

BBA 12225

CHARAKTERISIERUNG UND KINETIK DER
EQUILIN-DEHYDROGENASE

CH. MITTERMAYER UND H. BREUER

Chemische Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik, Bonn (Deutschland)

(Eingegangen am 8. Januar 1963)

SUMMARY

Characterization and kinetic of the equilin dehydrogenase

The microsomal fraction of rat liver contains a steroid ring dehydrogenase which dehydrogenates equilin to equilenin. The equilenin formed was isolated by microsublimation and identified by melting point, ultraviolet absorption and the sulfuric acid-water reaction.

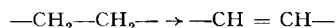
The dehydrogenation of equilin showed two maxima at pH 5.0 and 8.4; at pH 5.0 the value K_m for equilin was found to be $5.5 \cdot 10^{-5}$ M. Both NAD and NADP can serve as coenzymes, whereas phenazinmethosulfate is ineffective as hydrogen acceptor. Enzymic dehydrogenation of equilin occurs under aerobic as well as under anaerobic conditions. The enzyme is inactivated by *p*-chloromercuribenzoate, iodoacetamide, *o*-iodosobenzoate, Zn^{2+} (10^{-3} M) and EDTA (10^{-3} M), but is unaffected by cyanide. Iodoacetate and Zn^{2+} (10^{-5} M) have an activating effect.

The observation that the formation of equilin occurs anaerobically argues against the involvement of hydroxylation reactions and makes it likely that the enzyme promotes a direct dehydrogenation of equilin.

EINLEITUNG

Über das Vorkommen von Steroidring-Dehydrogenasen (Dihydrosteroid:Acceptor-Oxydoreduktasen) ist bisher nur bei Mikroorganismen berichtet worden (vgl. Ref. 1 für Übersicht). So besitzen zahlreiche Pilze und Bakterien Δ^1 -Dehydrogenasen, die Substrate aus der 5α - und 5β -Androstanreihe, aus der 5α - und 5β -Pregnanreihe und aus der Androsten- und Pregnenreihe angreifen. Darüber hinaus sind mehrere Mikroorganismen bekannt, die über Δ^4 - 5α - und/oder Δ^4 - 5β -Dehydrogenasen verfügen. LEVY UND TALALAY² haben aus Rohextrakten von *Pseudomonas testosteroni* eine Δ^1 - sowie eine Δ^4 - 5α -Dehydrogenase angereichert und beide Enzyme von einer Δ^4 - 5β -Dehydrogenase getrennt.

Die Einführung von Doppelbindungen in Ring A des Steroidmoleküls verläuft, soweit bisher bekannt, irreversibel nach folgendem Schema:



Versuche mit den angereicherten Steroidring-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas testosteroni*² sprechen dafür, dass die Enzyme eine direkte Dehydrierung der Steroide, wahrscheinlich unter Beteiligung einer flavinartigen prosthetischen Gruppe, bewirken; dabei dient Phenazinmethosulfat als wirksamer artifizieller Elektronenacceptor.

Kürzlich machten wir bei unseren Untersuchungen über die Biogenese von Steroiden die Beobachtung, dass Equilin (Oestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ol-17-on) durch Leberschnitte der Ratte zu Equilenin (Oestra-1,3,5(10)6,8(9)-pentaen-3-ol-17-on) umgewandelt wird³. Es liegt nahe anzunehmen, dass an dieser Reaktion eine Steroidring-Dehydrogenase beteiligt ist. Um einen Einblick in den Mechanismus dieser im Ring B stattfindenden Dehydrierung zu gewinnen, wurde im folgenden der Versuch unternommen, die Equilin-Dehydrogenase näher zu charakterisieren. Über einen Teil dieser Ergebnisse ist bereits in vorläufiger Form berichtet worden⁴.

METHODIK

Steroide

Equilin (Oestra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ol-17-on) und Equilenin (Oestra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaen-3-ol-17-on) wurden zweimal umkristallisiert und durch Bestimmung der Schmelzpunkte und papierchromatographisch auf Reinheit geprüft.

Versuchstiere

Männliche Wistar-Ratten im Gewicht von etwa 80–100 g wurden nach 24-stündigem Nahrungsentzug durch Dekapitation getötet und die Lebern nach dem Ausbluten der Tiere entnommen.

Zellfraktionierung

Jeweils 4 g Lebergewebe wurden in 32 ml einer eiskalten Sucrose-Lösung (0.25 M) unter Verwendung eines Glashomogenisators mit Teflon Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in 2 ml Sucrose-Lösung aufgenommen ("Kern"-Fraktion). Anschliessend wurde der $1000 \times g$ Überstand für 45 min bei $23\,000 \times g$ zentrifugiert und das Sediment nach einmaligem Waschen auf der Zentrifuge ebenfalls in 2 ml Sucrose-Lösung aufgenommen ("Mitochondrien"-Fraktion). Der $23\,000 \times g$ Überstand wurde nun 90 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand ("Cytoplasma"-Fraktion) vom Sediment abgetrennt. Das Sediment wurde mit Hilfe eines Homogenisators in etwa 20 ml Sucrose Lösung resuspendiert und erneut für 90 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Rückstand (Mikrosomen-Fraktion) wurde in 4 ml Sucrose-Lösung aufgenommen und der Überstand verworfen. 1 ml der Mikrosomen-Lösung enthielt die Mikrosomen aus 1 g Lebergewebe.

Inkubationsbedingungen

Die Versuchsansätze hatten folgende Zusammensetzung: 200 μg Equilin (gelöst in 0.05 ml Methanol), 2.0 ml Theorell-Stenhagen Puffer (pH 8.2), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose), 5 μmol NAD, 3 μmol NADP und 1.0 ml Mikrosomen-Lösung.

Aufarbeitung der Versuchsansätze

Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Lösungen 2 mal mit je 5 ml Aether-Chloroform (3:1) extrahiert und die Extrakte bei 55° im Vakuum eingedampft. Die Rückstände wurden der Papierchromatographie im System Propylenglykol-Cyclohexan (1:1) unterworfen. Die Wanderungsgeschwindigkeiten betrugen nach 30-stündiger Laufzeit für Equilin etwa 28 cm und für Equilenin etwa 20 cm. Die Lokalisierung der Steroide erfolgte durch Anfärben der Papierchromatogramme mit FOLIN-CIOCALTEU's Reagens^{5,6}.

Quantitative Bestimmung

Methode A: Die steroidhaltigen Extrakt Rückstände wurden auf 31.4×3.8 cm grosse Papierstreifen (Schleicher und Schüll 2043a Mgl) aufgetragen und 20–30 Stunden im System Propylenglykol-Cyclohexan (1:1) chromatographiert; um reproduzierbare Ergebnisse bei der quantitativen Bestimmung zu erhalten war es notwendig, die Extrakt Rückstände auf zwei nebeneinander liegende Punkte, deren Durchmesser 1 cm nicht überschritt, aufzutragen. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die Streifen für 12 Stunden bei 50–70° getrocknet, durch eine wässrige Lösung (Verdünnung 1:10) von FOLIN-CIOCALTEU's Reagens⁵ gezogen, zwischen Filtrierpapier abgepresst, für 1 min in ein 50 l-Gefäss, das 50 ml einer 24%igen NH_3 -Lösung enthielt, eingehängt und dann wiederum 1 Stunde bei 40° getrocknet. Die quantitative Auswertung der so angefärbten Papierstreifen erfolgte in einem Analytrol-Gerät (Spinco Modell RA) unter Verwendung des cam B 1. Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Eichkurve aufgenommen.

Methode B: Die steroidhaltigen Extrakt Rückstände wurden zunächst im System Propylenglykol-Cyclohexan (1:1) vorchromatographiert; anschliessend wurde die Equilin-Position eluiert und im System Benzol-Petrolaether-Methanol-Wasser (33:66:80:20) rechromatographiert. Die Chromatogramme wurden für 48 Stunden getrocknet und die Equilenin-Positionen 2 mal mit je 5 ml Methanol eluiert. Die organische Phase wurde eingedampft und mit dem Rückstand die Schwefelsäure-Wasser-Reaktion⁷ ausgeführt. Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte zwischen 320 und 700 $m\mu$ mit einem registrierenden Spektralphotometer Modell Beckman DB. Die Kurven zeigten Maxima bei 405 und 490 $m\mu$; für die quantitative Bestimmung wurden die Extinktionen bei 490 $m\mu$ herangezogen.

ERGEBNISSE

Lokalisierung der Equilin-Dehydrogenase

Zunächst wurde die Frage untersucht, an welche Zellfraktionen die Steroidring-Dehydrogenase gebunden ist. Zu diesem Zweck wurde Equilin mit der Kern-, der Mitochondrien-, der Mikrosomen- und der Cytoplasma-Fraktion der Leber inkubiert. Eine Umwandlung zu Equilenin konnte nur in der Mikrosomen-Fraktion beobachtet werden; daraus ergibt sich, dass die Equilin-Dehydrogenase ein ausschliesslich mikrosomales Enzym ist.

Isolierung des Reaktionsproduktes

Um festzustellen, ob das Reaktionsprodukt, das nach Inkubation von Equilin mit der Mikrosomen-Fraktion gebildet wird, tatsächlich mit Equilenin identisch ist, wurden folgende Versuche durchgeführt. Die Extraktrückstände mehrerer Inkubationen von Equilin mit der Mikrosomen-Fraktion wurden zunächst im System Propylenglykol/Cyclohexan-Benzol (1:1) und anschliessend im System Benzol-Petrolaether-Methanol-Wasser (33:66:80:20) chromatographiert. Nach Elution wurde die in der Equilenin-Position befindliche Substanz der Mikrosublimation⁸ unterworfen. Die erhaltenen Kristalle zeigten den gleichen Schmelzpunkt (258–259°) wie authentisches Equilenin. Die Absorptionskurven im Ultraviolett (λ_{\max} 230, 270, 280, 290 (Schulter), 323 (Schulter) und 340 m μ in Äthanol) und bei der Schwefelsäure-Wasser-Reaktion (λ_{\max} 320, 405 und 495 m μ) waren mit denjenigen von authentischem Equilenin identisch. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt von Equilin um Equilenin handelt.

Cofaktoren

Die Equilin-Dehydrogenase reagiert sowohl mit NAD als auch mit NADP als Wasserstoffacceptor, wobei unter vergleichbaren Versuchsbedingungen mit NADP die grösseren Umsätze beobachtet werden. Die Dehydrierung erfolgt sowohl unter Sauerstoff als auch unter Stickstoff. Wie aus den Werten der Tabelle I hervorgeht, findet in Abwesenheit von NAD oder NADP keine Dehydrierung von Equilin statt. In Gegenwart von Phenazinmethosulfat (0.12–0.24 mg pro Ansatz) wurde keine Umwandlung von Equilin zu Equilenin festgestellt.

TABELLE I

COFAKTOR-ERFORDERNIS DER MIKROSOMALEN EQUILIN-DEHYDROGENASE

200 μ g Equilin, 2.0 ml Theorell-Stenhagen-Puffer (pH 8.2), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose) und 1.0 ml Mikrosomen-Lösung wurden für 60 min bei 37° inkubiert.

Die quantitative Bestimmung von Equilenin erfolgte mit *Methode B* (siehe METHODIK).

Zugesetzter Cofaktor	Menge in μ mol	Gasphase	Gebildete Menge Equilenin (μ g)
Keiner	—	O ₂ ; Luft	0
NAD	5	Luft	12.8
NADP	5	Luft	15.8
NAD + NADP	5 + 5	O ₂	19.0
		Luft	20.0
		N ₂	18.5

Kinetische Untersuchungen

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Steroidring-Dehydrierung zeigte 2 Maxima bei pH 4.9–5.0 und bei pH 8.4. Der Verlauf der pH-Kurve ist in Fig. 1 dargestellt; im sauren Bereich war der Umsatz etwas geringer als im alkalischen.

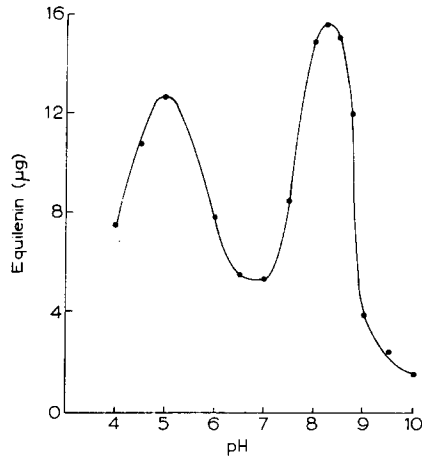


Fig. 1. Enzymatische Dehydrierung in Abhängigkeit vom pH-Wert. 200 µg Equilin, 2.0 ml Theorell-Stenhagen-Puffer (pH 4.0–10.0), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose), 5 µmol NAD, 3 µmol NADP und 1.0 ml Mikrosomen-Lösung wurden für 60 min bei 37° unter Luft inkubiert. Die quantitative Bestimmung von Equilenin erfolgte mit *Methode A* (siehe METHODIK).

Im gesamten untersuchten pH-Bereich wurde keine nicht-enzymatische Dehydrierung von Equilin beobachtet. Wie aus Fig. 2 hervorgeht, bestand im Bereich von 0.25–3.0 ml Mikrosomen Lösung Proportionalität zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Menge an gebildetem Equilenin. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Dehydrierung von Equilin zeigte von 0 bis 180 min einen stetigen Anstieg

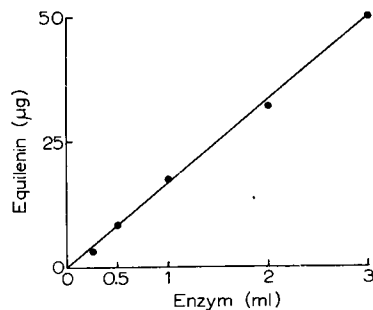


Fig. 2. Enzymatische Dehydrierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge. 200 µg Equilin, 2.0 ml Theorell-Stenhagen-Puffer (pH 8.2), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose), 5 µmol NAD und 3 µmol NADP wurden mit 0.25–3.0 ml Mikrosomen-Lösung für 60 min bei 37° unter Luft inkubiert. Die quantitative Bestimmung von Equilenin erfolgte mit *Methode A* (siehe METHODIK).

(Fig. 3). Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Dehydrierung von der Substratkonzentration ist in Form der Lineweaver-Burk-Transformation in Fig. 4 dargestellt. Beim pH-Wert von 5.0 beträgt $K_m = 5.5 \cdot 10^{-5}$ M für Equilin (Konzentration von NAD und NADP jeweils 5 µmol).

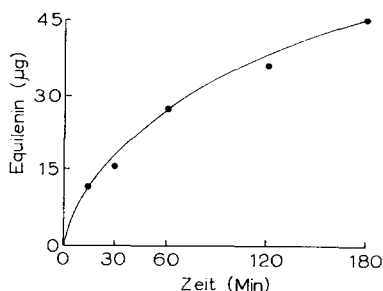


Fig. 3. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Dehydrierung von Equilin. 200 µg Equilin, 2.0 ml Theorell-Stenhagen-Puffer (pH 8.2), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose), 5 µmol NAD, 3 µmol NADP und 1.0 ml Mikrosomen-Lösung wurden bei 37° unter Luft inkubiert. Die quantitative Bestimmung von Equilenin erfolgte mit *Methode A* (siehe METHODIK).

Versuche zur Inaktivierung und Aktivierung

Die mikrosomale Equilin-Dehydrogenase wird durch 60 sec langes Erhitzen im siedenden Wasserbad vollständig inaktiviert. Das Enzym wird gehemmt: 100% durch 10^{-3} M *p*-Chlormercuribenzoat, 70% durch 10^{-3} M Zn^{2+} und 10^{-3} M EDTA, 30% durch 10^{-3} M Jodacetamid und 10^{-3} M *o*-Jodosobenzoat, 25% durch 10^{-5} M *p*-Chlormercuribenzoat. Die Enzymaktivität bleibt unbeeinflusst durch 10^{-5} M *o*-Jodosobenzoat, 10^{-5} M Jodacetamid und 10^{-5} M Zyanid. Das Enzym wird aktiviert: 45% durch 10^{-5} M Jodacetat, 60% durch 10^{-5} M Zn^{2+} und 90% durch 10^{-3} M Jodacetat.

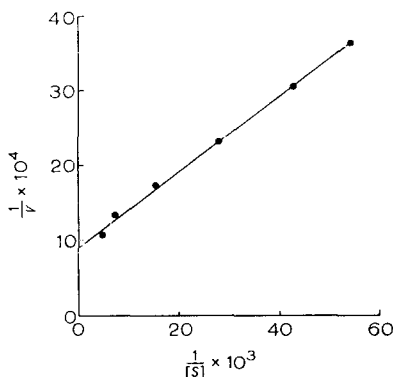


Fig. 4. Enzymatische Dehydrierung in Abhängigkeit von der Substratmenge. Verschiedene Mengen Equilenin (0.062–1.0 µmol), 2.0 ml Theorell-Stenhagen-Puffer (pH 8.2), 0.5 ml Krebs-Ringer-Lösung (enthaltend 20 mmol/l Glucose), 5 µmol NAD, 3 µmol NADP und 1.0 ml Mikrosomen-Lösung wurden bei 37° unter Luft inkubiert. Die quantitative Bestimmung von Equilenin erfolgte mit der *Methode B* (siehe METHODIK).

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist die Equilin-Dehydrogenase in der Mikrosomen-Fraktion der Leber lokalisiert und kann sowohl mit NAD als auch mit NADP reagieren. Im Gegensatz dazu ist Phenazinmethosulfat als Wasserstoffacceptor unwirksam. In diesem Punkte unterscheidet sich die hier beschriebene Steroidring-

Dehydrogenase von den mikrobiellen Steroidring-Dehydrogenasen: Die aus *Pseudomonas testosteroni* gewonnenen Enzyme² reagieren nur mit Phenazinmethosulfat, nicht aber mit den Dinucleotiden. Versuche, die Equilin-Dehydrogenase mit *n*-Butanol von der Mikrosomen-Fraktion abzulösen⁹, führten zu keinem Erfolg.

Die Michaelis-Menten-Konstante für Equilin beträgt $5.5 \cdot 10^{-5}$ M (pH 5.0). Dieser Wert unterscheidet sich kaum von den Werten, die für Androst-1-en-3,17-dion ($K_m = 4 \cdot 10^{-5}$ M) und für Androst-4-en-3,17-dion ($K_m = 2.5 \cdot 10^{-5}$ M) bei der mikrobiellen Dehydrierung zu den $\Delta^{1,4}$ -Verbindungen beobachtet worden sind². Demnach dürften die Affinitäten der mikrosomalen Equilin-Dehydrogenase und der mikrobiellen Steroidring-Dehydrogenasen zu ihren jeweiligen Substraten etwa gleich gross sein. Die enzymatische Dehydrierung von Equilin durch Lebermikrosomen verläuft offenbar irreversibel; auch in Gegenwart von NADH_2 und/oder NADPH_2 konnte keine Bildung von Equilin aus Equilenin nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Reaktionen, die durch die Steroidring-Dehydrogenasen katalysiert werden, ebenfalls irreversibel sind.

Die Equilin-Dehydrogenase wird durch Zusatz von *p*-Chlormercuribenzoat, Jodacetamid und *o*-Jodosobenzoat gehemmt. Dieses Ergebnis spricht für die Anwesenheit von essentiellen SH-Gruppen. Die Aktivierung des Enzyms durch geringe Konzentrationen (10^{-5} M) von Zink lässt vermuten, dass es sich bei diesem Kation um einen funktionellen Bestandteil des Enzymproteins handelt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestätigt, dass Chelatbildner, wie EDTA, die Enzymaktivität hemmen. Jodacetat hat einen aktivierenden Einfluss. Dieser unerwartete Befund schliesst jedoch nicht aus, dass es sich bei der Equilin-Dehydrogenase um ein SH-Enzym handelt, da Jodacetat kein allgemeines Thiolgift ist.

Über den genauen Mechanismus der mikrosomalen Steroidring-Dehydrierung können zunächst nur Vermutungen geäussert werden. Mit der Umwandlung von Equilin zu Equilenin ist ja nicht nur eine Dehydrierung, sondern auch eine Isomerisierung verknüpft. Als erste Möglichkeit käme deshalb eine Isomerisierung der im Ring B bereits vorhandenen Doppelbindung von C-7,8 nach C-6,7 oder C-8,9 in Frage, gefolgt von einer 1,2-Dehydrierung. Eine solche 1,2-Dehydrierung könnte durch eine direkte Abspaltung von Wasserstoff, entsprechend den Vorstellungen von HAYANO *et al.*¹⁰, erfolgen. Als zweite Möglichkeit wäre eine Reaktion zu diskutieren, die eine Umkehr der 1,4-Addition darstellen würde. Bei dieser Reaktionsfolge, die man als 1,4-Subtraktion bezeichnen könnte (Fig. 5), käme es zunächst zu einer, möglicherweise axialen, Abtrennung eines Hydridions und eines Protons; das dabei entstehende ungesättigte System würde sich dann unter Bildung eines aromatischen Ringes B stabilisieren. Ob eine der beiden hier angedeuteten Möglichkeiten bei der Ring-Dehydrierung tatsächlich eine Rolle spielt, kann mit Sicherheit noch nicht entschieden werden. Mit grosser Wahrscheinlichkeit lässt sich jedoch

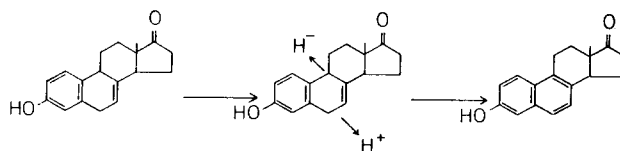


Fig. 5. 1,4-Subtraktion als möglicher Reaktionsmechanismus bei der Dehydrierung von Equilin zu Equilenin.

die Beteiligung von Hydroxylierungen an der Dehydrierung von Equilin ausschliessen. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Dehydrierung auch unter anaeroben Bedingungen erfolgt, während Hydroxylierungen molekularen Sauerstoff erfordern. Ebenso konnten keine papierchromatographischen Hinweise für die Bildung von intermediär auftretenden Hydroxylierungsprodukten von Equilin gefunden werden. Abschliessend sei bemerkt, dass die mikrosomale Steroidring-Dehydrogenase zwei pH-Optima zeigt. Möglicherweise sind die beiden Gipfel durch zwei verschiedene Reaktionsmechanismen (z.B. Isomerisierung und Dehydrierung) mit unterschiedlichen pH-Optima bedingt.

DANK

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Wir danken Herrn Professor Dr. W. DIRSCHERL, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Bonn, und Herrn Dr. H. WITZEL, Schering A.G., Berlin-West, für die Überlassung von Equilin und Equilenin. Herrn Dr. G. RASPÉ, Schering A.G., Berlin-West, danken wir für wertvolle Hinweise.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Mikrosomen-Fraktion der Rattenleber wurde eine Steroidring-Dehydrogenase nachgewiesen, die Equilin zu Equilenin dehydriert. Equilenin wurde nach Papierchromatographie durch Bestimmung des Schmelzpunktes sowie durch Aufnahme des Spektrums im Ultraviolett und bei der Schwefelsäure-Wasser-Reaktion identifiziert.

Das Enzym besitzt zwei Optima bei pH 5.0 und 8.4. Im sauren Bereich beträgt die Michaelis-Menten-Konstante für Equilin $5.5 \cdot 10^{-5}$ M. NAD und NADP können als Wasserstoffacceptoren dienen, wobei mit NADP die grösseren Umsätze beobachtet werden. Die enzymatische Dehydrierung von Equilin findet sowohl unter Sauerstoff als auch unter Stickstoff statt und verläuft irreversibel. Phenazinmethosulfat ist als Wasserstoffacceptor unwirksam.

Die Equilin-Dehydrogenase wird durch Zusatz von *p*-Chlormercuribenzoat (10^{-3} – 10^{-5} M), Zn^{2+} (10^{-3} M), EDTA (10^{-3} M), Jodacetamid (10^{-3} M) und *o*-Jodosobenzoat (10^{-3} M) gehemmt, während Zyanid (10^{-5} M) keinen Einfluss ausübt. Das Enzym wird durch Jodacetat (10^{-3} – 10^{-5} M) und Zn^{2+} (10^{-5} M) aktiviert.

Die Tatsache, dass die enzymatische Dehydrierung von Equilin auch unter anaeroben Bedingungen stattfindet, spricht für eine direkte Abspaltung des Wasserstoffs und gegen eine Beteiligung von Hydroxylierungsreaktionen.

LITERATUR

- ¹ H. BREUER, *Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Auflage, Band VI/1, Springer, Heidelberg, 1963, S. 423.
- ² H. R. LEVY und P. TALALAY, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2014.
- ³ C. MITTELMAYER, H. BREUER und W. DIRSCHERL, *Acta Endocrinol.*, 43 (1963) 195.
- ⁴ H. BREUER und CH. MITTERMAYER, *Biochem. J.*, 86 (1963) 12 P.
- ⁵ O. FOLIN und V. CIOCALTEU, *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 627.
- ⁶ F. L. MITCHELL und R. E. DAVIES, *Biochem. J.*, 56 (1954) 690.
- ⁷ W. DIRSCHERL und H. BREUER, *Z. Vitamin-, Hormon- Fermentforsch.*, 6 (1954) 287.
- ⁸ H. BREUER und E. KASSAU, *Acta Endocrinol. Suppl.*, 51 (1960) 1113.
- ⁹ R. K. MORTON, in S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, S. 25.
- ¹⁰ M. HAYANO, H. J. RINGOLD, V. STEVANOVIC, M. GUT und R. I. DORFMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 4 (1961) 454.