

BBA 66187

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER 3'-PHOSPHOADENYLYLSULFAT:STEROID-SULFOTRANSFERASE AUS DER LEBER DES MENSCHEN

ROLAND GUGLER, GOVIND S. RAO UND HEINZ BREUER

Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, Bonn (Germany)

(Eingegangen am 8 Juni 1970)

SUMMARY

Purification and characterization of a 3'-phosphoadenylylsulphate:steroid sulphotransferase from human liver

A 3'-phosphoadenylylsulphate:steroid sulphotransferase is localised in the $150\,000 \times g$ supernatant of normal human liver. The enzyme was purified 22-fold by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, by gel filtration of the precipitate through Sephadex G-200 and by chromatography on DEAE-cellulose. After incubation of the enzyme with dehydroepiandrosterone as substrate, the reaction product isolated was identified as dehydroepiandrosterone sulphate by paper chromatography, various microchemical reactions and crystallization with authentic carrier to constant specific activity. The sulphotransferase showed a pH optimum at 7.4 in Tris-HCl buffer. The Michaelis-Menten constants were found to be $6.7 \cdot 10^{-6}$ M for dehydroepiandrosterone and $4.0 \cdot 10^{-6}$ M for 3'-phosphoadenylylsulphate. The enzyme lost its activity within 6 days when stored at 4° ; however, at -20° , the enzyme was stable for at least 4 months. The steroid sulphotransferase showed a temperature optimum at 50° and an activation energy of 22.2 kcal/mole, within the range of $37-50^\circ$. By gel filtration, using Sephadex G-200, the molecular weight of the sulphotransferase was found to be approximately 50 000. The activity of the purified enzyme preparation was not influenced by the addition of cystein or EDTA. In relatively high concentration, SH-blocking agents had an inhibitory effect. The addition of Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} activated the enzyme, whereas Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} and Hg^{2+} inhibited the sulphotransferase.

The steroid sulphotransferase from human liver conjugates not only dehydroepiandrosterone (100%), but also (although to a lower extent) 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one (45%), oestriol (31%), oestradiol-17 β (15%) and oestrone (8%). Testosterone and cholesterol were not conjugated by the enzyme.

EINLEITUNG

Seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass Steroidhormone in Form wasser-

löslicher Konjugate im Urin ausgeschieden werden. Die ersten Östrogenkonjugate wurden von SCHACHTER UND MARRIAN^{1,2} aus dem Urin isoliert und als Östronglucuronid und Östronsulfat identifiziert. 1942 isolierten VENNING *et al.*³ Androsteronsulfat als erstes Androsteron-Konjugat aus dem Urin, während MUNSON *et al.*^{4,5} über die Isolierung und Identifizierung von Dehydroepiandrosteronsulfat berichteten. Das erste sulfatierte C₂₁-Steroid (3 β -Hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-on) wurde von KLYNE UND MARRIAN⁶ aus Urin trächtiger Stuten isoliert.

Die Bildung von Steroidsulfaten wird durch Sulfotransferasen katalysiert. Dabei wird der Sulfatrest von 3'-Phosphoadenylylsulfat auf eine phenolische Hydroxylgruppe (Phenol-Sulfotransferase; als Sonderfall: Östron-Sulfotransferase (EC 2.8.2.4)) oder auf eine alkoholische Hydroxylgruppe (Alkohol-Sulfotransferase; als Sonderfall: 3 β -Hydroxysteroid-Sulfotransferase (EC 2.8.2.2)) übertragen. Bei den Sulfotransferasen handelt es sich um lösliche Enzyme, die in der cytoplasmatischen Fraktion (100 000–150 000 \times g) lokalisiert sind. Bisher wurden in zahlreichen menschlichen und tierischen Organen Sulfotransferasen nachgewiesen (Übersicht vgl. Lit. 7).

Versuche zur Anreicherung und Charakterisierung von Steroid-Sulfotransferasen wurden erstmalig von NOSE UND LIPMANN⁸ beschrieben. Den Autoren gelang eine—wenn auch nur unvollständige—Trennung zweier Sulfotransferasen, von denen die eine Steroidalkohole, die andere Östron sowie *p*-Nitrophenol sulfatierte. BANERJEE UND ROY⁹ erreichten durch Fraktionierung eines Extraktes aus Meerschweinchenleber an Sephadex G-200 und DEAE-Sephadex-Säulen die partielle Trennung einer Androsthenolon-Sulfotransferase von einer Östron-Sulfotransferase. Besonders eingehend mit der enzymatischen Synthese von Steroidsulfaten befassten sich ADAMS und Mitarbeiter^{10–13}. Durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gelang ADAMS UND POULOS¹¹ die Isolierung einer Östrogen-Sulfotransferase aus Rindernebennieren; die gewonnene Enzympräparation war frei von anderen Sulfotransferase-Aktivitäten. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die adrenale Östrogen-Sulfotransferase in zwei Formen (A und B) vorkommt¹².

BOSTRÖM UND WENGEL¹⁴ berichteten 1964 über die Biosynthese einer Vielzahl von C₁₈-, C₁₉- und C₂₁-Steroidsulfaten in Gewebepräparationen der menschlichen Leber. Damit war zwar das Vorkommen von Steroid-Sulfatase in der Leber des Menschen bewiesen, doch liegen noch keine Angaben über eine Anreicherung oder Charakterisierung dieser Enzyme vor. Im folgenden wird über eine Steroid-Sulfotransferase aus dem 150 000 \times g-Überstand der menschlichen Leber berichtet. Das Enzym wurde 22fach angereichert und durch kinetische Untersuchungen charakterisiert; es sulfatiert in erster Linie Dehydroepiandrosteron, daneben aber auch in geringerem Umfang 3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on (Ätiocholanolon), Östriol, Östradiol-17 β und Östron, nicht jedoch Testosteron und Cholesterin.

METHODIK

Steroide

Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on), Östron (3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on) und Östron-3-sulfat wurden von der Firma Schering AG, Berlin, bezogen. Dehydroepiandrosteronsulfat war ein Handelspräparat der Firma Mann Research Laboratories, New York, U.S.A.

Radioaktive Verbindungen

[4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteron, [4-¹⁴C]Östron, [4-¹⁴C]Östradiol-17 β ([4-¹⁴C]-1,3,5(10)Östratrien-3,17 β -diol), [4-¹⁴C]Testosteron ([4-¹⁴C]17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on), [4-¹⁴C]Cholesterin ([4-¹⁴C]5-Cholesten-3 β -ol), [4-¹⁴C]17 α -Hydroxyprogesteron ([4-¹⁴C]17 α -Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion), [1,2-³H]Ätiocholanolon ([1,2-³H]3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on), [1,2-³H]Cortisol ([1,2-³H]11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion), [1,2-³H₂]Aldosteron [1,2-³H]18,11-Halbacetal von 11 β ,21-Dihydroxy-3,20-dioxo-4-pregnen-18-ol und Na₂³⁵SO₄ wurden von der Firma Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen. [4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteron wurde papierchromatographisch in zwei verschiedenen Systemen auf Reinheit geprüft.

Cofaktor

3'-Phosphoadenylsulfat wurde als Natriumsalz von Herrn Dr. H. U. Bergmeyer, Boehringer GmbH, Mannheim, Biochemische Abteilung Tutzing, zur Verfügung gestellt.

Reagenzien und Lösungen

Alle verwendeten Reagenzien waren von p.a.-Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt); organische Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert. Als Standardsubstanzen dienten folgende Enzyme und Eiweisse: Cytochrom c aus Pferdeherz, Ribonuclease aus Rinderpankreas (EC 2.7.7.17) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (EC 2.6.1.1) aus Schweineherz (Biochemica, Boehringer GmbH, Mannheim), Rinderserumalbumin und menschliches γ -Globulin (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg), Hämoglobin aus Ochsenblut (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz). *p*-Chlormercuribenzenzoesäure wurde von der Firma C. Roth, Karlsruhe, und Jodacetamid von der Firma Dr. Th. Schuchard, München, bezogen.

Gewebe

Zur Darstellung der Enzympräparationen diente normales menschliches Lebergewebe, welches bei Unfalltoten unmittelbar *post mortem* entnommen wurde. Die Zeit zwischen Organentnahme und Beginn der Gewebeaufarbeitung betrug im Mittel 15 Min. Nach Zerkleinerung mit der Schere wurde das Lebergewebe in 0.25 M Rohrzucker in einem Starmix 1 Min lang homogenisiert (30%iges Homogenat, Gew./Vol.).

Zellfraktionierung

Das Homogenat wurde 45 Min bei 12 000 $\times g$ in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde anschliessend zweimal 60 min bei 150 000 $\times g$ in einer Spinco-Ultrazentrifuge L-2 zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand (Cytosol-Fraktion) wurde in Portionen zu 30 ml bei -20° aufbewahrt.

Fällung mit (NH₄)₂SO₄

30 ml der Cytosol-Fraktion (150 000 $\times g$ -Überstand) der menschlichen Leber wurden der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat unterworfen. Unter ständigem Rühren wurde bis zu einer 30%igen Sättigung feingepulvertes (NH₄)₂SO₄ zugegeben. Die Lösung wurde 60 Min stehengelassen und anschliessend 20 Min bei 10 000 $\times g$ in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter bis

zur 60%igen Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und das nach erneuter Zentrifugation gewonnene Sediment in 2 ml eines 0.02 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) aufgenommen.

Gelfiltration mit Sephadex

Sephadex G-200 wurde von der Deutschen Pharmacia GmbH, Frankfurt, bezogen. Zur Quellung wurde das Gel 48 Std in destilliertem Wasser aufbewahrt und anschliessend mit 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) gewaschen. Das im gleichen Puffer suspendierte und unter Vakuum sorgfältig entlüftete Gel wurde luftblasenfrei auf eine Säule (1.4 cm \times 85 cm) über ein Bett von Glaswolle aufgegeben. Die über Nacht mit Puffer äquilibrierte Säule wurde 2 cm hoch mit gequollenem Sephadex G-25 (coarse) überschichtet. Die in 2 ml Puffer gelöste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bzw. die in 2 ml Wasser gelösten Standardproteine wurden durch Unterschichtung der über dem Gelbett befindlichen Pufferlösung auf die Säule aufgegeben.

Die Elution erfolgte mit 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) bei einer Durchflusgeschwindigkeit von 12 ml/Std. Die Eluate wurden in Fraktionen von je 6 ml in einem Fraktionssammler aufgefangen; der Eiweissgehalt wurde mit Hilfe einer Durchflussküvette (LKB-Uvicord II) bei 278 nm ermittelt.

Adsorption an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose SN (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde 30 min in 0.2 M HCl gerührt und anschliessend mit destilliertem Wasser bis zu einem pH-Wert von über 5 gewaschen. Die Cellulose wurde nunmehr 30 min in 0.2 M NaOH gerührt, mit destilliertem Wasser bis zum Neutralpunkt und mit 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) solange gewaschen, bis die aufgefangene Waschlösung den pH-Wert des Puffers erreicht hatte. Die entlüftete Cellulose-Suspension wurde auf eine Säule (0.8 cm \times 12 cm) gegeben und 12 Std bei 3° mit 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) äquilibriert.

30 ml Eluat wurden auf die Säule gegeben. Die Elution der Proteine erfolgte stufenweise mit ansteigenden Konzentrationen von NaCl in 0.02 M Tris-HCl-Puffer. Die Elutionslösungen hatten folgende NaCl-Konzentrationen: 0–0.02 M, 0.02–0.05 M, 0.05–0.1 M, 0.1–0.2 M und 0.2–0.4 M. Von jeder Elutionslösung wurden jeweils 30 ml benutzt.

Messung der Enzymaktivität

In Äthanol gelöstes $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität 55 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurde durch Zugabe von nichtmarkiertem Dehydroepiandrosteron bis zu einer spezifischen Aktivität von 2.4 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ verdünnt. Unter Standardbedingungen wurden 20 nMol $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron, aufgenommen in 40 μl Propylenglycol mit 0.15 ml der gereinigten Enzympräparation (entsprechend 30–100 μg Eiweiss, gelöst in 0.02 M Tris-HCl-Puffer bei pH 7.4), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat (Natriumsalz) (in 0.05 ml Wasser gelöst) und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 min bei 37° in einem Schüttelthermostaten inkubiert. Das Endvolumen betrug 1.5 ml.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die nicht-konjugierten Steroide durch Ausschütteln mit Äthylacetat (3 \times 5 ml) entfernt. Anschliessend wurde die wässrige Inkubationslösung mit NaCl gesättigt; die Konjugate wurden mit 2 ml wassergesättigtem *n*-Butanol extrahiert. 0.5 ml der butanolischen Phase wurden in ein Szintillations-

gläschen pipettiert und mit Hilfe von 1 ml Methanol in 15 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst. Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Kontrollinkubation unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zusatz von 3'-phosphoadenylylsulfat, durchgeführt.

Enzymeinheit

Als eine Enzymeinheit wurde diejenige Enzymmenge definiert, welche die Sulfatierung von 1 nMol Substrat in 60 Min unter den gewählten Bedingungen katalysiert.

Herstellung von [³⁵S]3'-Phosphoadenylylsulfat

Radioaktives [³⁵S]3'-Phosphoadenylylsulfat wurde nach Angaben von SPENCER¹⁵ hergestellt. 20%iges Rattenleberhomogenat in Rohrzucker (Gew./Vol.) wurde 60 min bei $150\,000 \times g$ zentrifugiert. 0.2 ml des $150\,000 \times g$ -Überstandes wurden mit 50 μ C trägerfreiem $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ und 4 μ Mol ATP in Gegenwart von 2 μ Mol MgCl_2 in 0.2 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.8) 2 h bei 37° inkubiert (Endvolumen 0.2 ml). Die Inkubationslösung wurde in einem kochenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf Chromatographiepapier aufgetragen und 20 Std im System A (Äthanol-1 M Ammoniumacetat (7.5:3.0, V/V)) chromatographiert. Das entstandene [³⁵S]3'-Phosphoadenylylsulfat wurde durch Vergleich mit authentischem 3'-Phosphoadenylylsulfat lokalisiert und mit Wasser eluiert.

Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde in einem Packard Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer (Modell 3003) gemessen (81% Zählausebeute für ¹⁴C). Die Szintillationslösung aus 4 g/l 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0.3 g/l 1,4-Bis-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (POPOP) in Toluol. Die Messung der Radioaktivität auf den Papierchromatogrammen erfolgte mit einem Packard-Radiopapierchromatographen, Modell 7201.

Eiweißbestimmungen

Der Eiweißgehalt der einzelnen Enzympräparationen wurde nach der Methode von LOWRY *et al.*¹⁶ gemessen; dabei diente Rinderserumalbumin als Standard eiweiß.

Papierchromatographie

Alle Versuche wurden bei 25–30° durchgeführt. Die freien Steroide wurden auf Formamid-imprägniertem Papier (Firma Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl) mit Cyclohexan chromatographiert (System B). Zum Nachweis der Konjugate dienten System C (Essigsäure-Wasser-*tert.*-Butanol-Dichloräthan (6:14:5:15, V/V/V/V)) sowie System D (0.2% NH_4OH -Äthylacetat-*n*-Butanol (8:7:1, V/V/V)). Die Isolierung von [³⁵S]3'-Phosphoadenylylsulfat erfolgte im System A (Äthanol-1 M Ammoniumacetat, pH 7.0 (7.5:3, V/V)). Die Lokalisierung von Dehydroepiandrosteronsulfat erfolgte durch Anfärben von Randstreifen, auf denen sich authentisches Dehydroepiandrosteronsulfat befand, mit *m*-Dinitrobenzol-KOH.

Mikrochemische Reaktionen zur Identifizierung von Dehydroepiandrosteronsulfat

Das in den Systemen C und D chromatographierte radioaktive Dehydroepiandrosteronsulfat wurde mit Methanol eluiert; der Rückstand wurde in 1 ml eines Ge-

misches von Wasser und Methanol (1:1, V/V) aufgenommen, mit 10 mg authentischem Dehydroepiandrosteronsulfat versetzt und über eine Säule mit Sephadex G-25 chromatographiert. Das mit Wasser eluierte Konjugat befand sich in den Fraktionen 8 und 9 (1.5 ml/Fraktion). Die wässrige Phase wurde unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand aus Äthanol-Äthylacetat bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurde das radioaktive Dehydroepiandrosteronsulfat in 40 μ l Propylenglykol gelöst und in 2 ml eines 0.5 M Acetat-Puffers (pH 4.5) mit 4 mg Sulfatase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) 60 min bei 37° inkubiert. Das freigesetzte Steroid wurde dreimal mit je 5 ml Äthylacetat extrahiert; die eingedampften Rückstände wurden im System B chromatographiert.

ERGEBNISSE

Intrazelluläre Verteilung des Enzyms

Zur intrazellulären Lokalisierung der Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber wurden die Mitochondrien-, Mikrosomen- und Cytosol-Fractionen getrennt unter Standardbedingungen mit Dehydroepiandrosteron und 3'-Phosphoadenylylsulfat inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat ausschliesslich in der Cytosol-Fraktion erfolgte; eine nicht enzymatische Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat konnte ausgeschlossen werden.

Reinigung des Enzyms

Die Cytosol-Fraktion (150 000 \times g-Überstand) der menschlichen Leber wurde fraktioniert mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt; die höchste Aktivität der Steroid-Sulfotransferase fand sich hierbei im Sättigungsbereich zwischen 30 und 50%. Durch diesen Reinigungsschritt wurde das Enzym gegenüber der Cytosol-Fraktion etwa 3fach angereichert (Tabelle I). Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde in 2 ml eines 0.02 M Tris-HCl-Puffers aufgenommen und der Gelfiltration über eine Säule mit Sephadex G-200 unterworfen (Elutionsschema siehe Fig. 1); dadurch wurde eine 8fache Anreicherung erzielt. Die so gewonnene Enzympräparation wurde über eine Säule mit DEAE-

TABELLE I

ANREICHERUNG DER STEROID-SULFOTRANSFERASE AUS DER LEBER DES MENSCHEN

20 nMol [$4\text{-}^{14}\text{C}$]Dehydroepiandrosteron wurden mit den einzelnen Enzympräparationen in Gegenwart von 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat unter Standardbedingungen inkubiert (Einzelheiten vgl. METHODIK).

Enzympräparation	Vol. (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität		Spezifische Aktivität (U*/mg)	Anreicherung (n-fach)
			U*	%		
150 000 \times g-Überstand	30	390	308	100	0.79	—
30–50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung	4	93.5	224	73	2.40	3.2
Filtration durch Sephadex G-200	30	30.8	202	65	6.55	8.3
DEAE-Cellulose-Chromatographie	19	7.2	158	51	17.36	22.0

* U = nMol Dehydroepiandrosteron sulfat gebildet pro 60 min.

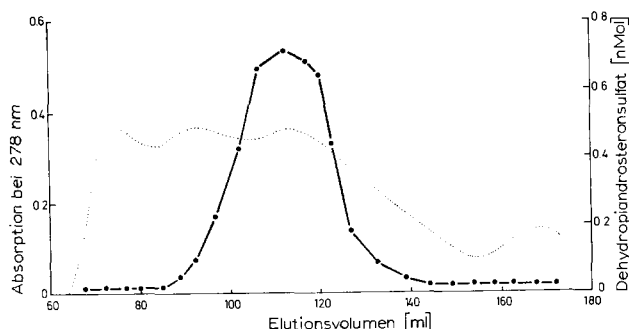


Fig. 1. Verhalten der 30–60%igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung des $150\,000 \times g$ -Überstandes der menschlichen Leber bei der Gelfiltration durch Sephadex G-200. Die Enzympräparation (entsprechend 75 mg Eiweiss) wurde in 2.0 ml eines 0.02 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) gelöst und auf das 85 cm hohe Gelbett aufgetragen (Einzelheiten vgl. METHODIK). Es wurde mit 0.02 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) eluiert. Die Eluate wurden in 6-ml-Fractionen aufgefangen. Die Enzymaktivität wurde durch Messung von radioaktivem Dehydroepiandrosteronsulfat ermittelt; Einzelheiten über den Standard-Inkubationsansatz vgl. METHODIK. Der Eiweissgehalt der Eluate wurde bei 279 nm in einer Durchflussküvette gemessen. ●—●, Aktivität der Sulfotransferase der menschlichen Leber; ·····, Eiweissgehalt der Eluate.

Cellulose chromatographiert (Einzelheiten vgl. METHODIK). Das Enzym wurde mit einer Lösung, deren Konzentration an NaCl 0.4 M war, eluiert; die Eluate wurden in 5 ml-Portionen gesammelt. Dieser Reinigungsschritt führte zu einer 22fachen Gesamtanreicherung der Enzymaktivität gegenüber dem $150\,000 \times g$ -Überstand bei einer Ausbeute von etwa 50%. Alle weiteren Versuche zur Charakterisierung der Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber wurden mit der 22fach angereicherten Enzympräparation ausgeführt.

Stabilität des Enzyms

Die gereinigte Enzympräparation konnte bei -20° ohne Aktivitätsverlust 4 Monate lang aufbewahrt werden. Bei 4° trat nach 48 Std ein schneller Aktivitätsverlust auf.

Identifizierung des Reaktionsproduktes

(1) Das radioaktive Reaktionsprodukt wurde der Papierchromatographie in den Systemen C und D unterworfen. Dabei zeigte die untersuchte Verbindung das gleiche papierchromatographische Verhalten wie authentisches Dehydroepiandrosteronsulfat (R_F -Werte im System C 0.40, im System D 0.33).

(2) 2 μC [^{35}S]3'-Phosphoadenylylsulfat (Einzelheiten vgl. METHODIK) wurden mit 0.15 ml der gereinigten Enzympräparation (enthaltend 55 μg Eiweiss), 20 nMol Dehydroepiandrosteron und 1 ml eines 0.3 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 min bei 37° inkubiert. Die Inkubationslösungen wurden zunächst mit Äthylacetat, dann mit *n*-Butanol extrahiert. Die Rückstände der eingedampften butanolischen Extrakte wurden in den Systemen C und D papierchromatographiert; die R_F -Werte des radioaktiven Reaktionsproduktes stimmten mit denjenigen von authentischem Dehydroepiandrosteronsulfat überein.

(3) Das radioaktive Reaktionsprodukt wurde mit einer Sulfatasepräparation hydrolysiert (Einzelheiten vgl. METHODIK). Das dabei gebildete freie Steroid wurde im System B papierchromatographiert und zeigte identisches Verhalten mit authen-

TABELLE II

KRISTALLISATION VON $[4-^{14}\text{C}]$ DEHYDROEPIANDROSTERONSULFAT ZUR KONSTANTEN SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT

Kristallisation	Spezifische Aktivität (Disint./Min $\times 10^{-3}$ /mg)	
	Kristalle	Mutterlauge
1	162	184
2	154	162
3	145	144
4	143	82
5	145	140

tischem Dehydroepiandrosteron. Bei Zusatz von 10 mMol Saccharodilakton erfolgte —wie zu erwarten—keine Hydrolyse des Reaktionsproduktes.

(4) Durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität (Tabelle II) konnte das radioaktive Reaktionsprodukt als $[4-^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteronsulfat identifiziert werden.

Kinetische Untersuchungen

pH-Optimum

Die enzymatische Reaktion zeigte ein pH-Optimum bei 7.4 in Tris-HCl-Puffer.

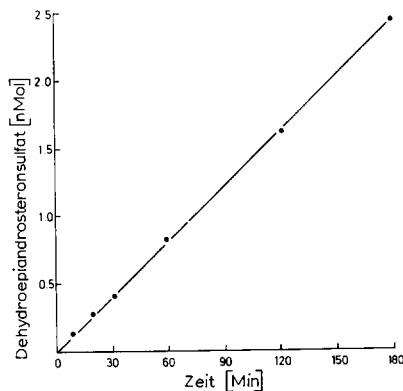
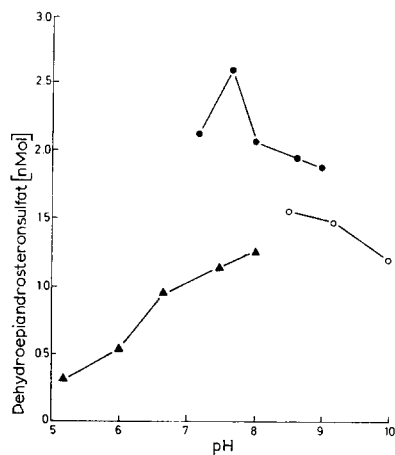


Fig. 2. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch angereicherte Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration. 20 nMol $[4-^{14}\text{C}]$ -Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend $55 \mu\text{g}$ Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml Puffer 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml). ▲—▲, 0.4 M Soerensen-Phosphat-Puffer; ●—●, 0.4 M Tris-HCl-Puffer; ○—○, 0.4 M Glycin-NaOH-Puffer.

Fig. 3. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Zeit. 20 nMol $[4-^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend $55 \mu\text{g}$ Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

In Gegenwart von Soerensen-Phosphat-Puffer war bei gleichen pH-Werten eine geringere Enzymaktivität zu beobachten (Fig. 2).

Abhängigkeit von der Zeit

Aus Fig. 3 geht hervor, dass die Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat in Abhängigkeit von der Zeit in einem Bereich bis 180 min eine Reaktion nullter Ordnung darstellt.

Abhängigkeit von der Enzymmenge

Zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat bestand in einem Bereich bis zu 100 μg Eiweiss Linearität (Fig. 4).

Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Dehydroepiandrosteron

Die Michaelis-Menten-Konstante für Dehydroepiandrosteron wurde mit Hilfe der LINEWEAVER-BURK¹⁷-Transformation graphisch ermittelt (Fig. 5). Die K_m betrug

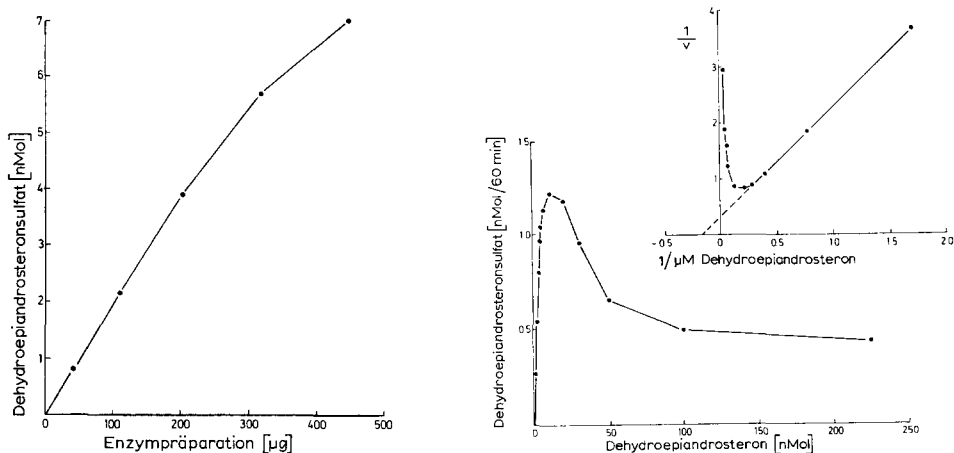


Fig. 4. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Eiweissmenge. 20 nMol $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit steigenden Mengen der Enzympräparation (0–1.0 ml; 0–430 μg Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 2.3 ml).

Fig. 5. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Konzentration von Dehydroepiandrosteron. Steigende Mengen 1–256 nMol $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend 55 μg Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

$6.7 \cdot 10^{-6}$ M. Die graphische Darstellung zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen bereits bei einer Substrat-Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ M eine Hemmung der Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat eintrat. Durch Zusatz von Dehydroepiandrosteronsulfat in verschiedenen Konzentrationen wurde die Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron *nicht* gehemmt.

Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für 3'-Phosphoadenylylsulfat

Fig. 6 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzen-

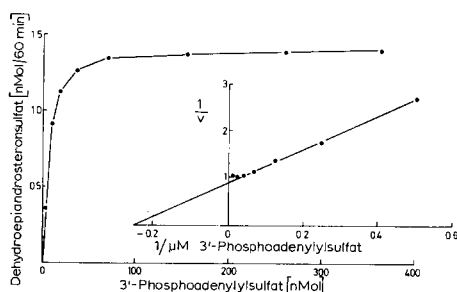


Fig. 6. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Konzentration von 3'-Phosphoadenylylsulfat. 20 nMol [$4\text{-}^{14}\text{C}$]Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend $55 \mu\text{g}$ Eiweiss), steigenden Mengen (2–256 nMol) 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

tration an 3'-Phosphoadenylylsulfat. Aus der doppeltreziproken Transformation nach LINEWEAVER UND BURK¹⁷ ergab sich eine K_m von $4.0 \cdot 10^{-6}$ M für 3'-Phosphoadenylylsulfat.

Aktivierungsenergie

Mit steigender Temperatur nahm die Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron bis zu einem Maximum bei 50° stetig zu, um danach steil abzufallen (Fig. 7). Aus dem ansteigenden Teil der Kurve wurde zwischen 37 und 50° die Aktivierungsenergie berechnet; sie betrug 22.2 kcal/Mol .

Temperaturstabilität

Einzelne Portionen der gereinigten Enzympräparation wurden jeweils 10 Min bei verschiedenen Temperaturen präinkubiert. Anschliessend wurde unter Standard-

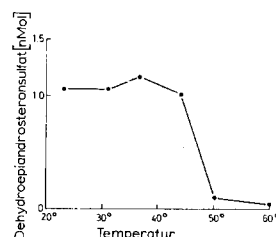
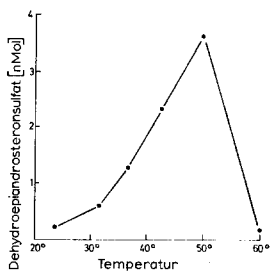


Fig. 7. Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat durch die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber in Abhängigkeit von der Temperatur. 20 nMol [$4\text{-}^{14}\text{C}$]Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität $2.4 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend $55 \mu\text{g}$ Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

Fig. 8. Einfluss einer Präinkubation der angereicherten Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber ohne Substrat bei verschiedenen Temperaturen auf die Bildung von Dehydroepiandrosteronsulfat. Jeweils 0.15 ml der Enzympräparation ($55 \mu\text{g}$ Eiweiss in 0.02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.4) wurden 10 Min bei verschiedenen Temperaturen präinkubiert. Anschliessend wurde die so vorbehandelte Enzympräparation mit 20 nMol [$4\text{-}^{14}\text{C}$]Dehydroepiandrosteron, 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

TABELLE III

EINFLUSS VON SH-GRUPPEN-BLOCKIERENDEN SUBSTANZEN AUF DIE AKTIVITÄT DER ANGEREICHERTEN STEROID-SULFOTRANSFERASE AUS DER LEBER DES MENSCHEN

20 nMol [4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität 2.4 μ C/ μ Mol) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend 50 μ g Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat, steigenden Mengen an SH-Blockern und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

Zugesetzte Verbindung	Endkonzn. (mM)	Gebildete Menge [4- ¹⁴ C]-Dehydroepiandrosteronsulfat (nMol)	Hemmung (%)
Keine	—	2.1	0
p-Chlormercuribenzoessäure	0.5	2.1	0
	5.0	1.5	26
	6.6	0.4	80
Jodacetamid	1.3	2.1	0
	13.0	1.6	24
	27.0	0.5	76
	54.0	0	100

bedingungen (bei 37°) die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen (Einzelheiten vgl. METHODIK). Aus Fig. 8 wird deutlich, dass während der 10minütigen Präinkubation mit steigender Temperatur bei 37° eine geringe Aktivierung der Sulfotransferase eintrat, während bei höheren Temperaturen das Enzym in zunehmendem Masse inaktiviert wurde.

Einfluss von Cystein und EDTA

Die gereinigte Enzympräparation wurde unter Standardbedingungen in Gegen-

TABELLE IV

EINFLUSS VON KATIONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER ANGEREICHERTEN STEROID-SULFOTRANSFERASE AUS DER LEBER DES MENSCHEN

20 nMol [4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteron (spezifische Aktivität 2.4 μ C/ μ Mol) wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (entsprechend 35 μ g Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat, 1 μ Mol bzw. 5 μ Mol des jeweiligen Kations und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

Zugesetztes Kation	Gebildete Menge [4- ¹⁴ C]-Dehydroepiandrosteronsulfat			
	Kationen-Konzn. 0.67 mM		Kationen-Konzn. 3.3 mM	
	nMol	%	nMol	%
Kein	1.56	100	1.56	100
Co ²⁺	2.00	130	3.40	215
Ni ²⁺	1.87	120	2.90	185
Cu ²⁺	1.70	110	0.30	20
Fe ²⁺	3.00	190	0.06	4
Hg ²⁺	2.36	150	0.13	8
Zn ²⁺	2.78	180	0.58	40
Ca ²⁺	1.59	100	1.87	120
Mg ²⁺	1.54	100	1.49	95
Mn ²⁺	1.25	80	1.87	120

wart von Cystein (Konzentration 0.7 bzw. 3.5 mM) inkubiert; dabei wurde keine Beeinflussung der Enzymaktivität beobachtet. Ebenso war EDTA ohne Einfluss auf die angereicherte Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber.

Einfluss von SH-Gruppen-blockierenden Reagenzien

Während niedrige Konzentrationen von SH-Gruppen-blockierenden Substanzen die Steroid-Sulfotransferase nicht beeinträchtigten, wurde bei Konzentrationen von 5 mM *p*-Chlormercuribenzoessäure und 13 mM Jodacetamid die Enzymaktivität nur jeweils etwa 25% gehemmt (Tabelle III).

Einfluss von Kationen

Wie aus Tabelle IV hervorgeht, hatten ausser Mn^{2+} alle untersuchten zweiwertigen Kationen in einer Konzentration von 0.67 mM einen aktivierenden Einfluss auf das Enzym. Bei einer Konzentration von 3.3 mM hingegen aktivierten nur Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} , während Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} und Zn^{2+} einen stark hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität ausübten.

Substratspezifität

Die Untersuchungen zur Substratspezifität erfolgten unter Standardbedingungen, jedoch für die Dauer von 120 min (Tabelle V). Die jeweils eingesetzte Substratmenge betrug 20 nMol. Für jedes Substrat wurde eine Kontrollinkubation ohne 3'-Phosphoadenylylsulfat durchgeführt. Die sulfatierten Reaktionsprodukte wurden papierchromatographisch nachgewiesen und durch Messung der Radioaktivität quantitativ bestimmt (Einzelheiten vgl. METHODIK). Ätiocholanolon, Östron, Östradiol-17 β und Östriol wurden in einem weitaus geringeren Umfange sulfatiert als Dehydroepiandrosteron. Es wurde nicht untersucht, in welcher Position Östradiol-17 β und Östriol sulfatiert wurden.

TABELLE V

SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ANGEREICHERTEN STEROID-SULFOTRANSFERASE AUS DER LEBER DES MENSCHEN

Jeweils 20 nMol radioaktives Substrat wurden mit 0.15 ml der Enzympräparation (enthaltend 55 μ g Eiweiss), 80 nMol 3'-Phosphoadenylylsulfat und 1.0 ml eines 0.4 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.4) 60 Min bei 37° inkubiert (Endvolumen 1.5 ml).

Substrat	Gebildete Menge radioaktives Steroid-Sulfat	
	nMol	% *
[4- ¹⁴ C]Dehydroepiandrosteron	2.56	100
[1,2- ³ H ₂]Ätiocholanolon	1.15	45
[4- ¹⁴ C]Östron	0.21	8
[4- ¹⁴ C]Östradiol-17 β	0.37	15
[4- ¹⁴ C]Östriol	0.80	31
[4- ¹⁴ C]Testosteron	0	0
[4- ¹⁴ C]Cholesterin	0	0
[4- ¹⁴ C]17 α -Hydroxyprogesteron	0	0
[1,2- ³ H ₂]Cortisol	0	0
[1,2- ³ H ₂]Aldosteron	0	0

* Bezogen auf die Bildung von [4-¹⁴C]Dehydroepiandrosteronsulfat (= 100%).

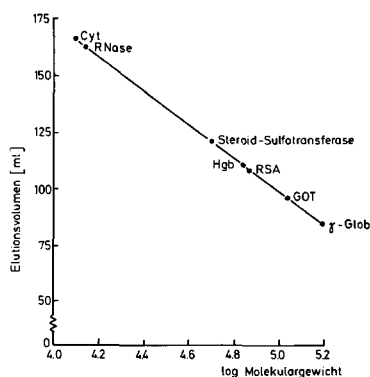


Fig. 9. Beziehungen zwischen den Elutionsvolumina und den Logarithmen der Molekulargewichte verschiedener Standardproteine sowie der angereicherten Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber. Die Bestimmungen wurden mit Hilfe von Sephadex G-200 durchgeführt. Cyt, Cytochrom *c* aus Pferdeherz; RNase, Ribonuclease aus Rinderpankreas; RSA, Rinderserumalbumin; Hgb, Hämoglobin aus Ochsenblut; GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus Schweineherzmuskel; γ -Glob, menschliches γ -Globulin.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der Steroid-Sulfotransferase aus der menschlichen Leber erfolgte mit Hilfe der Gelfiltration über eine Säule mit Sephadex G-200 (1.4 cm \times 85 cm); die Versuche wurden mit der 22fach angereicherten Enzympräparation durchgeführt. In Fig. 9 wurden die Elutionsvolumina von 6 Standardproteinen gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Aus dem Elutionsvolumen der Steroid-Sulfotransferase kann geschlossen werden, dass das Molekulargewicht des angereicherten Enzyms bei etwa 50 000 liegt.

Hemmung der Steroid-Sulfotransferase durch Östron

Um einen möglichen Einfluss von Östron auf die Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron durch die Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber zu prüfen, wurde das Enzym mit steigenden Mengen [4- 14 C]Dehydroepiandrosteron (1–6 nMol) unter gleichzeitigem Zusatz von 10 nMol nichtradioaktivem Östron inkubiert. Es zeigte sich, dass Östron die Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron kompetitiv hemmt; die Inhibitorkonstante betrug unter den gewählten Bedingungen $17.4 \cdot 10^{-6}$ M.

DISKUSSION

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, kommt in der Leber des Menschen eine Steroid-Sulfotransferase vor, die in der Cytosol-Fraktion lokalisiert ist und durch Fällung mit Ammoniumsulfat, Gelfiltration und Chromatographie an DEAE-Cellulose gegenüber dem $150\,000 \times g$ -Überstand um das 22fache angereichert werden konnte. Die so gewonnene Enzympräparation erwies sich als relativ stabil; nach 4monatiger Aufbewahrung bei -20° war noch volle Enzymaktivität nachweisbar. Im Verlaufe der Anreicherung der Steroid-Sulfotransferase ergaben sich keine Hinweise für eine Fraktionierung in mehrere Sulfotransferasen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Die Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber sulfatiert sowohl Dehydroepiandrosteron, ein alkoholisches 3β -Hydroxysteroid, als auch Ätio-

cholanolon, ein alkoholisches 3 α -Hydroxysteroid. Ob die beiden Steroide durch dasselbe Enzym oder durch mehrere Enzyme konjugiert werden, kann auf Grund der vorliegenden Versuche noch nicht gesagt werden. Darüber hinaus wird auch die phenolische 3-Hydroxygruppe von Östron sulfatiert; die gleiche Feststellung dürfte ebenfalls für die 3-Hydroxygruppen von Östradiol-17 β und Östriol zutreffen.

Von besonderem Interesse ist die Feststellung, dass weder Testosteron noch Cholesterin durch die Enzympräparation konjugiert werden, obgleich beide Steroide alkoholische Hydroxygruppen besitzen. Da sowohl Testosteron als auch Cholesterin in der Leber des Menschen sulfatiert werden, muss angenommen werden, dass entsprechende Sulfotransferase-Aktivitäten entweder bei der Aufarbeitung der hier beschriebenen Präparation abgetrennt oder zerstört worden sind. In der Tat fanden BOSTRÖM UND WENGELE¹⁴ nach Inkubation von Testosteron mit dem Überstand der menschlichen Leber Testosteronsulfat, während BANERJEE UND ROY¹⁸ die Bildung von Cholesterinsulfat mit der Androstenolon-Sulfotransferase der Meerschweinchenleber nachweisen konnten. Aus diesen Befunden darf der vorläufige Schluss gezogen werden, dass in der Leber des Menschen nicht nur eine Steroid-Sulfotransferase, sondern mehrere Sulfotransferasen vorkommen, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Substratspezifitäten voneinander unterscheiden.

Die Michaelis-Menten-Konstanten der Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber betragen für Dehydroepiandrosteron $6.7 \cdot 10^{-6}$ M und für 3'-Phosphoadenylylsulfat $4.0 \cdot 10^{-6}$ M. Diese Werte sind annähernd identisch und sprechen für eine gleich starke Affinität des Enzyms zum Substrat und Cofaktor. BANERJEE UND ROY¹⁸ arbeiteten mit einer angereicherten Androstenolon-Sulfotransferase aus Meerschweinchenleber und fanden ebenfalls etwa gleich grosse K_m -Werte für Androstenolon ($2.0 \cdot 10^{-5}$ M) und für 3'-Phosphoadenylylsulfat ($4.3 \cdot 10^{-5}$ M). Dagegen beobachteten ADAMS UND POULOS¹¹ bei der angereicherten Östrogen-Sulfotransferase der Nebenniere des Rindes deutliche Differenzen in den K_m -Werten für Östradiol-17 β ($1.4 \cdot 10^{-5}$ M) und für 3'-Phosphoadenylylsulfat ($7.0 \cdot 10^{-5}$ M). Die Tatsache, dass—je nach der verwendeten Enzympräparation—die K_m -Werte für die Steroidsubstrate einerseits und für 3'-Phosphoadenylylsulfat andererseits voneinander verschieden sind, lässt sich aufgrund der bisher vorliegenden Befunde nicht erklären.

Die mit der hier verwendeten Enzympräparation aufgenommene Substratsatzkurve zeigt den typischen Verlauf einer Reaktion, die durch steigende Substratmengen gehemmt wird. Es sei darauf hingewiesen, dass ein Zusatz von Dehydroepiandrosteronsulfat keine Hemmung auf die Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron ausübte; demnach kann eine Produkthemmung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zum Dehydroepiandrosteron lässt die Substratsatzkurve für 3'-Phosphoadenylylsulfat weder eine Substrat- noch eine Produkthemmung erkennen.

Das Temperaturoptimum der Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron liegt bei 50°. Wie aus den Präinkubationsversuchen hervorgeht, bleibt die Enzymaktivität in Abwesenheit von Substrat bis 42° annähernd konstant, ein Ergebnis, das ebenfalls auf eine relativ grosse Temperaturstabilität hinweist. Eine nennenswerte Hemmung der Sulfotransferase-Aktivität erfolgte erst durch relativ hohe Konzentrationen von *p*-Chlormercuribenzoessäure ($6.6 \cdot 10^{-3}$ M) und Jodacetamid ($27 \cdot 10^{-3}$ M). Aufgrund dieser Befunde kann nicht mit Sicherheit angenommen werden, dass SH-Gruppen einen essentiellen Anteil am aktiven Zentrum des Enzyms haben. Auch aus dem Verhalten gegenüber den Metallionen lassen sich keine definitiven Rückschlüsse auf die

Natur des aktiven Zentrums ziehen. Bemerkenswert ist, dass weder der Zusatz von Mg^{2+} noch von EDTA einen erkennbaren Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben. Auch BANERJEE UND ROY⁹ konnten keine Wirkung von EDTA auf die Aktivität der angereicherten Androstendion-Sulfotransferase der Meerschweinchenleber feststellen.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, dass die hier angereicherte und näher charakterisierte Steroid-Sulfotransferase in der Leber des Menschen eine entscheidende Rolle im Zwischenstoffwechsel der Steroide spielt. Dehydroepiandrosteronsulfat ist sowohl eine wichtige Transportform von Dehydroepiandrosteron als auch ein Vorläufer für die Synthese von 4-Androst-3,17-dion (und Testosteron) sowie Östron (und Östradiol-17 β). Über diese drei Stoffwechselwege dürfte die Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber eine kontrollierende Funktion in der Homöostase der Steroidhormone ausüben.

ZUSAMMENFASSUNG

Im $150\,000 \times g$ -Überstand der menschlichen Leber wurde eine 3'-Phosphoadenylylsulfat:Steroid-Sulfotransferase nachgewiesen. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat, Gelfiltration des Niederschlages an Sephadex G-200 und Chromatographie an DEAE-Cellulose konnte das Enzym 22fach angereichert werden. Nach Inkubation der Steroid-Sulfotransferase mit Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androst-17-on) wurde ein Reaktionsprodukt isoliert, das mit Hilfe der Papierchromatographie, verschiedener mikrochemischer Reaktionen sowie durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität als Dehydroepiandrosteronsulfat identifiziert wurde. Die Steroid-Sulfotransferase zeigte ein pH-Optimum in Tris-HCl-Puffer bei 7.4. Die Michaelis-Menten-Konstanten betrugen für Dehydroepiandrosteron $6.7 \cdot 10^{-6}$ M und für 3'-Phosphoadenylylsulfat $4 \cdot 10^{-6}$ M. Das Enzym verlor seine Aktivität nach 6 Tagen, wenn es bei 4° aufbewahrt wurde. Dagegen war die Sulfotransferase bei -20° mindestens 4 Monate voll aktiv. Das Enzym hatte ein Temperaturoptimum bei 50° und eine Aktivierungsenergie von 22.2 kcal/Mol im Temperaturbereich von 37-50°. Mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadex G-200 wurde für die Steroid-Sulfotransferase ein Molekulargewicht von etwa 50 000 ermittelt.

Die Aktivität der angereicherten Enzympräparation wurde weder durch Cystein noch durch EDTA beeinflusst. SH-Gruppen-blockierende Substanzen übten erst in relativ hohen Konzentrationen eine hemmende Wirkung aus. Durch Zusatz von Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} und Mn^{2+} wurde das Enzym aktiviert, während Cu^{2+} und Zn^{2+} , insbesondere aber Fe^{2+} und Hg^{2+} , eine hemmende Wirkung ausübten.

Die Steroid-Sulfotransferase der menschlichen Leber konjugiert nicht nur Dehydroepiandrosteron (100%), sondern auch—in geringerem Umfange—3 α -Hydroxy-5 β -androst-17-on (45%), Östriol (31%), Östradiol-17 β (15%) und Östron (8%). Weder Testosteron noch Cholesterin werden durch die Steroid-Sulfotransferase konjugiert.

DANK

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft durchgeführt. Der

eine von uns (R.G.) dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Forschungsstipendiums. Herrn Dr. H. U. Bergmeyer sind wir für die Überlassung von 3'-Phosphoadenylylsulfat zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

- 1 B. SCHACHTER AND G. F. MARRIAN, *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 35 (1936) 222.
- 2 B. SCHACHTER AND G. F. MARRIAN, *J. Biol. Chem.*, 126 (1938) 663.
- 3 E. H. VENNING, M. M. HOFFMAN AND J. S. L. BROWNE, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 369.
- 4 P. L. MUNSON, T. F. GALLAGHER AND F. C. KOCH, *Endocrinology*, 30 (1942) 1036.
- 5 P. L. MUNSON, T. F. GALLAGHER AND F. C. KOCH, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 67.
- 6 W. KLYNE AND G. F. MARRIAN, *Biochem. J.*, 39 (1945) XLV.
- 7 E. DÖLLEFELD AND H. BREUER, *Z. Vitamin-, Hormon- Fermentforsch.*, 14 (1966) 193.
- 8 Y. NOSE AND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1348.
- 9 R. K. BANERJEE AND A. B. ROY, *Mol. Pharmacol.*, 2 (1966) 56.
- 10 J. B. ADAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 572.
- 11 J. B. ADAMS AND A. POULOS, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 493.
- 12 J. B. ADAMS AND M. CHULAVATNATOL, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 509.
- 13 J. B. ADAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 146 (1967) 522.
- 14 H. BOSTRÖM AND B. WENGELE, *Acta Soc. Med. Upsalien.*, 69 (1964) 41.
- 15 B. SPENCER, *Biochem. J.*, 77 (1960) 294.
- 16 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 17 H. LINEWEAVER AND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 18 R. K. BANERJEE AND A. B. ROY, *Biochim. Biophys. Acta*, 137 (1967) 211.

Biochim. Biophys. Acta, 220 (1970) 69-84