydation von 17β -Östradiol durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase des Serums — ähnlich wie mit dem hochgereinigten Placentaenzym (16) — ein nur etwas höherer Umsatz mit NAD⁺ als mit NADP⁺ beobachtet, während das weniger gereinigte Placentaenzym (20) mit NAD⁺ einen doppelt so großen Umsatz zeigte. Diese geringen Unterschiede dürften durch die verschiedenen Reinheitsgrade der Enzympräparation bedingt sein.

Wie zu erwarten war und in Übereinstimmung mit dem Verhalten der placentaren 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase wird die Aktivität des Serumenzym durch SH-Gruppen blockierende Substanzen, wie z. B. Jodacetamid, *o*-Phenanthrolinhydrochlorid, Zink- und Quecksilberionen sowie *p*-Chlormercuribenzoat, gehemmt; eine Aktivierung des Serumenzym durch geringe Konzentrationen von Zinkionen konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Charakteristisch für die 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums ist ihre außergewöhnliche Instabilität. Auch durch Fällung des Enzyms mit Ammoniumsulfat und Aufnahme der so gewonnenen Enzympräparation in einem glycerinhaltigen Medium konnte eine Inaktivierung nicht verhindert werden. Aus diesem Grunde besitzen die Angaben, die in der vorliegenden Arbeit über die spezif. Aktivitäten in den einzelnen Ammoniumsulfat-Fractionen gemacht werden, nur einen relativen Wert; dies ist durch die Tatsache bedingt, daß die Aktivitätsmessungen infolge des unvermeidlichen

Zeitverlustes bei der Ammoniumsulfat-Fällung frühestens 7—8 Stdn. nach Entnahme des Blutes durchgeführt werden konnten. Es ließ sich jedoch zeigen, daß die höchste spezif. Aktivität des Serumenzym in der 40—60proz. Ammoniumsulfat-Fällung vorhanden ist. Auch das Placentaenzym wird durch Halbsättigung des Homogenat-Überstandes mit Ammoniumsulfat angereichert (16, 20). Wie bereits erwähnt, wird eine Inaktivierung der 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums — im Gegensatz zum placentaren Enzym — durch Zusatz von Glycerin nicht verhindert. Dagegen hat 17β -Östradiol offenbar einen stabilisierenden Effekt, wie er im übrigen auch für das Placentaenzym angegeben worden ist (16, 20). Diese Schlußfolgerung kann aus den Ergebnissen der längerdauernden Inkubationsversuche (Zeit-Umsatz-Kurve, Bestimmung der Gleichgewichtseinstellung) gezogen werden: Erfolgte nämlich die Inkubation des Serums unmittelbar nach Gewinnung des Blutes mit 17β -Östradiol, so lagen die Enzymaktivitäten — unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der Schwangerschaft — stets in der gleichen Größenordnung. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß vergleichende Untersuchungen über die Aktivität der 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase des Serums während der Schwangerschaft nur unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführt werden können. Wegen ihrer relativ geringen spezifischen Aktivität stellt die 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase das Gleichgewicht zwischen oxydierter und reduzierter Verbindung wesentlich langsamer ein als entsprechende Enzyme bakteriellen Ursprungs. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen wurde das Gleichgewicht erst nach etwa 7 Stdn. erreicht; die Gleichgewichtskonstante K_H des Serumenzym beträgt bei 37° $18 \pm 3 \cdot 10^{-9}M$

und entspricht damit derjenigen der 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase der menschlichen Placenta (20). Die Übereinstimmung der Gleichgewichtskonstanten ist insofern erstaunlich, als die Messung von Gleichgewichten stark durch die Reinheit der verwendeten Enzympräparation beeinflusst wird (23, 24). Das Temperaturoptimum der im Schwangerenserum nachgewiesenen 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase ist mit 45° relativ hoch. Die Aktivierungsenergie des Enzyms beträgt + 10,2 Kcal/Mol und liegt damit in der Größenordnung für Oxydoreduktasen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, daß die 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase im Serum schwangerer Frauen aus der Placenta stammt und in ihren enzymkinetischen Eigenschaften weitestgehend mit der placentaren 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase ($\text{Östradiol-}17\beta$ -Dehydrogenase) identisch ist. Das Verhalten der Enzymaktivität während der Schwangerschaft sowie kurz vor und nach der Geburt läßt den Schluß zu, daß durch Bestimmung des Serumenzym Rückschlüsse auf den Funktionszustand der foeto-placentaren Einheit ermöglicht werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um festzustellen, welche Bedeutung der Aktivitätsbestimmung der 17β -Hydroxysteroid:NAD(P)-Oxydoreduktase im Schwangerenserum für die klinisch-chemische Diagnostik zukommt.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Herrn Oberarzt Priv.-Doz. Dr. W. KORTE, Universitäts-Frauenklinik Bonn, sind wir für seine wertvolle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Herrn Dr. K. J. BECK, Universitäts-Frauenklinik Bonn, danken wir für die Mithilfe bei der Beschaffung von Blutproben und Herrn Dr. K. DAHM, Marienkrankenhaus Hamburg, für Anregungen und Hinweise.

Literatur

1. REPKE, K. und F. MARKWARDT, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 223, 271 (1954). — 2. BISHOFF, F., A. TORRES und G. LOPEZ, Amer. J. Physiol. 189, 447 (1957). — 3. PORTIUS, H. J. und K. REPKE, Naturwissenschaften 47, 43 (1960). — 4. PORTIUS, H. J. und K. REPKE, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 239, 184 (1960). — 5. BROWN, B. T., W. S. GOLDBER und S. E. WRIGHT, Austral. J. Exper. Biol. 39, 345 (1961). — 6. BREUER, H., Arzneimittel-Forsch., Aulendorf 9, 667 (1959). — 7. PORTIUS, H. J. und K. REPKE, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 239, 299 (1960). — 8. TRACHEWSKY, D. und R. HOBKIRK, J. biol. Chemistry 239, 3683 (1964). — 9. HUFFMAN, M. N. und M. H. LOTT, J. biol. Chemistry 172, 325 (1948). — 10. ALLAIS, A. und CH. HOFFMANN, U.S. Patent 2835681, C. A. 52, 18531 (1958). — 11. FOLIN, O. und V. CIOCALTEU, J. biol. Chemistry 73, 627 (1927). — 12. McILVAINE, T. C., J. biol. Chemistry 49, 183 (1921). — 13. SÖRENSEN, S. P. L., Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmacol. 12, 393 (1912). — 14. GOMORI, G., in: Colowick, S. P. und N. O. Kaplan (Hrsg.): Methods in Enzymology. Bd. I, S. 138. Academic Press, New York (1955). — 15. DELORY, G. E. und E. J. KING, Biochem. J. 39, 245 (1945). — 16. JARABAK, J., ADAMS, J. A., WILLIAMS-ASHMAN, H. G. und P. TALALAY, J. biol. Chemistry 237, 345 (1962). — 17. MITCHELL, F. L. und R. E. DAVIS, Biochem. J. 56, 690 (1954). — 18. NEHER, R., Steroid chromatography. Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964). — 19. BRADSTREET, R. B., The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Academic Press, New York und London (1965). — 20. LANGER, L. J. und L. L. ENGEL, J. biol. Chemistry 233, 583 (1958). — 21. LANGER, L. J., ALEXANDER, J. A. und L. L. ENGEL, J. biol. Chemistry 234, 2609 (1959). — 22. TALALAY, P., persönliche Mitteilung. — 23. TALALAY, P. und P. I. MARCUS, J. biol. Chemistry 218, 675 (1956). — 24. RACKER, E., J. biol. Chemistry 184, 313 (1950).

Prof. Dr. H. Breuer
Abt. f. Klin. Chemie u. Biochemie
Chirurgische Universitätsklinik
53 Bonn-Venusberg