

DIE AKTIVITÄT DER *N*- UND *O*-DEMETHYLASE IN DER LEBER DES MENSCHEN

ELSE ACKERMANN und ILSE HEINRICH

Institut für Pharmakologie, Abteilung für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus" in Dresden DDR

(Received 14 June 1969; accepted 24 July 1969)

Abstract—The activity of the drug metabolizing enzymes for *N*-monomethyl-*p*-nitroanilin and *p*-nitroanisole was determined spectrophotometrically in human liver obtained by biopsy. The activity of the NADPH-cytochrome *c* reductase in the microsomal fraction was also ascertained. The activities of the glucose-6-phosphatase, β -glycerophosphatase and protein content of the subcellular fractions were determined and compared with those in rat liver. Human liver homogenate has a lower protein content, and lower glucose-6-phosphatase and β -glycerophosphatase activity, than rat liver. The microsomal fraction of human liver is more highly contaminated with lysosomes. The activity of the *N*- and *O*-demethylase of the human liver is significantly higher than in rat liver. The activity of the NADPH-cytochrome *c* reductase is lower in human liver. The *N*- and *O*-demethylase depends on NADPH. NADH has only a small cofactor effect. *p*-Nitroanilin and *p*-nitrophenol are the only products of the *N*- and *O*-demethylation. The Michaelis-Menten constants are 11 μ M and 22 μ M for the *N*- and *O*-demethylase respectively. Rat liver microsomes give similar values. The *N*-demethylase shows a greater activity, when the NADPH concentration in the incubation mixture is preserved by a NADPH generating system, and when nicotinamide, which inhibited the demethylation, is omitted.

IN DER Mikrosomenfraktion der Leber sind unspezifische Enzymsysteme lokalisiert,¹⁻⁵ deren Substrate Arzneimittel, aber auch körpereigene Substanzen wie Steroide sind.⁶ Diese NADPH und O₂ abhängigen Reaktionen wurden den mischfunktionellen Oxydases zugeordnet.⁷ Die Substratoxydation wird durch ein sauerstoffaktivierendes Cytochrom vermittelt.⁹

Die Funktionsfähigkeit der Oxydases bestimmt die Dauer und die Intensität vieler Arzneimittelwirkungen. So verändert sich die Halbwertszeit von Pharmaka als ein Parameter zur Beurteilung der Aktivität dieser Enzyme in Abhängigkeit von ihrem Funktionszustand. Dieser wird durch Lebensalter, Geschlecht, Spezies, Ernährungszustand, Hormone,^{8, 11} Arzneimittel¹⁰ und andere körperfremde Substanzen wie Karzinogene¹² und Insektizide beeinflußt.¹³ Als Ausdruck der Speziesvariabilität verlängert sich die Halbwertszeit für einige Arzneimittel in der Reihenfolge Maus, Ratte, Hund und Mensch.¹⁴ Halbwertszeit und in vitro Aktivität der "arzneimittelabbauenden Enzyme" lassen sich bei Ratten und anderen Tierspezies miteinander korrelieren.¹⁴⁻¹⁸ Trotzdem erscheint die Bestimmung der Halbwertszeit einiger ausschließlich oder vorwiegend durch diese Enzyme metabolisierter Arzneimittel nicht ausreichend zur Beurteilung der enzymatischen Aktivität, weil diese Größe durch Metabolismus und Ausscheidung bestimmt wird.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an der Ratte und anderen Tierspezies ist über die *in vitro* Aktivität der mischfunktionellen Oxydasen in der Leber des Menschen nur wenig bekannt. Mit autoptisch gewonnenem Material, das zu verschiedenen Zeiten nach Eintritt des Todes entnommen wurde, konnte eine hydroxylierende Aktivität unterschiedlicher Intensität gefunden werden.¹⁹ An bioptischem während einer Operation exstirpierten Lebergewebe wiesen andere Autoren für 3,4-Benzpyren, Pentobarbital und 3-Methyl-4-Monomethylaminoazobenzol verglichen mit männlicher Rattenleber eine geringere, für die Dealkylierung des Phenazetin dagegen eine größere Umsatzrate nach.²⁰⁻²¹ Die Eigenschaften der Benzpyrenhydroxylase hinsichtlich ihrer Kinetik, Kofaktorbedürfnis und subzellulärer Lokalisation waren mit denen der Rattenleber vergleichbar. Allerdings erlaubte die kleine Probandenzahl keine statistische Sicherung der für die einzelnen Substrate z.T. erheblich von der Rattenleber abweichenden Aktivität. Ziel unserer Untersuchungen sollte die Aktivitätsbestimmung der *N*-und *O*-Demethylase in der Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber sein. Die in der Elektronenflußkette dem Cytochrom P 450 vorgeschaltete NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase²²⁻³² wurde als Bestandteil des Hydroxylierungsmechanismus miterfaßt. Die Aktivitäten der Demethylasen und Reduktasen wurden zwischen Mensch und Ratte verglichen.

METHODIK

1. Untersuchungsmaterial

Wir verwendeten für unsere Fragestellung durch Keilexzision gewonnene Leber menschlicher Probanden. Das bioptische Material stammte ausschließlich von Patienten, die wegen eines unkomplizierten Gallensteinleidens cholezystektomiert wurden und deren Leber funktionell nicht geschädigt war. Um eine Hemmung, Induktion oder Interferenz der zu untersuchenden Enzyme zu vermeiden, wurde als Prämedikation nur Dolcontral und Atropin erlaubt. Auf Phenobarbital wurde wegen einer möglichen Induktion verzichtet und aus den gleichen Gründen nach Tablettenabusus und noch laufender medikamentöser Therapie gefragt. Ebenso erschien uns Hexobarbital zur Narkoseeinleitung nicht geeignet, da kompetitive Reaktionen in Abhängigkeit von der Substrataffinität beschrieben wurden.³³ Die Narkose wurde nur mit Lachgas-Halothan durchgeführt, da von diesen Inhalationsnarkotika keine Beeinflussung der Aktivität zu erwarten war.³⁴ Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 50 Jahren, das Verhältnis des männlichen zum weiblichen Geschlecht war 1:2.

2. Aufarbeitung der Leber

Die Leberproben hatten ein Gewicht von etwa 1 g. Sofort nach der Entnahme wurde das Gewebsstück in eisgekühlte SVT-Lösung [Saccharose 262 mM, Versen (EDTA) 6,85 mM und Tris 20 mM] gelegt.³⁵ Die anschließende Homogenisation in SVT-Lösung in einem Verhältnis 1:5 in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator erfolgte ungefähr 15 bis 30 Minuten nach der Exzision. Da an einem Tag meistens zwei oder drei Probanden operiert wurden, mußten die Homogenate über einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden gesammelt und bei 0° aufbewahrt werden. Das Gesamtgewicht der Leber betrug selten mehr als 2 g. Für die subzelluläre Fraktionierung der gepoolten Leberproben diente eine präparative Ultrazentrifuge VAC 60 der Firma Janetzki. Bei 10,000 g wurden zunächst die Kerne, Mitochondrien und Lysosomen in einem Schritt abgetrennt. Um die Mikrosomenausbeute zu erhöhen,

wurde der 10,000 g Niederschlag in etwa der Hälfte des für die Homogenisation verwendeten Volumens resuspendiert und nochmals bei 10,000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und so verdünnt, daß 1 ml etwa 0,15 g Feuchtgewicht entsprach. Der durch die anschließende Zentrifugation bei 78,000 g gewonnene Niederschlag wurde wiederum in SVT-Lösung aufgenommen und resuspendiert. 1 ml dieser Mikrosomensuspension war ungefähr 0,3 g Feuchtgewicht äquivalent.

3. Bestimmung der Referenzenzyme

Glucose-6-Phosphatase. Die Aktivität ermittelten wir nach der Methode von Swanson³⁶ in Zitratpuffer.^{37, 38}

Saure Phosphatase. Als Substrat diente β -Glycerophosphat.³⁹ Die Angabe der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase und der sauren Phosphatase erfolgte in mg P/g Feuchtgewicht bzw. g Protein in 30 bzw. 120 Minuten. Phosphat wurde nach der Methode von Fiske-Subbarow bestimmt.⁴⁰

4. Bestimmung der *NADPH-Cytochrom-c-Reduktase*

Die Aktivität erfaßten wir mit Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor. Die Reaktion wurde mit NADPH 0,2 ml gestartet und die Lösung so angesetzt, daß die Endkonzentration in einem Inkubationsvolumen von 3 ml 0,1 mM war. Die Extinktionszunahme wurde bei 550 nm kontinuierlich mit dem Spektralphotometer Unicam SP 800 gemessen und die Aktivität in Mol reduziertes Cytochrom *c* angegeben. Der Berechnung lag der molare Extinktionskoeffizient von $23 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ für reduziertes Cytochrom *c* (Cyto-Mack) zugrunde. Alle Reagenzien mit Ausnahme des Cytochrom *c*, das bereits in einer NaCl-Lösung vorlag, wurden in 0,05 M Trispuffer pH 7,4 gelöst.²⁴ Die Reaktionstemperatur war 37°.

5. Bestimmung der Demethylasen

Als Substrat der *N*-Demethylase wurde *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin eingesetzt und die Aktivität durch Extinktionsmessungen bei 420 nm bestimmt.⁴¹ In unseren Versuchen entsprach bei einem Proteingehalt von 1 mg/ml Inkubat eine ΔE von 0,1 einer Konzentrationsänderung von 0,01 mM *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin. Um den Fehler durch eine Eiweißbindung des Substrats oder des Reaktionsproduktes klein zu halten, wurde nur soviel Mikrosomenprotein eingesetzt, daß es annähernd den Bedingungen der Eichkurve entsprach. Die Reaktion wurde nach einem Vorlauf von 2½ Minuten mit 1,0 μ Mol NADPH in einem Volumen von 0,2 ml gestartet, so daß die NADPH-Endkonzentration in einem Inkubationsvolumen von 3 ml 0,33 mM war. Unter den Bedingungen einer Reaktion 0. Ordnung war der Reaktionsverlauf über einen Zeitraum von 20 Minuten linear. Um eine möglichst endogene Entstehung von NADPH über eine Verunreinigung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und damit einen vorzeitigen Reaktionsbeginn auszuschließen, wurde gegen eine Kuvette gemessen, die kein Substrat enthielt. Mikrosomen, die unter diesen Bedingungen bereits eine Abnahme der Extinktion vor Reaktionsstart mit NADPH zeigten, wurden nicht ausgewertet. Einige Ansätze enthielten ein NADPH-generierendes System. Es bestand aus: Glucose-6-Phosphat 2 mM, MgSO₄ 5 mM und einer bestimmten Menge der löslichen Fraktion (0,2 bis 0,4 ml), die ungefähr 30 nM NADP/mg Protein/ml Ansatz/Minute reduziert.³⁷ Die Reaktion wurde mit NADP (Endkonzentration 50 μ M) oder NADPH wie bereits beschrieben gestartet.

p-Nitroanisol als Substrat der *O*-Demethylase^{42, 43} erwies sich in dem auch für die *N*-Demethylase verwendeten Phosphatpuffer pH 7.85 so unlöslich, daß nur mit gesättigten Lösungen gearbeitet werden konnte. Die Konzentration dieser Lösung war etwa 2 mM. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante war eine genaue Konzentrationsbestimmung notwendig. Zu diesem Zweck wurde *p*-Nitroanisol in 0.1 N NaOH gelöst und der molare Extinktionskoeffizient mit $11 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ errechnet.

Der molare Extinktionskoeffizient für *p*-Nitrophenol, dem Reaktionsprodukt von *p*-Nitroanisol, betrug bei 430 nm $10 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$. Eine ΔE von 0.1 entsprach damit einer *p*-Nitrophenolmenge von 0.01 mM. Mikrosomenprotein bis zu einer Menge von 1 mg/ml Inkubat war ohne Einfluß. Die Reaktion wurde ebenfalls mit 1.0 μMol NADPH in einem Volumen von 0.2 ml gestartet. Unter den Bedingungen einer Reaktion 0. Ordnung war der Reaktionsverlauf mindestens 20 Minuten linear.

Beide Demethylierungsreaktionen wurden in einem Spektralphotometer Unicam SP 800 bei fester Wellenlänge verfolgt. Als Vergleich der mit Leber vom Menschen ermittelten Aktivitäten diente Leber männlicher Wistaratten mit einem Gewicht zwischen 180 und 200 g. Für eine Fraktionierung wurden immer drei Tiere verwendet und in der bereits beschriebenen Weise aufgearbeitet.

6. Eiweißbestimmung

Sie erfolgte nach der Methode von Lowry⁴⁴ in der Modifikation, daß die Farbentwicklung in einem Wasserbad bei 40° über einen Zeitraum von 20 Minuten abgewartet und anschließend bei 630 nm gemessen wurde. In jedem Versuch wurde eine Eiweißbeichkurve mitgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

7. Statistische Berechnungen

Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem *t*-Test durchgeführt und die Streuungen als mittlerer Fehler ($s_{\bar{x}}$) des Mittelwertes (\bar{x}) angegeben. Die Michaelis-Menten Konstante wurde graphisch aus der Regressionsgeraden ermittelt, indem $1/v$ gegen $1/S$ aufgetragen wurde und errechnet nach

$$K_m = \frac{b}{\bar{y} - b\bar{x}}$$

wobei K_m = Michaelis-Menten Konstante,

b = Regressionskoeffizient,

\bar{y} = Mittelwert der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten v ,

\bar{x} = Mittelwert der reziproken Substratkonzentrationen S

bedeuten.

Chemikalien:

N-Monomethyl-*p*-Nitroanilin und *p*-Nitroanisol von Dipl.Chemiker Dr. Richter synthetisiert,

Glucose-6-Phosphat: Reanal Budapest,

β -Glycerophosphat: Merck Darmstadt,

NADPH 90%: VEB Arzneimittelwerk Dresden,

NADH 82.5%: VEB Arzneimittelwerk Dresden,

Cytochrom *c*: Cyto-Mack und Reanal Budapest,

Serumalbumin: Behringwerke Marburg/Lahn.

ERGEBNISSE

In der Mikrosomenfraktion findet sich erwartungsgemäß die höchste spezifische Aktivität an Glucose-6-Phosphatase. Im Homogenat und im 10,000 g Niederschlag (Kerne, Mitochondrien und Lysosomen) bestehen in den spezifischen Glucose-6-Phosphatase-Aktivitäten keine Unterschiede zwischen Mensch und Ratte.

Ein anderes Verhalten zeigen die spezifischen Aktivitäten der β -Glycerophosphatase. Die Ratte hat die größte spezifische Aktivität an saurer Phosphatase im 10,000 g Niederschlag, der Mensch dagegen unter unseren Fraktionierungsbedingungen in der Mikrosomenfraktion.

In der Tabelle 1 sind die auf g Feuchtgewicht bezogenen Aktivitäten an Glucose-6-Phosphatase, β -Glycerophosphatase und der Proteingehalt eingetragen. Im Homogenat hat die Ratte einen signifikant höheren Proteingehalt/g Feuchtgewicht als der Mensch. Wenn man die im 10,000 g Niederschlag, Mikrosomen und Überstand (78,000 g) gefundene Proteinmenge gleich 100% setzt, dann beträgt der Anteil an Mikrosomenprotein für Mensch und Ratte etwa 16%. Auch in späteren Fraktionierungsversuchen blieb dieser Anteil konstant.⁵⁹ Entsprechend dem höheren Eiweißgehalt im Homogenat hat die Ratte in der Mikrosomenfraktion auch mehr Protein/g Feuchtgewicht als der Mensch.

Auf eine Bestimmung der Succinatdehydrogenase⁴⁵ als Referenzenzym für mitochondriale Aktivität war zunächst verzichtet worden, weil eine fehlende oder minimale lysosomale Verunreinigung der Mikrosomen eine mitochondriale Aktivität in dieser Fraktion ausgeschlossen hätte. Die hohe Aktivität an saurer Phosphatase veranlaßte uns, die Succinatdehydrogenase-Aktivität in allen Fraktionen zu bestimmen. Dabei ergab sich für die menschliche Leber eine mitochondriale Verunreinigung von 12% im Vergleich zu 6% in den Mikrosomen der Rattenleber. Damit ist die Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber unter unseren Fraktionierungsbedingungen mit einem größeren Anteil an Fremdeiweiß behaftet als die Rattenleber.

NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität

Diese FAD* enthaltende Reduktase hat in Rattenlebermikrosomen eine signifikant höhere spezifische Aktivität als in den Mikrosomen des Menschen. Auch mit Feuchtgewicht als Bezugsgröße wird in der Mikrosomenfraktion der Ratte signifikant mehr Cytochrom *c* pro Zeiteinheit reduziert als in der entsprechenden Fraktion des Menschen. Dieser Unterschied bleibt auch dann bestehen, wenn die Aktivitäten auf eine 100%ige Mikrosomenausbeute korrigiert werden (Tabelle 2). Im 78,000 g Überstand läßt sich für Mensch und Ratte noch eine Cytochrom *c* reduzierende Aktivität nachweisen.

Demethylaseaktivität

Die pro g Feuchtgewicht angegebenen Aktivitäten sind für die *N*-Demethylase zwischen Mensch und Ratte gleich, auch wenn diese Werte auf eine 100%ige Mikrosomenausbeute korrigiert werden. Dagegen ist die spezifische Aktivität in den Mikrosomen der menschlichen Leber größer als die der Ratte (Tabelle 2). Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch für die *O*-Demethylase (Tabelle 2).

Auf eine Bilanzierung der in den einzelnen Fraktionen vorhandenen Demethylaseaktivität wurde verzichtet, weil durch den großen Eiweißeinsatz der Fraktionen, die

* Flavinadenindinukleotid.

TABELLE 1. PROTEIN, GLUCOSE-6-PHOSPHATASE- UND β -GLYCEROPHOSPHATASE-AKTIVITÄT IN VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN DER RATTENLEBER UND DER LEBER DES MENSCHEN BEZOGEN AUF g FEUCHTGEWICHT UND DIE PROZENTUALE VERTEILUNG

Fraktion	Protein mg/g Feuchtgewicht			Glucose-6-Phosphatase mg P/g Feuchtgewicht/30 min			β -Glycerophosphatase mg P/g Feuchtgewicht/120 min											
	Ratte	Mensch	Ratte	Mensch	Ratte	Mensch	Ratte	Mensch										
	n	%	n	%	n	%	n	%										
1 Homogenat	229 ± 7.2 (17)	—	150.3 ± 10* (31)	—	5.2 ± 0.7 (31)	—	3.6 ± 0.2* (29)	—	17.4 ± 2.2 (10)	—	8.5 ± 5.3* (33)	11 (33)						
2 Mitochondrien Lysosomen	86.5 ± 8 (17)	7	43	45.7 ± 3.5 (31)	14	32	1.2 ± 0.2 (31)	6	25.8	0.8 ± 0.1 (29)	14 (10)	22	8.7 ± 1.8 (10)	4	67.4	2.5 ± 0.2 (23)	11	34.3
3 Mikrosomen	32 ± 2.8 (17)	7	15.9	23.4 ± 2.8 (27)	13	16.5	3.2 ± 0.3 (31)	6	67.5	2.6 ± 0.4 (26)	12 (10)	71	2.3 ± 1.0 (10)	4	17.5	3.3 ± 0.3 (18)	10	45.2
4 Überstand	82.5 ± 7 (13)	7	41	72.5 ± 10.4 (25)	12	48.5	0.3 ± 0.1 (31)	6	6.8	0.3 ± 0.05 (24)	12 (10)	7.3	1.9 ± 0.4 (10)	4	15.1	1.5 ± 0.3 (19)	9	20.5

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. die Zahl der Versuchstiere an. Angegeben sind der Mittelwert (\bar{x}) und der mittlere Fehler ($s\bar{x}$).
 * bedeutet $P < 1\%$.

TABELLE 2. DIE AKTIVITÄTEN (V_{max}) DER *N*-DEMETHYLASE, *O*-DEMETHYLASE UND NADPH-CYTOCHROM *c*-REDUKTASE

	<i>N</i> -Demethylase (μ M p-Nitroanilin/m/min)				<i>O</i> -Demethylase (μ M p-Nitrophenol/m/min)				NADPH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase (μ M red Cytochrom <i>c</i> /ml/min)			
	n	/g Feuchtgew.	/g Eiweiß	n	/g Feuchtgew.	/g Eiweiß	n	/g Feuchtgew.	/g Eiweiß	(21)	10	2·1 ± 0·15
Mensch	10 (22)	0·048 ± 0·005	2·34 ± 0·33	6 (10)	0·054 ± 0·012	2·19 ± 0·3	10 (21)	2·1	103·2 ± 8·7			
auf 100 % korrigiert		0·063 ± 0·008			0·075 ± 0·14			2·9	2·9 ± 0·18			
Ratte	8 (20)	0·041 ± 0·005	1·28 ± 0·11	6 (16)	0·037 ± 0·009	1·29 ± 0·24	9 (23)	5·1	161·4 ± 14·6			
auf 100 % korrigiert P in Prozent		0·066 ± 0·01			0·06 ± 0·014			8·14	8·14 ± 1·04			
					P < 5			P < 1	P < 1			

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Angegeben sind der Mittelwert (\bar{x}) und der mittlere Fehler (s_x).

sich durch eine geringe spezifische Aktivität auszeichnen, infolge unspezifischer Bindung der Substrate oder Reaktionsprodukte an Eiweiß mit einer Verfälschung der Ergebnisse gerechnet werden mußte.

Die Demethylierung in den Lebermikrosomen des Menschen ist spezifisch für NADPH. NADH kann in der gleichen molaren Konzentration nur eine geringe Substratmenge demethylieren. Den deutlich aktivierenden Einfluß des NADPH auf die Demethylierung zeigt die Abb. 1. Die trotzdem noch nachweisbare Kofaktoraktivität des NADH scheint eine Eigenwirkung dieses Pyridinnukleotids zu sein und nicht Folge einer Transhydrogenasereaktion.⁴⁶ In einem anderen Versuchsansatz

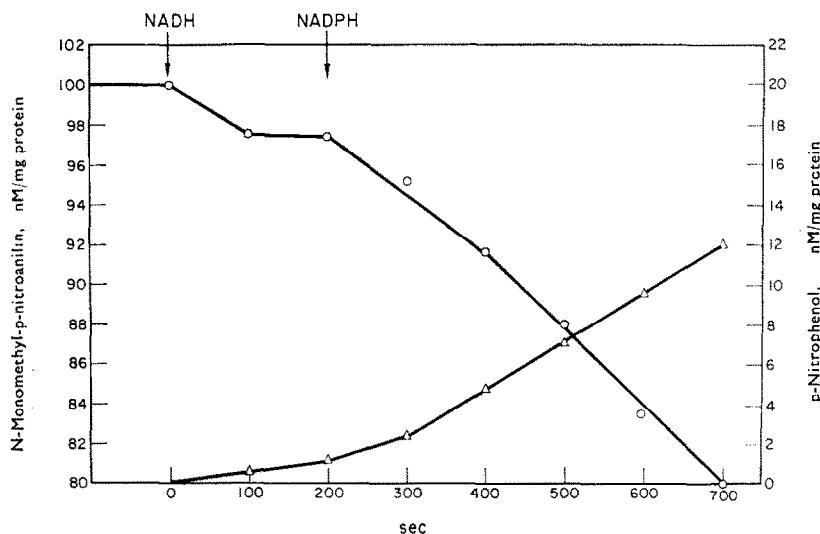


ABB. 1. Der Verlauf der *N*- und *O*-Demethylierung in den Lebermikrosomen des Menschen unter NADH und NADPH.

wurde geprüft, ob exogenes NADPH oder in einem generierenden System endogen entstandenes den gleichen Effekt haben. Um eine optimale NADPH-Konzentration in unserem System zu erreichen, ergänzten wir die Sättigungskonzentration des NADPH durch das generierende System, das aus löslicher Fraktion (78,000 g Überstand), Glucose-6-Phosphat und MgSO₄ bestand. Unter diesen Bedingungen erzielten wir eine größere Reaktionsgeschwindigkeit als mit exogenem NADPH in einer Sättigungskonzentration. Wurde NADPH in dem generierenden System durch NADP ersetzt, dann sank die Reaktionsgeschwindigkeit geringfügig ab (Abb. 2). Unter Nikotinamid in einer Endkonzentration von 20 mM war die demethylierende Aktivität besonders in dem Ansatz vermindert, der NADPH enthielt. Ein ähnliches Verhalten findet man mit Rattenlebermikrosomen (Abb. 3).

Netter konnte als einziges Reaktionsprodukt der Demethylierungsreaktionen *p*-Nitroanilin und *p*-Nitrophenol in den Inkubaten mit Rattenlebermikrosomen nachweisen.^{41, 42} Wir versuchten, die Reaktionsprodukte in den Inkubaten mit Lebermikrosomen des Menschen zu erfassen. Als Nachweisverfahren verwendeten wir die Dünnschichtchromatografie mit Chloroform als Laufmittel. Um eine möglichst

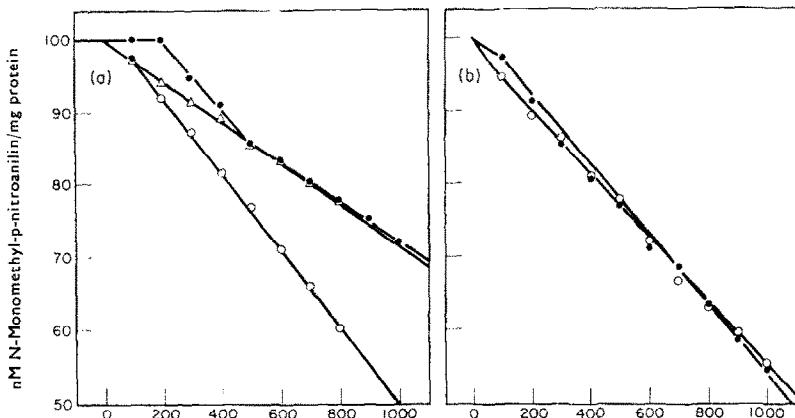


ABB. 2. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der *N*-Demethylase mit *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin als Substrat in den Lebermikrosomen des Menschen.

a.

Kofaktor: NADPH

\triangle — \triangle NADPH

\circ — \circ NADPH + generierendes System

\bullet — \bullet NADPH + generierendes System + Nikotinamid 20 mM.

b.

Kofaktor: NADP

\circ — \circ NADP + generierendes System

\bullet — \bullet NADP + generierendes System + Nikotinamid 20 mM.

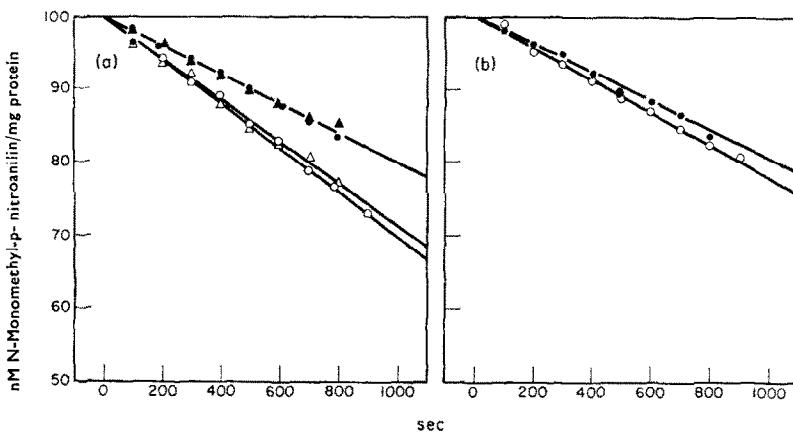


ABB. 3. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der *N*-Demethylase mit *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin als Substrat in den Lebermikrosomen der Ratte.

a.

Kofaktor: NADPH

\triangle — \triangle NADPH

\blacktriangle — \blacktriangle NADPH + Nikotinamid 20 mM

\circ — \circ NADPH + generierendes System

\bullet — \bullet NADPH + generierendes System + Nikotinamid 20 mM.

b.

Kofaktor: NADP

\circ — \circ NADP + generierendes System

\bullet — \bullet NADP + generierendes System + Nikotinamid 20 mM.

hohe Konzentration der Reaktionsprodukte zu erreichen, wurden die Ansätze zwei Stunden mit NADPH als Kofaktor und dem generierenden System inkubiert, danach mit Benzol extrahiert, eingedampft und auf die mit Kieselgel beschichteten Platten aufgetragen. *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin und *p*-Nitroanilin wurden unter unseren Versuchsbedingungen deutlich getrennt. In keinem Inkubat konnte ein anderes Reaktionsprodukt nachgewiesen werden als *p*-Nitroanilin. Ebenso ergab die *O*-Demethylierung nur *p*-Nitrophenol (Abb. 4). Die langsamere Laufgeschwindigkeit der Metabolite im Vergleich zu den Substraten weist auf die größere Polarität der

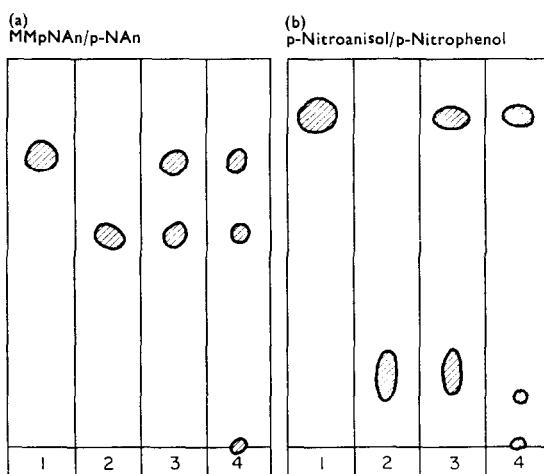


ABB. 4. Dünnschichchromatografische Auftrennung der Substrate und Reaktionsprodukte der *N*- und *O*-Demethylase mit Inkubaten menschlicher Lebermikrosomen.

a.

- 1 = *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin (MMpNAn)
- 2 = *p*-Nitroanilin (p-NAn)
- 3 = 1 und 2 im Gemisch
- 4 = Inkubat mit *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin als Substrat.

b.

- 1 = *p*-Nitroanisol
- 2 = *p*-Nitrophenol
- 3 = 1 und 2 im Gemisch
- 4 = Inkubat mit *p*-Nitroanisol als Substrat.

Reaktionsprodukte hin. Zur Identifizierung wurden die Flecke mit 0.1 N NaOH eluiert und die Spektren aller Substanzen mit den Standards verglichen und als identisch befunden. Somit entspricht in unseren Ansätzen die Menge verschwundenes Substrat der Menge entstandenes Reaktionsprodukt. Einen Anhalt für eine Reduktion der Nitrogruppe konnten wir unter unseren Versuchsbedingungen nicht finden.⁴⁷

Für beide Demethylasen bestimmten wir die Michaelis-Menten Konstanten. Für die *N*-Demethylase und das Substrat *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin ermittelten wir für Lebermikrosomen des Menschen eine Dissoziationskonstante von 11 μM und mit Rattenlebermikrosomen eine K_m von 13 μM . Die K_m für *p*-Nitroanisol lag für den Menschen bei 22 μM und für die Ratte bei 15 μM . Die für die Ratte gefundenen

Werte sind wesentlich kleiner als die von Netter angegebenen.⁴¹⁻⁴³ Die auch für den Menschen sehr kleinen Konstanten weisen auf eine große Affinität der beiden Substrate zum Enzym hin.

DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, daß in der Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber Enzyme vorhanden sind, die die gleichen Fähigkeiten zur Demethylierung besitzen wie die vielfach beschriebenen NADPH und O₂ abhängigen mischfunktionellen Oxydasen.^{7-8, 11} Da die enzymatische Aktivität post mortem rasch verloren geht,¹⁹ kann als Untersuchungsmaterial nur operative entnommene Leber verwendet werden. Unter unseren Versuchsbedingungen mußten die Leberhomogenate 2 bis 3 Stunden bei 0° aufbewahrt werden, bis mit der Fraktionierung begonnen werden konnte. Aus Untersuchungen mit Ratten- und Kaninchenleber ist bekannt, daß Leber oder Homogenate im tiefgefrorenen Zustand oder bei 0° über mehrere Stunden ihre Aktivität behalten.¹⁹ Es ist deshalb anzunehmen, daß unter unseren Arbeitsbedingungen kein Aktivitätsverlust eingetreten ist. Das von uns verwendete mit Tris gepufferte Suspensionsmedium schützt durch seinen EDTA-Anteil SH-Gruppen und hemmt die Lipidperoxydation und damit eine Destruktion des endoplasmatischen Retikulums.⁴⁸ Für die stabilisierende Wirkung dieses Suspensionsmediums spricht auch die funktionelle Integrität der Mikrosomenfraktion, die trotz Aufbewahrung über 6 Wochen bei -15° nur einen geringen Aktivitätsverlust von 10 bis 20% für die *N*-Demethylase und NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase zeigte. Die Aktivität der *N*-Demethylase wurde außerdem durch mehrmaliges Aufstauen und Einfrieren nicht verändert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Leadbater und Mitarbeiter.⁴⁹ Der Metabolismus einiger Arzneimittel ist genetisch determiniert.^{50, 51} Die für unsere Versuche ausgesuchten Probanden müssen als genetisch nicht einheitlich angesehen werden, sodaß ebenso wie bei Tierspezies eine Streuung der Maximalgeschwindigkeiten und wahrscheinlich auch der Michaelis-Menten Konstanten zu erwarten ist. Als Folge physiologischer oder ernährungsbedingter Veränderungen ist andererseits die Syntheserate der Enzyme und zellulärer Strukturen großen Schwankungen unterworfen. Dabei zeichnen sich die Proteine des endoplasmatischen Retikulums durch einen besonders großen turnover aus.^{52, 53} So konnte an hungernden Ratten *in vitro* ein herabgesetzter Arzneimittelmetabolismus nachgewiesen werden, der durch einen alimentär bedingten Mangel an Enzymproteinen erklärt wird.⁵⁴⁻⁵⁶ Auch die Operationsvorbereitung der Probanden führt wahrscheinlich zu einer Veränderung des Enzymspiegels. Um auch für die Ratte ähnliche Bedingungen zu schaffen, wurden die Tiere 12 Stunden vor Entnahme der Leber nüchtern gehalten. Auf eine Verabreichung von Inhalationsnarkotika wurde verzichtet, weil Halothan wahrscheinlich keinen Einfluß auf die mikrosomale Funktion der Leberzelle hat.³⁴

Über den Einfluß von Lebererkrankungen auf die Funktion der mischfunktionellen Oxydasen oder am Elektronentransport beteiligter Enzyme ist beim Menschen nichts bekannt. Die Befunde über eine veränderte Arzneimittelelimination bei Lebererkrankungen sind wechselnd. Bei Patienten mit einer Laennecschen Zirrhose konnte Brodie für einige Arzneimittel, die in der Leber hydroxyliert und demethyliert werden, keine Verlängerung der Halbwertszeit finden.⁵⁷ Andere Autoren wiesen bei Patienten mit Leberparenchymenschäden eine unveränderte Pentobarbitalelimination nach.⁵⁸ Bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis, aber auch mit Zirrhosen kann

sich die Halbwertszeit für Aminophenazon um das 4- bis 6-fache des Normalwertes verlängern.⁵⁹ Auch für Meprobamat besteht eine Korrelation zwischen Schwere der Lebererkrankung und der Halbwertszeit.⁶⁰ Im allgemeinen geht die Funktion des endoplasmatischen Retikulums dem Zelluntergang parallel, wobei die Schädigung sowohl die in den *smooth* Membranen lokalisierten Oxydasen als auch die Träger der Eiweißsynthese in den *rough* Membranen betrifft.⁶¹ Es ist anzunehmen, daß bei unserem Patientenmaterial mit funktionell normal erscheinenden Lebern keine Funktionsbeeinträchtigung der Enzyme des endoplasmatischen Retikulums zu erwarten ist.

Über die Fraktionierungsbedingungen der menschlichen Leber ist bis jetzt nur wenig gearbeitet worden. Björnstorps⁶³ fand unter Anwendung der Fraktionierungs-technik nach Schneider⁶² eine mit der Rattenleber vergleichbare Verteilung subzellulärer Partikel. Wir konnten diese Befunde bestätigen, wiesen aber in den Mikrosomen des Menschen im Gegensatz zur Ratte eine auffallend hohe lysosomale Aktivität nach. Durch die ebenfalls hohe mitochondriale Verunreinigung ist die Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber mit einem größeren Anteil an Fremdeiweiß belastet als die der Rattenleber. Bei unseren Versuchen muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Kerne, Mitochondrien und Lysosomen in einem Zentrifugationsschritt abgetrennt wurden. Unter diesen Bedingungen gelingt die Trennung der Mitochondrien und Lysosomen von den Mikrosomen in der menschlichen Leber wesentlich schlechter als in der Rattenleber. Die Gewinnung einer an Fremdeiweiß nur gering verunreinigten Mikrosomenfraktion müßte unter Anwendung einer anderen Fraktionierungstechnik Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Der signifikant geringere Gehalt an Protein, Glucose-6-Phosphatase und β -Glycerophosphatase pro g Feuchtgewicht im Homogenat der menschlichen Leber läßt sich dadurch erklären, daß die Leber des Menschen einen größeren Anteil mesenchymalen Gewebes und damit pro g Feuchtgewicht weniger Parenchym besitzt als die Rattenleber.⁶⁴

Die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase ist ein Bestandteil der Elektronenflußkette in den Mikrosomen.^{22, 24, 28-32} Dieses ein Flavinadenindinukleotid als prosthetische Gruppe enthaltende Enzym läßt sich durch Phenobarbital im gleichen Maße induzieren wie Cytochrom P 450 und die Aminophenazon-*N*-Demethylase.²⁶ Zusammen mit anderen Bestandteilen des mikrosomalen Elektronentransports soll sich diese Reduktase in der äußeren Schicht des Lipoproteinkomplexes des endoplasmatischen Retikulums befinden.²⁹ Lebermikrosomen enthalten drei enzymatisch verschiedene Typen von Vesikeln. In der sog. "leichten" Fraktion, die erst bei einer höheren *g*-Zahl als der von uns verwendeten sedimentiert, finden sich die "Elektronentransport-vesikel".⁶⁵ Zu diesen Enzymen gehört auch die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase. Als Folge einer unzureichenden Sedimentation wäre die relativ große Aktivität der Reduktase in der löslichen Fraktion ($78,000 \times g$) in unseren Versuchen zu erklären. Da die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase den Initialschritt für den mikrosomalen Elektronentransport darstellt, erschien uns die Aktivitätsbestimmung von besonderer Bedeutung. Die spezifischen Aktivitäten sind in den Lebermikrosomen des Menschen signifikant niedriger als in der entsprechenden Rattenleberfraktion, obgleich sich die spezifischen Aktivitäten der Demethylasen umgekehrt verhalten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob für den mikrosomalen Elektronentransport in der menschlichen Leber Besonderheiten bestehen. Die NADPH abhängige Oxydation der Substrate spricht allerdings für einen mit der Ratte vergleichbaren Mechanismus. Die

geringe Kofaktoraktivität des NADH kommt nicht durch die NADH-NADPH-Transhydrogenase zustande.⁴⁶ Möglicherweise reduziert NADH über eine spezifische Reduktase ebenfalls Cytochrom P 450.^{28, 8} Ansätze mit endogen über ein generierendes System entstandenes NADPH zeigt eine größere Reaktionsgeschwindigkeit als zugesetztes NADPH in einer Sättigungskonzentration. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Gram an mikrosomalen Subfraktionen der Leber gemacht.⁶⁶ Möglicherweise liegt das endogen gebildete NADPH in einer für den Elektronentransport besonders geeigneten Form vor. Andererseits muß diskutiert werden, daß durch NADPH verbrauchende Prozesse während der Inkubation die Reaktion infolge Kofaktormangels nicht den Bedingungen einer Reaktion 0.Ordnung folgt. So beschrieben Jacobson⁶⁷ und Gillette¹¹ Pyrophosphatasen mit großer Speziesvariabilität, die NADPH und NADP in der Mikrosomenfraktion zu dem entsprechenden Nikotinamidribotid spalten. Für einen nicht durch die Substratoxydation bedingten Verbrauch an Pyridinnukleotiden spricht auch die Beobachtung, daß NAD und NADH-Zusätze den Metabolismus in den Inkubaten stimulieren, die katalytischen Mengen NADP enthalten.⁶⁸ Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem "Schutzeffekt" um eine Konkurrenz um das aktive Zentrum der Pyrophosphatase. Durch Verwendung eines Pyrophosphatpuffers läßt sich die Demethylierung des Aminophenazon gegenüber Phosphat- und Trispuffer wesentlich steigern.⁶⁹ Ein NADPH-Mangel wird sich besonders in den Ansätzen bemerkbar machen, die keine Möglichkeiten der Regeneration des entstandenen NADP besitzen und die langen Inkubationszeiten ausgesetzt sind. Eine optimale NADPH-Konzentration wird dagegen in den Reaktionsmischungen gewährleistet sein, in denen bereits NADPH vorgegeben und seine Rückbildung durch ein entsprechendes System gesichert ist.

Nikotinamid ist auch für die Mikrosomen der menschlichen Leber ein Hemmer der durch die "arzneimittelabbauenden Enzyme" vermittelten Reaktionen, wie bereits von Schenkman für die Ratte mit Anilin und Aminophenazon beschrieben.⁷⁰ Die Ursache dieser Hemmung liegt wahrscheinlich in einer Wechselwirkung des Nikotinamid mit dem Cytochrom P 450 begründet.^{71, 72} Der hemmende Effekt auf die Demethylierung ist besonders deutlich, wenn nur NADPH ohne das generierende System eingesetzt wird. In diesem Fall wird das NADP als kompetitiver Hemmer die Reaktionsgeschwindigkeit zusätzlich herabsetzen.²⁶ Aus unseren Versuchen geht hervor, daß die ermittelten Aktivitäten nur dann eine Aussagekraft besitzen und einen Vergleich mit anderen Spezies ermöglichen, wenn optimale Reaktionsbedingungen geschaffen werden. Reaktionsansätze mit Nikotinamid werden in Abhängigkeit von der eingesetzten Mikrosomenmenge und der Inhibitorkonzentration zu geringe Aktivitäten ergeben.

Die beim Menschen im allgemeinen längeren Halbwertszeiten lassen sich nicht allein durch die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit erklären, weil unter den Bedingungen einer Reaktion 0.Ordnung keine Aussagen über den Umsatz von Pharmaka im lebenden Organismus gemacht werden können. Einen höheren Informationswert haben die Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes.⁷³ Die von uns ermittelten Michaelis-Menten Konstanten lassen nur die Aussage zu, daß die beiden Modellsubstrate eine gleich große Affinität zu den spezifischen Haftstellen der Demethylasen bei Mensch und Ratte haben. Die für die Ratte gefundenen Werte sind wesentlich kleiner als die von Netter angegebenen.^{41, 43} Die Unterschiede lassen sich vielleicht dadurch erklären, daß Nikotinamid in der Versuchsanordnung von

Netter das Ergebnis verfälscht und eine zu große Konstante für ein Substrat ergibt.⁷⁰ Die für die beiden Modellsubstrate annähernd gleich großen Michaelis-Menten Konstanten für Mensch und Ratte gestatten keine Verallgemeinerung. Aus orientierenden Versuchen können wir entnehmen, daß die Michaelis-Menten Konstante für Aminophenazon beim Menschen um eine Zehnerpotenz höher liegt als bei der Ratte.⁵⁹

Wenn man für die Ratte einen Anteil von 4% Lebergewicht am Körpergewicht annimmt, dann stehen ungefähr 1200 mg Mikrosomenprotein/kg Körpergewicht für den Metabolismus von körperfremden Substanzen zur Verfügung. Der Mensch besitzt aber bei einem Anteil von nur 2% Lebergewicht 500 bis 600 mg Protein/kg Körpergewicht, wenn man der Berechnung ein durchschnittliches Lebergewicht von 1,5 bis 2 kg zugrunde legt. Damit wäre die Gesamtkapazität an "arzneimittelabbauender Aktivität"/kg Körpergewicht beim Menschen geringer als bei der Ratte unter der Annahme, daß das Mikrosomenprotein ein Parameter für diese enzymatische Leistung ist. Die für einige Substrate wahrscheinlich größeren Michaelis-Menten Konstanten und das ungünstigere Verhältnis des mikrosomalen Enzymproteins am Körpergewicht können eine Erklärung für die im allgemeinen längeren Halbwertszeiten vieler Arzneimittel beim Menschen im Vergleich zur Ratte sein. Bessere Aussagemöglichkeiten gestattet vielleicht die Bestimmung des Cytochrom P 450 als des eigentlichen sauerstoffübertragenden Enzyms. Da diese terminale Oxydase das letzte Glied in der Elektronenflußkette ist, wird die "arzneimittelabbauende Aktivität" wahrscheinlich noch durch andere NADPH verbrauchende und liefernde Prozesse bestimmt.⁷⁴

Danksagungen—An dieser Stelle möchten wir Herrn Dr. Seifert und Herrn Dr. Haumann aus der Chirurgischen Klinik bzw. der Abteilung für Anästhesie der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus" in Dresden unseren Dank für ihr Verständnis bei unseren Fragestellungen und für die Mitarbeit bei der Auswahl und Vorbereitung der Patienten aussprechen.

Herrn Dipl. Chemiker Dr. Richter danken wir außerdem für die Synthese von *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin und *p*-Nitroanisol sowie seine wertvollen Ratschläge bei einigen chemischen Problemen.

Unser Dank gilt auch Fräulein Hanna Haun und Frau Leonore Morgenstern für ihre präzise technische Mitarbeit.

Zusammenfassung—In biotisch gewonnener menschlicher Leber wird die Aktivität der "arzneimittelabbauenden Enzyme" mit den Substraten *N*-Monomethyl-*p*-Nitroanilin und *p*-Nitroanisol direkt spektrophotometrisch bestimmt. Außerdem wird die Aktivität der NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase in der Mikrosomenfraktion ermittelt. Unter Anwendung einer für die Rattenleber geeigneten Fraktionierungstechnik werden in den subzellulären Fraktionen die Glucose-6-Phosphatase, die β -Glycerophosphatase und der Eiweißgehalt bestimmt und mit der Rattenleber verglichen. Die menschliche Leber hat im Homogenat einen signifikant niedrigeren Protein-, Glucose-6-Phosphatase-und β -Glycerophosphatasegehalt als die Rattenleber. Die Mikrosomenfraktion der menschlichen Leberweist eine höhere lysosomale Verunreinigung auf. Die auf Eiweiß bezogenen Maximalgeschwindigkeiten der *N*- und *O*-Demethylase sind in der menschlichen Leber signifikant größer als in der Rattenleber, während sich die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase umgekehrt verhält. Die *N*- und *O*-Demethylase sind NADPH abhängig. NADH hat nur eine minimale Kofaktorwirkung. *p*-Nitroanilin und *p*-Nitrophenol sind die einzigen Reaktionsprodukte der *N*- bzw. *O*-Demethylierung. Die Michaelis-Menten Konstante beträgt für die *N*-Demethylase 11 μM und für die *O*-Demethylase 22 μM . Sie unterscheiden sich nur unwesentlich von den Michaelis-Menten Konstanten in Rattenlebermikrosomen. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sind für die *N*-Demethylase am größten, wenn durch ein NADPH generierendes System die NADPH-Konzentration im Reaktionsgemisch gleichbleibend hoch gehalten und auf Nikotinamid verzichtet wird, das die Demethylierung hemmt.

LITERATUR

1. B. B. BRODIE, *J. Pharm. Pharmac.* **8**, 1 (1956).
2. B. B. BRODIE, J. AXELROD, J. R. COOPER, L. E. GAUDETTE, B. N. LA DU, C. MITOMA and S. UDENFRIEND, *Science* **121**, 603 (1955).
3. J. R. COOPER and B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **114**, 409 (1955).
4. J. R. COOPER and B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **120**, 75 (1955).
5. B. B. BRODIE, J. R. GILLETTE and B. N. LA DU, *Ann. Rev. Biochem.* **27**, 427 (1958).
6. A. H. CONNEY, K. SCHNEIDMAN, M. JACOBSON and R. KUNTZMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**, 98 (1965).
7. H. S. MASON, *Advances in Enzymology* **19**, 79 (1957).
8. JAMES R. GILLETTE, *Advances in Pharmacology* **4**, 219 (1966).
9. T. OMURA and R. SATO, *J. biol. Chem.* **237**, 1375 (1962).
10. A. H. CONNEY, *Pharmac. Rev.* **19**, 317 (1967).
11. JAMES R. GILLETTE, In *Progress in Drug Research* (Ed. E. JUCKER) Vol. 6, S.11, Birkhäuser Verlag, Basel (1963).
12. H. V. GELBOIN, *Advances in Cancer Research* **10**, 1 (1967).
13. J. R. FOUTS, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**, 875 (1963).
14. P. QUINN, J. AXELROD and B. B. BRODIE, *Biochem. Pharmac.* **1**, 152 (1958).
15. J. J. BURNS, In *Metabolic Factors Controlling Duration of Drug Action* (Ed. B. B. BRODIE and E. G. ERDÖS) p. 277. Pergamon Press, Oxford.
16. B. B. BRODIE and C. A. M. HOGBEN, *J. Pharm. Pharmac.* **9**, 345 (1957).
17. B. B. BRODIE, in *Proc. 3rd Int. Pharmacol. Meet. Sao Paolo*, 1966, Vol. 4, *Mechanism of Drug Toxicity*, S.23 (Ed. H. RASKOVA). Pergamon Press Oxford.
18. B. B. BRODIE and J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **99**, 171 (1950).
19. P. J. CREAVEN and R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **87**, 19 P (1963).
20. R. KUNTZMAN, C. C. MARK, C. BRAND, M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN and A. H. CONNEY, *Pharmacologist* **6**, 187 (1964).
21. R. KUNTZMAN, C. C. MARK, C. BRAND, M. JACOBSON, W. LEWIN and A. H. CONNEY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **152**, 151 (1966).
22. ALVAH PHILLIPS and ROBERT G. LANGDON, *J. biol. Chem.* **237**, 2652 (1962).
23. CALVIN A. LANG and ALVIN NASON, *J. biol. Chem.* **234**, 1874 (1959).
24. LARS ERNSTER, PHILIP SIEKEVITZ and GEORGE PALADE, *J. Cell. Biol.* **15**, 341 (1962).
25. STEN ORRENIUS, G. DALLNER and L. ERNSTER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 329 (1964).
26. LARS ERNSTER and STEN ORRENIUS, *Fedn Proc.* **24**, 1190 (1965).
27. DAVID Y. COOPER, O. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL and RONALD W. ESTABROOK, in *Oxidases and related redox systems*, Vol. 2, S.838 (Ed. TSOO E. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
28. RYO SATO, TSUNEZO OMURA and HIROKO NISHIBAYASHI, in *Oxidases and related redox systems*, Vol. 2, S.861 (Ed. TSOO E. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
29. H. S. MASON, T. YAMANO, J.-C. NORTH, Y. HASHIMOTO and P. SAKAGISHI, in *Oxidases and related redox systems*, Vol. 2, S.879 (Ed. TSOO E. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
30. HIROKO NISHIBAYASHI, T. OMURA and R. SATO, *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 520 (1963).
31. CHARLES H. WILLIAMS, JR. and HENRY KAMIN, *J. biol. Chem.* **237**, 587 (1962).
32. PHILIPP STRITTMATTER, in *Biological Oxidations* (Ed. THOMAS P. SINGER) S.171. Interscience Publishers (1968).
33. A. RUBIN, J. R. TEPHY and G. J. MANNERING, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1007 (1964).
34. I. HEINRICH and W. KLINGER, *Biochem. Pharmac.* **17**, 211 (1968).
35. K. LEYBOLD and H. J. STAUDINGER, *Biochem. Z.* **331**, 389 (1959).
36. M. A. SWANSON, *Methods in Enzymology* (Ed. S. O. COLOWICK and N. O. KAPLAN) Vol. 2, S.541, Academic Press, New York (1955).
37. H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin (1964).
38. EUGENE S. BAGINSKI, PIERE P. FOÁ and BAMIE ZAK, *Anal. Biochem.* **21**, 201 (1967).
39. F. APPELMANS, R. WATTIAUX and C. DE DUVE, *Biochem. J.* **59**, 439 (1955).
40. C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

41. K. J. NETTER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Path. exp. Pharmak.* **255**, 151 (1966).
42. K. J. NETTER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Path. exp. Pharmak.* **238**, 292 (1960).
43. K. J. NETTER and G. SEIDEL, *J. Pharmac exp. Ther.* **146**, 61 (1964).
44. O. H. LOWRY, N. J. ROSEN BROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
45. E. C. SLATER and W. D. BONNER, *Biochem. J.* **52**, 185 (1952).
46. K. KRISCH and H. J. STAUDINGER, *Biochem. Z.* **334**, 312 (1964).
47. J. I. KAMM and J. R. GILLETTE, *Fedn Proc.* **22**, 366 (1963).
48. P. HOCHSTEIN and L. ERNSTEIN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 388, (1963).
49. L. LEADBEATER and D. W. DAVIES, *Biochem. Pharmac.* **13**, 1607 (1964).
50. ELLIOT S. VESELL and J. G. PAGE, *Science* **160**, 72 (1968).
51. ELLIOT S. VESELL and J. G. PAGE, *Science* **159**, 1479 (1968).
52. R. A. FREEDLAND, S. MURAD and A. J. HUROVITZ, *Fedn Proc.* **27**, 1217 (1968).
53. ROBERT T. SCHIMKE, ROGER GANSCHOW, D. DOYLE and I. M. ARIAS, *Fedn Proc.* **27**, 1223 (1968).
54. R. L. DIXON, R. W. SCHULTICE and J. R. FOUTS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **103**, 333 (1960).
55. A. H. CONNEY and L. GARREN, *Biochem. Pharmac.* **6**, 257 (1961).
56. R. KATO and J. R. GILLETTE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **150**, 279 (1965).
57. B. B. BRODIE, J. J. BURNS and M. WEINER, *Med. exp.* **1**, 290 (1959).
58. J. T. SESSIONS, H. P. MINKEL, J. C. BULLARD and J. F. INGELFINGER, *J. Clin. Invest.* **33**, 1116 (1954).
59. E. ACKERMANN, unveröffentlichte Ergebnisse.
60. H. HELD und H. F. v. OLDERSHAUSEN, *Klin. Wschr.* **47**, 78 (1969).
61. J. CLIFFORD and K. R. REES, *J. Path. Bact.* **91**, 215 (1966).
62. W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
63. P. BJÖRNSTORP, S. BJÖRKENOL and T. SCHERSTEN, *Biochim. Biophys. Acta* **111**, 375 (1965).
64. E. BOOTH, E. BOYLAND and C. COOLING, *Biochem. Pharmac.* **16**, 721 (1967).
65. Y. IMAI, A. ITO and R. SATO, *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 424 (1966).
66. TH. E. GRAM and J. R. FOUTS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **158**, 317 (1967).
67. K. B. JACOBSON and N. O. KAPLAN, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 31 (1957).
68. JOSEPHINE TAGG and CH. MITOMA, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2471 (1968).
69. J. R. GILLETTE, W. GRIEB and H. SASAME, *Fedn Proc.* **22**, 366 (1963).
70. JOHN B. SCHENKMAN, JEFFREY A. BALL and RONALD ESTABROOK, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1071 (1967).
71. W. CAMMER, J. B. SCHENKMAN and H. W. ESTABROOK, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **23**, 264 (1966).
72. J. B. SCHENKMAN, H. REMMER and R. W. ESTABROOK, *Molec. Pharmac.* **3**, 113 (1967).
73. J. R. GILLETTE, *Fedn Proc.* **26**, 366 (1967).
74. PHILIPP SIEKEVITZ, *Fedn Proc.* **24**, 1153 (1965).