

## 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, ein neues kristallines Enzym\*

Kürzlich berichteten wir<sup>1</sup>, dass Extrakte aus *Streptomyces hydrogenans*<sup>2</sup> 20-Keto-Steroide in Gegenwart von DPNH zu den entsprechenden 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroiden reduzieren. Inzwischen konnten wir das die Umwandlung vermittelnde Enzym in kristalliner Form darstellen. Da es in Hydrazin-Puffer<sup>3</sup> auch die umgekehrte Reaktion, Dehydrierung von 20 $\beta$ -Hydroxy-Steroiden zu 20-Keto-Steroiden katalysiert, schlagen wir für das Enzym den Namen "20 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase" (abgekürzt: 20 $\beta$ -Enzym) vor.

Bei der Darstellung des Enzyms haben wir das früher mitgeteilte Verfahren<sup>1</sup> in drei Punkten abgeändert:

1. Das Enzym wurde adaptiv durch Wachstum der Mikroorganismen in Nährösungen, denen Reichsteins Substanz S zugesetzt war (45 mg/l), 10 bis 30 fach angereichert.

2. Zur Extraktion des Enzyms wurde das Mycel des *Streptomyces hydrogenans* durch Ultraschall aufgeschlossen (1 Min, 20 kHz, 40 W/cm<sup>2</sup>). Die beschallte Mycel-suspension wurde scharf zentrifugiert (10,000  $\times$  g, 30 Min) und das Enzym sogleich bei 45 % Ammoniumsulfatsättigung<sup>6</sup> aus dem Überstand ausgefällt. Anschliessend wurden die bereits beschriebenen Reinigungsschritte 4, 5 und 6<sup>1</sup> vorgenommen.

3. Eine weitere Reinigung des Enzyms erfolgte durch Austauschchromatographie an DEAE-Zellulose (Schleicher & Schüll)<sup>4</sup>. Hierzu wurde das Enzym in 0.025 M, Tris pH 8.7, auf die Säule aufgetragen. Anschliessend wurde mit 0.05 M Tris, pH 8.7, dem 0.23 M NaCl zugesetzt war, eluiert. Die Fraktionen 20 bis 40, die den Hauptteil der Enzymaktivität enthielten (vergl. Fig. 1), wurden vereinigt, das Enzym bei 55 % Ammoniumsulfatsättigung<sup>\*\*</sup> gefällt und in wenig Wasser, das 0.1 % EDTA (pH 8) enthielt, gelöst. Die Lösung wurde auf 10 % Ammoniumsulfatsättigung<sup>\*</sup> eingestellt und nach etwa 12 St. klar zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand innerhalb von drei Tagen vorsichtig auf etwa 25 % Ammoniumsulfatsättigung gebracht und das pH jeweils auf etwa 7.5 bis 8 mit 3 %-iger NH<sub>3</sub>-Lösung eingestellt. Nach dieser Zeit war das Enzym auskristallisiert, was sich makroskopisch besonders am Seiden-glanz der Lösung zeigte, der beim Stehenlassen über Nacht erhalten blieb und sich nicht absetzte<sup>\*\*\*</sup>. Im mikroskopischen Bild sind scharfkantige Kristall-Nadeln erkennbar (Fig. 2).

Tabelle I gibt die Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten der bei etwa 3,000  $\times$  g zentrifugierten Kristalle wieder. Aus der Tabelle geht hervor, dass die spezifische Aktivität des Enzyms bei wiederholter Kristallisation konstant bleibt.

*Der optische Test des 20 $\beta$ -Enzyms:* In ein Gemisch von 1.3 ml Triaethanolamin Puffer (pH 7.3, 0.05 M), 0.03 ml DPNH (5 mg/ml) und 0.02 ml Cortison ( $2 \cdot 10^{-2}$  M, in Aethanol gelöst) wird ein kleines Aliquot des Enzympräparates eingerührt (z.B. 0.02 ml der 100fach verdünnten Kristallsuspension). Die nun auftretende Extinktions-abnahme ( $\Delta \lg I_0/I$ ) bei 340 m $\mu$  wird pro Min gemessen und auf den Proteingehalt bezogen.

Abkürzungen: DPNH, Hydriertes Diphosphorpyridinnucleotid; Tris, Trimethylaminomethan; EDTA, Aethylendiamintetraessigsäure; DEAE, diaethylamino-.

\* Ein Teil dieser Arbeit wurde von Herrn cand. med. F. G. SAHRHOLZ im Rahmen seiner Doktorarbeit selbständig durchgeführt.

\*\* (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, p. A. Merck, Nr. 1217, 2 mal aus 0.2 %-igem EDTA rekristallisiert<sup>5</sup>.

\*\*\* Wir danken Herrn Dozent Dr. PFLEIDERER für die wertvollen Ratschläge in dieser Phase der Arbeit.

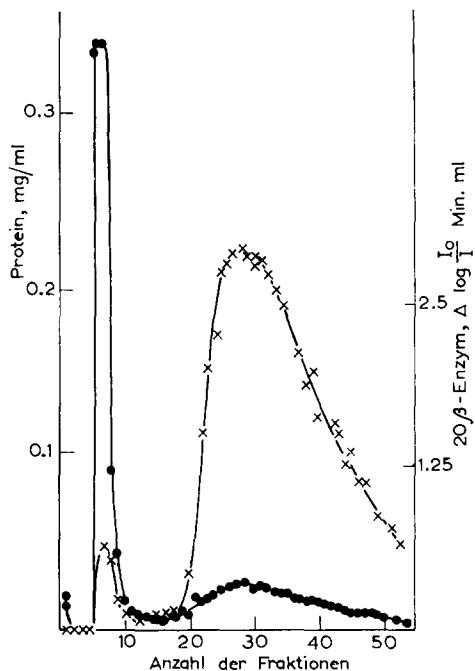


Fig. 1. Austauschchromatographie des  $20\beta$ -Enzyms an DEAE-Zellulose<sup>4</sup>.  $\times$  —  $\times$  Aktivität des  $20\beta$ -Enzyms; ● — ● Protein gehalt. Das an Phosphatgel gereinigte und mit Ammoniumsulfat gefällte Enzympräparat (79 mg) wurde gegen 0.025 M Tris-Puffer, pH 8.7, enthaltend 0.1 % EDTA dialysiert und in diesem Puffer auf die Säule gebracht. Die DEAE Säule war zuvor nacheinander mit 1 %-iger NaOH-Lösung und Tris (0.025 M, pH 8.7) gewaschen. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Puffers betrug 10 bis 20 ml/St., das Volumen der Fraktionen 5 ml. Der Durchmesser der Säule betrug 1.5 cm, seine Höhe 30 cm, Temperatur 2 bis 4°, der Wasserdruck etwa 50 cm. Bei diesem Vorgehen stieg die spezifische Aktivität des Enzyms 3 bis 4 fach.

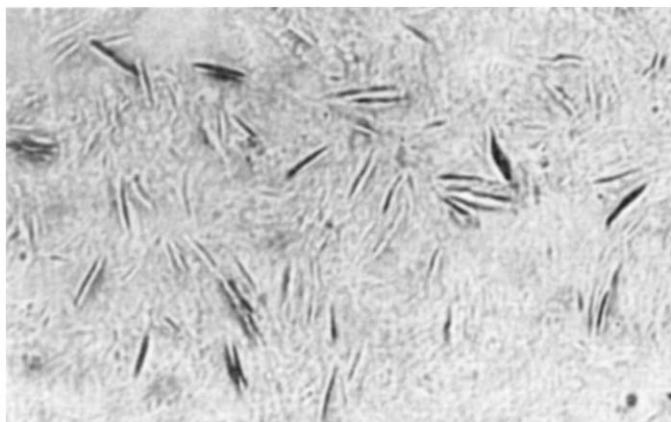


Fig. 2. Kristalle der  $20\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme, 375-fache Vergrösserung.

Die relativ niedrige Wechselzahl unseres Enzyms könnte dafür sprechen, dass die von uns eingesetzten  $20\beta$ -Keto-Steroide nicht das physiologische Substrat des Enzyms sind. Das eigentliche Substrat des "20β-Enzyms" in den Mikroorganismen könnte eine andere Substanz aus der Isopren-Reihe sein.

Ausser dem bereits beschriebenen chromatographischen Verhalten und der konstanten spezifischen Aktivität nach Rekristallisation wollen wir die Reinheit unseres Enzyms noch durch Hochspannungselektrophorese und Sedimentation in der

## TABELLE I

## AUSBEUTE UND WECHSELZAHL BEI DER REKRISTALLISATION

Das Enzym wurde in Glasrörchen, die unten spitz zugehen, kristallisiert. Die einzelnen Chargen haben wir hierfür in möglichst kleinem Volumen 0.1 %-igem EDTA (pH etwa 7.5) gelöst, sodass etwa eine 2 bis 4 %-ige Enzymlösung entstand. Diese wurde wie bereits beschrieben mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zur Kristallisation versetzt. Die Kristalle liessen sich bei etwa 3000 g abzentrifugieren.

	Ausbeute mg Protein	Wechselzahl*
DEAE-Fraktionen	23 mg	1,640
1. Kristallisation	14 mg	2,000
2. Kristallisation	10 mg	1,980
3. Kristallisation	7 mg	2,070

$$* = \frac{\text{Mole Cortison/Min reduziert}}{10^5 \text{ g Enzym}}$$

Ultrazentrifuge prüfen. Auch wird die Molekulargewichtbestimmung erst endgültige Aussagen über die Wechselzahl zulassen.

Einer der Autoren, H. J. HÜBENER, ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft für wertvolle Unterstützung der Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

*Institut für Vegetative Physiologie  
der Johann Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main*

H. J. HÜBENER  
F. G. SAHRHOLZ

*Biochemisches und Mikrobiologisches Laboratorium  
der Farbwerke Höchst, A.G., Frankfurt/Main  
(Deutschland)*

J. SCHMIDT-THOMÉ  
G. NESEMANN  
R. JUNK

- <sup>1</sup> H. J. HÜBENER UND C. O. LEHMANN, *Z. physiol. Chem.*, *Hoppe-Seyler's*, 313 (1958) 124.
- <sup>2</sup> F. LINDNER, R. JUNK, G. NESEMANN UND J. SCHMIDT-THOMÉ, *Z. physiol. Chem.*, *Hoppe-Seyler's*, 313 (1958) 117.
- <sup>3</sup> H. J. HOHORST, *Biochem. Z.*, 328 (1957) 509.
- <sup>4</sup> E. A. PETERSON UND H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.
- <sup>5</sup> G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZER, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT, UND G. PFLEIDERER, *Naturforscher*, 8b (1953) 555.

Eingegangen den 1. Juni 1959

### Countercurrent distribution of rat-liver, “soluble”-fraction ribonucleic acids

It has been reported<sup>1</sup> that the ribonucleic acids isolated from the soluble fraction of rat-liver homogenate can be fractionated by countercurrent distribution. These ribonucleic acids are of interest as acceptors of enzymically activated amino acids and are believed to take part in intermediate stages of protein synthesis. In this note we wish to report that countercurrent distribution for 250 transfers gives almost complete separation of the alanine-active ribonucleic acid from the tyrosine-active ribonucleic acid.