

STEROIDUMWANDELNDE ENZYME AUS MIKROORGANISMEN VI.—REINIGUNG EINER 4-EN-3-OXOSTEROID: (AKZEPTOR)-1-EN- OXIDOREDUKTASE AUS *NOCARDIA OPACA* DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

P. ATRAT, V. DEPPMEYER, A. GABERT, CH. FLEMMING und C. HÖRHOLD

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena, (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Taubeneck), Bereich Steroidforschung (Leiter: Prof. Dr. rer. nat. K. Schubert) und Institut für Technische Chemie, Leipzig (Direktor: Prof. Dr. sc. M. Ringpfeil)

(Received 17 December 1976)

SUMMARY

4-En-3-oxosteroid: (acceptor)-1-en-oxidoreductase (EC 1.3.99.4) from *Nocardia opaca* has been highly purified by affinity chromatography. The efficiency of the method could be increased by application of different techniques. The affinant was synthesized from N-(4-androsten-3-one-17 β -oxycarbonyl)-aminocaproic acid and aminohexyl-Sepharose by carbodiimid condensation yielding a ligand density of 2 μ mol per ml gel. Biospecific binding was proved on this matrix. The common affinity chromatography brought mainly S.A. of about 7,000 μ mol/min·mg. In the presence of 2 M ammonium sulphate S.A. of the collected active fractions was about 9,000 μ mol/min·mg. Combination of hydrophobic chromatography on amino-alkyl-Sepharoses and affinity chromatography increased S.A. up to 20,000 μ mol/min·mg. Thus, in relation to the crude extract purification was about 500-fold. Recovery of enzyme activity was nearly 100% in all cases.

EINLEITUNG

Die Technik der biospezifischen Adsorption erwies sich auch zur Reinigung von steroidbindenden und steroidtransformierenden Proteinen als eine außerordentlich leistungsfähige Methode [1]. So gelang es, Steroidrezeptoren auf das mehr als 10,000 fache anzureichern [2-7]. Steroidtransformierende Enzyme, wie die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus menschlicher Plazenta [8-10], 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Rattenlebermikrosomen [11] und *Pseudomonas testosteroni* [12] und die 5-En-3-oxosteroidisomerase aus *Pseudomonas testosteroni* [1] konnten mit Hilfe der Affinitätschromatographie z. T. beträchtlich angereichert werden. Auf Grund der relativ niedrigen Steroid-Proteinbindungskonstanten von steroidtransformierenden Enzymen (10^6 - 10^4 l/mol), beträgt jedoch der in einem Schritt erzielbare Anreicherungsgrad in den meisten Fällen weniger als 100. Im Vergleich hierzu liegen die Konstanten für Steroidrezeptoren über 10^9 l/mol.

Die 4-En-3-oxosteroid: (Akzeptor)-1-en-Oxidoreduktase EC 1.3.99.4 (Steroid-1-Dehydrogenase) ist seit etwa 1959 Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Das Enzym, das in verschiedenen Gattungen von Bakterien und Pilzen nachgewiesen wurde [13-18], ist bisher mit aufwendigen Verfahren, die gleichzeitig mit erheblichen Aktivitätsverlusten verbunden waren, angereichert worden. Kürzlich gelang es uns in Zusammenarbeit mit Lestrovaja [17], dieses Enzym

aus *N. opaca* durch Kombination mehrerer klassischer Reinigungsoperationen auf eine bisher noch nicht beschriebene spezifische Aktivität von 5474 μ mol/min·mg mit 38%iger Ausbeute anzureichern. Durch Anwendung der Affinitätschromatographie erzielten wir eine S. A. von 7000 μ mol/min·mg für 90% des eluierten Enzyms [19].

Die vorliegende Arbeit beschreibt weiterführende Untersuchungen zur affinitätschromatographischen Reinigung der Steroid-1-Dehydrogenase aus *N. opaca* durch Vorreinigung des verwendeten Extraktes sowie durch die Anwendung von Zusätzen unterschiedlicher Ammoniumsulfatmengen. Außerdem wird über den Einfluß des Aminoalkylspacers und einer Kombination von Hydrophob- und Affinitätschromatographie zur Erhöhung der Effektivität und Leistungsfähigkeit der Methode berichtet.

MATERIAL UND METHODEN

Beschreibung der Ammoniumsulfatpräparation. Die Präparation des Enzyms aus *N. opaca* (IMET 7030) ist an anderer Stelle beschrieben [17]. Nach einer Induktion mit 17 α -Methyltestosteron erfolgte ein Ultraschallaufschluß in 0,01 M Phosphatpuffer pH 8, dessen 10,000 g Überstand den zellfreien Rohextrakt darstellte. Nach einer Nucleinsäurefällung mit 1% Streptomycininsulfat erfolgte die fraktionierte Proteinfällung mit Ammoniumsulfat. Das zwischen 30 und 65%iger Sättigung anfallende Präzipitat wurde

in 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0 mit 20% Glyzerin aufgenommen (Proteinkonzentration etwa 7 mg/ml). Da noch 3,4–3,8% Ammoniumsulfat sowie mit Hilfe der Gaschromatographie 24 µg/ml 17 α -Methyltestosteron und 40 µg/ml 1-Dehydromethyltestosteron aufgefunden wurden, schloß sich eine Dialyse gegen den gleichen Puffer an. Nach 24 h bei +4 waren weder Ammoniumsulfat noch Steroide nachweisbar.

Bestimmung der Enzymaktivität. Die Extinktionsänderung des Akzeptors 2,6-Dichlorphenolindophenol wurde spektralphotometrisch bei 600 nm ermittelt. Unter Annahme eines stöchiometrischen Umsatzes von Akzeptor und Steroid wurde die Extinktionsänderung während 1 min. extrapoliert auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, zur Berechnung der Umsatzrate verwendet. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von 2,6-Dichlorphenolindophenol ($21,8 \cdot 10^3$ l/mol·cm, 20, pH 9,0, Pyrophosphat-HCl-Puffer) wurde für die Berechnung der Aktivität folgende Beziehung zugrunde gelegt: $A = E \cdot 46$ (µmol 4-Androsten-3,17-dion/min). Der Meßansatz enthielt: 0,5 µmol 4-Androsten-3,17-dion und 0,05 µmol 2,6-Dichlorphenolindophenol in 2 ml 0,01 M Pyrophosphat-HCl-Puffer pH 9,0. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Enzymlösung gestartet. Die spektralphotometrische Registrierung setzte nach einer Durchmischung 10 s später ein.

Proteinbestimmung. Die Proteinkonzentrationen wurden aus der Differenz der Extinktionen bei 215 und 225 nm nach Waddell und Hill[20] berechnet.

Synthese von N-(4-androsten-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ω -aminocapronsäure. Testosteronchlorkohlensäureester wurde nach Miescher *et al.*[21] durch Umsetzung von Testosteron, das in absolutem Tetrahydrofuran suspendiert war, mit einer 25%igen Lösung von Phosgen in Benzol erhalten. Das aus Hexan umkristallisierte Reaktionsprodukt wurde zur weiteren Synthese eingesetzt.

Eine Lösung von 3 g Testosteronchlorkohlensäureester in 10–12 ml Aceton wurde langsam unter Röhren zu einer Lösung von 2,5 g ω -Aminocapronsäure in 15 ml 2 M Natronlauge zugetropft. Nach einstündigem Röhren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert. Dabei fiel die Hauptmenge des Produktes aus. Es erfolgte eine dreimalige Extraktion mit je 100 ml Chloroform. Die vereinigten Extrakte wurden dreimal mit je 100 ml einer 1 M Natriumkarbonatlösung ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit halbkonzentrierter Salzsäure erfolgte abermals eine Extraktion mit Chloroform. Die weitere Reinigung des eingeengten Chloroformextraktes wurde mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie (20 × 100 cm; 1 mm Schichtdicke; Kieselgel Merck GF₂₅₄, Typ 60) im System Benzol–Dioxan–Eisessig (75:20:5, v/v/v) vorgenommen.

Zum Abschluß wurde das Produkt noch dreimal aus Aceton–Äther umkristallisiert.

Ausbeute an gereinigtem Produkt: 2,8 g (75% der Theorie).

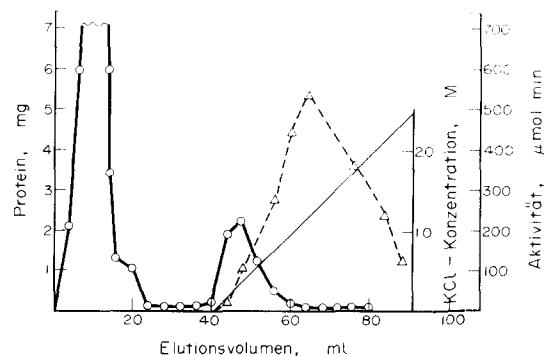


Abb. 1. Affinitätschromatographie eines Steroid-1-Dehydrogenase-Extraktes. Auf die Affinitätssäule (10 × 40 mm; 3,0 ml Gel) wurde eine Ammoniumsulfatpräparation (30 mg Protein/4 ml 0,01 M Phosphatpuffer mit 20% Glyzerin, pH 8) gegeben; $T = 4^\circ$; Aktivität: 3000 µmol Androstendion/min. (○ ○): Protein (△ △): Aktivität. Vergleiche Tab. 1.

Charakterisierung des Produktes. Schmelzpunkt: 142–143° $[\alpha]_D^{25} = +93,5$ (Chloroform) Elementaranalyse:

[%]	C	H	N
berechnet:	70,10	8,81	3,14
gefunden:	70,25	8,84	3,06

Dünnschichtchromatographie (Kieselgel Merck GF₂₅₄, Typ 60, Schichtdicke 0,25 mm): Benzol–Methyläthylketon–Äthanol–Wasser (15:15:15:5, v/v/v/v), $R_F = 0,7$ Benzol–Dioxan–Eisessig (75:20:2, v/v/v), $R_F = 0,37$.

Massenspektrum: [m/e] 445,3007 $C_{26}H_{39}NO_5$ (M^-) 288,2107 $C_{19}H_{27}O_2$ ($M - C_7H_{11}NO_3$)—Abspaltung der Seitengruppe am 17 β -O mit Annahme einer Protonenübertragung, 247,2036 $C_{18}H_{24}O$ ($M - C_8H_{14}NO_4$)—Abspaltung der Seitengruppe einschließlich des 17 β -O sowie einer Methylgruppe mit Annahme einer Protonenübertragung.

NMR:

	ppm
CH ₃ -18	0,82 (s)
CH ₃ -19	1,19 (s)
N-CH ₂	3,23
H-4	5,75 (s)
N-H	8,95
H-17 α	4,61 (m)
—CH ₂ -C—	2,35 (m)

O

Kupplung von aliphatischen Diaminen an BrCN-aktivierte Sepharose. Zur Herstellung der Aminoalkylsepharosen modifizierten wir die von Cuatrecasas und Anfinsen[22] angegebene Vorschrift: 150 ml Sepharose-4B wurden mit 125 ml Wasser versetzt und auf +4° abgekühlt. Bei einem pH-Wert von 11,5 (eingestellt mit 8 M Natronlauge) erfolgte unter Röhren die Zugabe einer Lösung von 15 g Bromcyan in 25 ml peroxidfreiem Dioxan. Während der Reaktionszeit von 15 min wurde der pH-Wert mittels 8 M Natron-

lauge zwischen 11 und 12 gehalten. Nach dem Waschen der aktivierten Sepharose mit gekühltem Wasser wurden folgende Umsetzungen mit den Diaminen 24 h bei Raumtemperatur vorgenommen:

pharose (a): 8,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$, (b): 5,5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$, Aminododecylsepharose: 8,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

Ausgehend von der Aminohexylsepharose (b) konnte aus der Differenz der Aminogruppenkonzen-

BrCN-aktivierte Sepharose 4 B	Diamin	Puffer ⁽¹⁾
30 ml	5,7 g Äthylendiamin	50 ml Boratpuffer pH 9,5; 0,1 M
30 ml	9,0 g Hexamethylenediamin	50 ml Boratpuffer pH 9,5; 0,1 M
30 ml	12,0 g Dodecamethylenediamin	50 ml 0,1 M Borat-puffer pH 9,5/DMF (3:1), v/v

⁽¹⁾ Einstellung des pH-Wertes nach Lösung der Diamine mit konzentrierter Salzsäure.

Die erhaltenen Aminoalkylsepharosen wurden mit je 1,5/0,1 M Boratpuffer pH 9,5 und 0,1 M Acetatpuffer pH 4,5 gewaschen. Bei der letzten Waschung waren die Puffer 1 M an Natriumchlorid. Mit Wasser wurden die Gele neutral gewaschen.

Präparation des Affinanten *N*-(4-androsten-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ω -aminocaproylaminoxyethyl-Sepharose. Zu 10 g Aminohexylsepharose wurde eine Lösung von 120 mg *N*-(4-androsten-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ω -aminocapronsäure und 500 mg 1-Äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid·HCl in 10 ml DMF/Wasser (8:3, v/v) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 4,8 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Waschung mit DMF/Wasser (8:3, v/v), bis kein Steroid mehr im Waschwasser festzustellen war. Zum Schluß wurde gründlich mit Wasser nachgewaschen.

Bestimmung der Liganden-dichte. Die Ermittlung der Ligandenkonzentration erfolgte in Anlehnung an Failla und Santi[23] über die Bestimmung der primären Aminogruppen mit Hilfe von Trinitrobenzolsulfosäure (TNBS): 0,2 ml des sedimentierten Gels wurden in 10 ml 0,1 M Boratpuffer pH 9,0 aufgeschlemmt und mit 15 mg TNBS versetzt. Nach zweistündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis in der wäßrigen Phase keine Absorption bei 340 nm mehr zu beobachten war. Weder die von Failla und Santi[23] beschriebene Methode zur Lösung des Gels durch Behandlung mit 75%iger Essigsäure bei 75° noch die Methode von Sharma und Slaunwhite[24] (Kochen mit Eisessig) brachten befriedigende Ergebnisse. Wir wendeten deshalb die von Rosengren *et al.*[25] angegebene Behandlung mit 85%iger Ameisensäure an. Das Gel konnte so bei etwa 90° in sehr kurzer Zeit vollständig in Lösung gebracht werden.

Die Bestimmung der Aminogruppenkonzentration erfolgte aus der Extinktion bei 340 nm ($\epsilon = 1,4 \cdot 10^4 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$). Es konnten folgende Aminogruppenkonzentrationen ermittelt werden:

Aminoäthylsepharose: 4,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$, Aminohexylse-

pharose vor und nach der Carbodiimidkupplung eine Steroidligandenkonzentration von 2,0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ bestimmt werden.

Chromatographie der Ammoniumsulfatpräparation an Sephadex G-200. Eine Säule aus Sephadex G-200 (20 × 500 mm; 120 ml Bettvolumen) wurde mit einem 0,01 M Phosphatpuffer pH 8, der 20% Glyzerin enthielt, eingestellt. Zur Fraktionierung der Ammoniumsulfatpräparation erwies sich eine Laufgeschwindigkeit von ca. 0,2 ml/min als geeignet, wobei 5 ml-Fraktionen gesammelt wurden. Die Arbeitstemperatur betrug 4°.

Chromatographie der Ammoniumsulfatpräparation an Aminoalkylsepharosen und Affinitätschromatographie. Sowohl zur Affinitätschromatographie als auch zur Chromatographie an Aminoalkylsepharosen verwendeten wir Säulen mit dem Ausmaß 10 mm × 40 mm (Bettvolumen 3,0 ml). Sie wurden mit dem glyzerinhaltigen 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0 eingestellt. Eine Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min erwies sich ebenfalls als geeignet. Das Volumen der bei 4° gesammelten Fraktionen betrug 3 ml.

ERGEBNISSE

Affinitätschromatographie einer Ammoniumsulfatpräparation

Auf die beschriebene Affinitätsäule wurden 30 mg Protein in 6 ml Phosphatpuffer, der 20% Glyzerin enthält, bei 4° aufgegeben. Die Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität wurde unter diesen Bedingungen vollständig vom Affinanten gebunden und ließ sich durch Anlegen eines KCl-Gradienten 100%ig eluieren. Abbildung 1 gibt den Verlauf der Chromatographie wieder. Für etwa 75–80% des eluierten Enzyms (vereinigte Fraktionen der höchsten spezifischen Aktivität) konnte eine S. A. von 7000 μmol 4-Androsten-3,17-dion/min·mg erreicht werden, was einer 70-fachen Anreicherung in bezug auf den zellfreien Rohextrakt entspricht. In Tabelle 1 sind die Bilanzen dieser Reinigungsprozedur angegeben.

Tabelle 1. Bilanzen zur affinitätschromatographischen Anreicherung der Steroid-1-Dehydrogenase aus der Ammoniumsulfatpräparation von *Nocardia opaca*

Ausgangsmaterial			nach Passage der Affinitätssäule				
Protein (mg)	S.A. [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	Volumen (ml)	S.A. [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$] (für 75% der eluierten Akt.)	Anreicherungsfaktor (a) für Affinitätschromatographie (b) in bezug auf zellfreien Rohextrakt	eluierbare Akt. [%]	Protein [mg] (75% d. Aktiv.)	
30	100	6	7000	(a) 70 (b) 140	100	0.4	

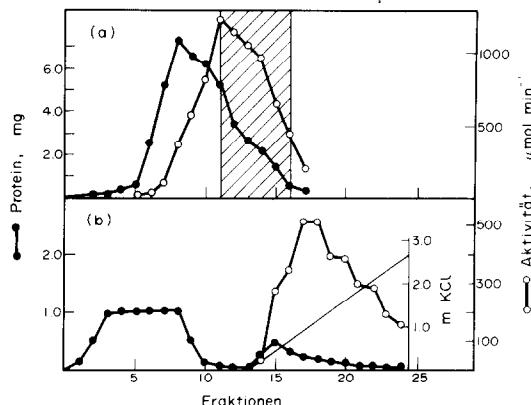


Abb. 2. Einfluß der gelchromatographischen Vorreinigung eines Steroid-1-Dehydrogenase-Extraktes auf den Reinigungseffekt der Affinitätschromatographie. (a) Gelchromatographie an Sephadex G-200. Verwendet wurde eine Ammoniumsulfatpräparation: 50 mg Protein/4 ml 0.01 M Phosphatpuffer mit 20% Glyzerin, pH 8. (b) Affinitätschromatographie. Die vereinigten Fraktionen 11-16 der Gelchromatographie wurden eingesetzt. Vergleiche Tab. 2.

Tabelle 2. Affinitätschromatographie einer Ammoniumsulfatfällung in Gegenwart unterschiedlicher Ammoniumsulfatkonzentrationen sowie nach Vorreinigung an Sephadex G-200

	Dialysierte Ammoniumsulfatpräparation	0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	nach Sephadex G-200
Eingesetzter Extrakt:				
S.A. [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	177	202	304	485
Protein [mg]	16,25	15,3	15,42	10,4
S.A. nach Affinitätschromatographie [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]				
(a) für Gesamtaktivität	525	1047	2689	2220
(b) für Hauptfraktionen (75%)	6014	7632	8785	7000
Reinigungseffekt für (a)	3,0	5,2	8,8	4,5
(b)	34,0	37,8	28,9	14,4
Aktivitätsausbeute (%)	98	97	98	100
Mit KCl eluierbares Protein (%)	44,7	22,3	12,9	21,6
Bindungsstärke [M KCl]:				
Begleitprotein	0,25	0,3	0,18	0,3
Steroid-1-Dehydrogenase	1,6	1,2	1,05	1,1

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, wird durch Anlegen eines KCl-Gradienten die Hauptmenge des unspezifisch gebundenen Proteins bereits bei einer KCl-Konzentration von etwa 0,3 M desorbiert, die Steroid-1-Dehydrogenase dagegen erst bei 1,1 M. Der Anteil des unspezifisch gebundenen Materials beträgt in bezug auf das gesamte eingesetzte Protein etwa 20%.

Die für diese Versuche eingesetzte Säule liefert bei mehrfacher Verwendung gut reproduzierbare Trennungen. So wurden z. B. bei zehnfacher Wiederverwendung des gleichen Gels praktisch identische Trennergebnisse erhalten. Diese Konstanz der Affinitätsäule ließ sich bei der Verwendung eines neupräparierten Affinanten jeweils nach den ersten 3-4 Läufen beobachten. Ein "Ausbluten" des Steroidliganden war nicht feststellbar.

Es ist offensichtlich, daß der erzielbare Anreicherungsgrad stark durch das ebenfalls mit KCl eluierbare Begleitprotein beeinflußt wird. Die folgenden Untersuchungen waren darauf gerichtet, den Anteil des

Proteins, der zwar an der Affinitätssäule gebunden wird, aber enzymatisch inaktiv ist, vor der Affinitätschromatographie zu entfernen.

Vorreinigung einer Ammoniumsulfatpräparation durch Chromatographie an Sephadex G-200

Zur Vorreinigung einer Ammoniumsulfatpräparation wurden 50 mg Protein an einer Sephadex G-200 Säule in glyzerinhaltigem Phosphatpuffer chromatographiert. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, daß nur die Fraktionen hoher spezifischer Aktivität für die Affinitätschromatographie verwendet wurden. Diese Fraktionen besitzen im Vergleich zur eingesetzten Ammoniumsulfatpräparation eine dreimal höhere spezifische Aktivität. Nach der Affinitätschromatographie wurden die Fraktionen mit hoher spezifischer Aktivität abermals vereinigt und ergaben zusammen eine spezifische Aktivität von $7000 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$. Die damit erfaßte Aktivität entspricht 75% der eingesetzten. Der Anteil des eluierbaren Begleitproteins betrug 20% (vgl. Tabelle 2).

Es kann somit festgestellt werden, daß eine Vorreinigung an Sephadex G-200 keine Erhöhung des Reinigungseffektes im anschließenden Schritt der Affinitätschromatographie bewirkt, d. h., die hier vorgenommene Kombination ergab keine Verminderung des ebenfalls mit KCl eluierbaren Anteils an inaktivem Begleitprotein.

Einfluß von Ammoniumsulfat auf den Verlauf der Affinitätschromatographie

Im Sinne einer Kombination von biospezifischer Adsorption und der durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bewirkten Aussalzung wurde in einer weiteren Versuchsserie der

Einfluß unterschiedlicher Ammoniumsulfatkonzentrationen untersucht. Die Ammoniumsulfatfraktion wurde, um noch vorhandene Reste an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Steroiden zu entfernen, zunächst dialysiert. Unter gleichen Bedingungen wurde das dialysierte Material ohne und mit Zusatz von Ammoniumsulfat (7,5-Gew.% = 0,5 M und 22-Gew.% = 2 M) einer Affinitätschromatographie unterzogen. Wie die Ergebnisse zeigen (Abb. 3, Tab. 2), ist der Anteil des mit KCl eluierbaren Begleitproteins stark abhängig von der Ammoniumsulfatkonzentration. Beim Aufgeben des ammoniumsulfatfreien Materials werden fast 50% des Proteins gebunden und mit KCl eluiert. Im Falle der höchsten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration (22-Gew.%) sind es dagegen nur 13%. Wie zu erwarten, resultiert damit im letzten Falle eine Erhöhung der spezifischen Aktivität von 7000 auf $8800 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$.

Einfluß des Spacers auf die Proteinbindung

Das affinitätschromatographische Verhalten eines Gels wird nicht nur durch den Liganden, sondern auch durch den zwischen Matrix und Ligand existierenden Spacer beeinflußt. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei chemische Natur und Ausdehnung [26-28].

Um den Einfluß des Spacers auf die Proteinbindung zu untersuchen, wurden unter gleichen Bedingungen Ammoniumsulfatpräparationen an Säulen aus Aminoäthyl-, Aminohexyl- und Aminododecylsepharose, d. h. an Sepharoseträgern ohne Steroidliganden mit Spacern unterschiedlicher Kettenlänge, chromatographiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und Tabelle 3 zusammengestellt.

In allen Fällen binden die ligandenfreien Aminoalkylsepharosen Protein, das mit KCl eluierbar ist. Die gebundene Proteinmenge ist abhängig von der Anzahl der im Spacermolekül vorhandenen Methylengruppen. So können sowohl bei der Aminohexyl- als auch bei der Aminododecylsepharose nach der Säulenpassage mehr als 50% des gesamten aufgegebenen Proteins mit dem KCl-Gradienten eluiert werden.

Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität wird unter diesen Bedingungen von der Aminoäthyl- und der Aminododecylsepharose nicht oder nur sehr geringfügig gebunden. Im Falle der Aminohexylsepharose ist dagegen festzustellen, daß 10% der eingesetzten Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität am Träger gebunden werden. Bei diesem Träger ist auch die höchste Bindungsstärke für das inaktive Begleitprotein (0,8 M KCl) festzustellen. Für Aminoäthyl- und Aminododecylsepharose liegen diese Werte bei 0,4 M KCl. Das mit dieser Methode aus der Ammoniumsulfatfraktion erfolgte "Herausfiltern" von Proteinen hat einen, wenn auch nur geringfügigen, Anreicherungseffekt in bezug auf die Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität zur Folge. So ist mit Hilfe der Aminododecylsepharose eine 2,4 fache Anreicherung zu beobachten.

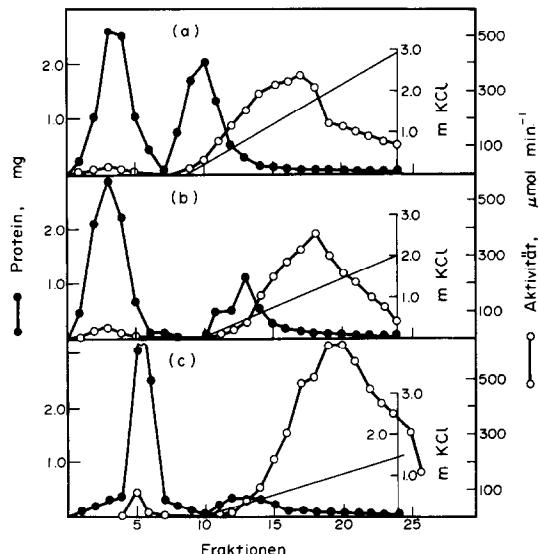


Abb. 3. Affinitätschromatographie in Gegenwart unterschiedlicher Ammoniumsulfatkonzentrationen. Als Enzymextrakt wurde eine Ammoniumsulfatpräparation mit 16 mg Protein/2,5 ml Puffer benutzt: (a) Enzymextrakt ohne Ammoniumsulfat (nach Dialyse). (b) Enzymextrakt 0,5 M Ammoniumsulfat. (c) Enzymextrakt 2,0 M Ammoniumsulfat Vergleiche Tab. 2.

Tabelle 3. Kombination von Chromatographie an Aminoalkylsepharosen und Affinitätschromatographie zur Reinigung eines Steroid-1-Dehydrogenase-Extraktes

Chromatographie an Aminoalkylsepharosen (Säule: 10 × 40 mm)	a Seph.-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	b Seph.-NH-(CH ₂) ₆ -NH ₂	c Seph.-NH-(CH ₂) ₁₂ -NH ₂
<i>Eingesetzte Ammoniumsulfatpräparation:</i>			
S.A. [μmol/min·mg]	189	181	97
Protein [mg]	16,0	25,4	25,0
<i>Nicht gebundenes Material:</i>			
S.A. [μmol/min·mg]	203	356	235
Reinigungseffekt	1,07	1,96	2,4
Protein [%]	86	45	42
Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität [%]	100	90	98
<i>Bindungsstärke [M KCl]:</i>			
gebundenes Begleitprotein	0,4	0,8	0,4
gebundene Steroid-1-Dehydrogenase	—	0,2	0,4
<i>Affinitätschromatographie</i>			
d			
Aktivitätsausbeute [%]	97	97	92
<i>Eluierbares Protein [%]:</i>			
bezogen auf eingesetztes Protein (a–c)	21,9	6,0	2,6
<i>Bindungsstärke [M KCl]:</i>			
Begleitprotein	0,3	0,3	0,3
Steroid-1-Dehydrogenase	1,0	1,2	1,57
<i>Spez. Aktivität [μmol/min·mg]:</i>			
(a) für Gesamtaktivität	635	1471	2679
(b) für Hauptfraktionen (75%)	6870	13600	20000
<i>Reinigungseffekt:</i>			
(a)	3,1	4,1	11,4
(b)	33,8	38,2	85
Gesamtreinigungseffekt (a/d, b/e, c/f)	37	75	200

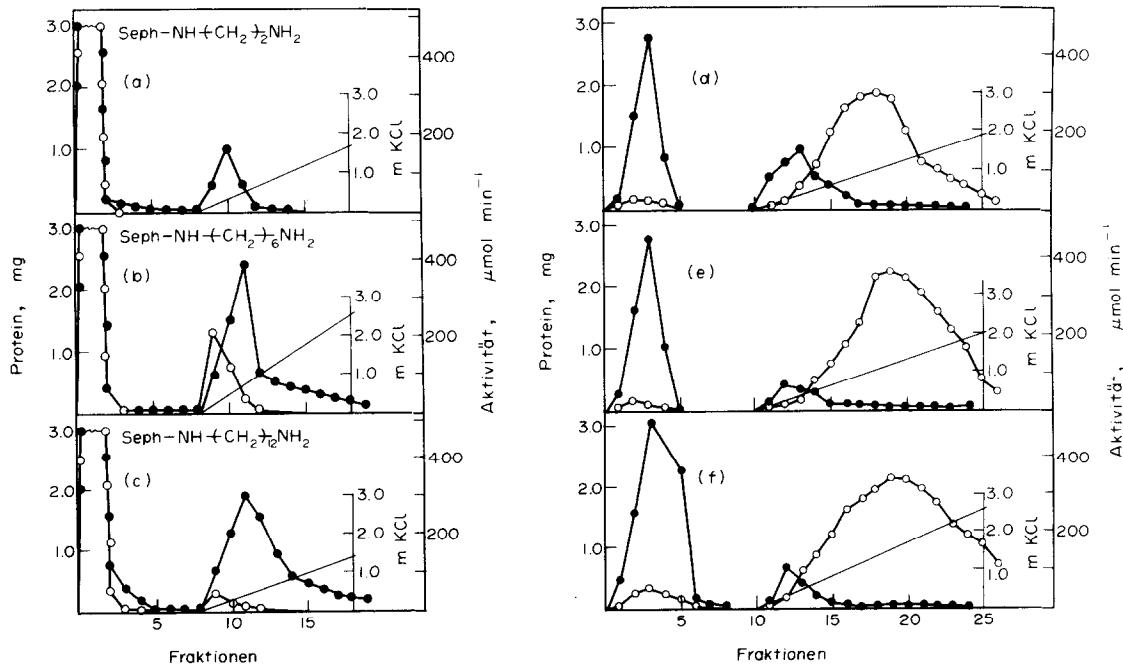


Abb. 4. Chromatographie eines Steroid-1-Dehydrogenase-Extraktes (Ammoniumsulfatpräparation) an Aminoalkylsepharosen (a–c) und anschließend Affinitätschromatographie (d–f) des nicht an die Aminoalkylsepharosen gebundenen Proteinanteils des Enzymextraktes. Kombinationen a/d, b/e, c/f. Vergleiche Tab. 3.

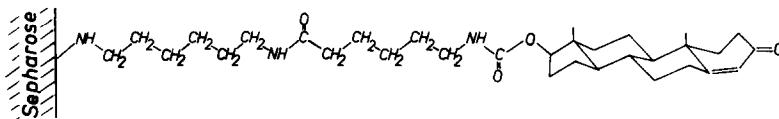


Abb. 5. Ideale Struktur des verwendeten Affinanten

Kombination von Chromatographie an Aminoalkylsepharosen und Affinitätschromatographie

Mit der Chromatographie an Aminoalkylsepharosen wurde bewiesen, daß für die Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase am Affinanten der Steroidligand verantwortlich ist, also eine biospezifische Adsorption vorliegt. Um den Einfluß der Entfernung von inaktivem Begleitprotein auf das Ergebnis der Affinitätschromatographie zu untersuchen, wurde die Affinitätsäule mit Material beschickt, das nach der Passage des Enzymextraktes durch eine Aminoalkylsepharoseäule erhalten wurde. Die Ergebnisse sind als Kombinationen a/d, b/e und c/f in Abbildung 4 dargestellt. Eine Kombination von Chromatographie an Aminododecylsepharose und Affinitätschromatographie (Kombination c/f) ergibt, daß nur noch 2,6% Protein in bezug auf den Gesamteinsatz bei praktisch 100%iger Enzymausbeute eluiert werden. Dieses hat einen großen Einfluß auf die weitere Erhöhung der spezifischen Aktivität des angereicherten Enzyms. So kann im letzten Falle für 75% der gesamten eluierten Aktivität eine spezifische Aktivität von mehr als 20,000 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ erreicht werden, was einer 100-fachen Anreicherung im Schritt der Affinitätschromatographie bzw. einem Reinigungsgrad von mehr als 500 in bezug auf den aellfreien Rohextrakt entspricht.

DISKUSSION

Bei den Untersuchungen zur affinitätschromatographischen Reinigung einer Steroid-1-Dehydrogenase aus *Nocardia opaca* wurde nachgewiesen, daß die Bindung dieses Enzyms am Affinanten im Sinne einer biospezifischen Adsorption erfolgt. Sowohl die verwendete Spacerlänge von 20 Å als auch die am Steroid gewählte Kupplungsposition (Abbildung 5) ermöglichen damit die Ausbildung eines Enzym-Substratkomplexes an der Matrix.

Entscheidenden Einfluß auf den Effekt der affinitätschromatographischen Reinigung besitzt die Bindung von inaktivem Begleitprotein am Affinanten. Eine der eigentlichen Affinitätschromatographie vorgeschaltete Hydrophobchromatographie an Aminoalkylsepharosen gewährleistet eine weitgehende vorherige Abtrennung dieser Proteine. Die Menge des in der Affinitätschromatographie mit KCl eluierbaren inaktiven Begleitproteins ist danach um so geringer, je mehr vorher an der Aminoalkylsepharose zurückgehalten wurde. Daraus läßt sich wiederum schlüßfolgern, daß in beiden Fällen die Bindung die gleiche Ursache haben muß. Die hier beschriebene Kombination von Hydrophob- und Affinitätschromatographie

stellt damit eine Weiterentwicklung dieser Arbeitstechnik, insbesondere in bezug auf die Reinigung der Steroid-1-Dehydrogenase dar.

LITERATUR

1. Benson A. M., Suruda A. J., Barrack E. R. and Talalay P.: In *Methods in Enzymology* (Edited by William B. Jakoby and Meir Wilchek). Academic Press, New York, San Francisco and London, Vol. 34 (1974) p. 557.
 2. Rosner W. and Bradlow H. L.: *J. clin. Endocr. Metab.* **33** (1971) 193-198.
 3. Truong H., Geynet C., Millet C., Soulignac O., Bucourt R., Vignau M., Torelli V. and Baulieu E. E.: *FEBS Lett.* **35** (1973) 289-294.
 4. Kuhn R. W., Schrader W. T., Smith R. G. and O'Malley B. W.: *J. biol. Chem.* **250** (1975) 4220-4228.
 5. Smith R. G., Iramain C. A., Buttram Jr. V. C. and O'Malley B. W.: *Nature (Lond.)* **253** (1975) 271-272.
 6. Sica V., Parikh I., Nola E., Puca G. A. and Cuatrecasas P.: *J. biol. Chem.* **248** (1973) 6543-6558.
 7. Failla D., Tomkins G. M. and Santi D. V.: *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **72** (1975) 3849-3852.
 8. Nicolas J. C., Pons M., Descomps B., Crastes de Paulet A.: *FEBS Lett.* **23** (1972) 175-179.
 9. Nicolas J. C.: In *Methods in Enzymology* (Edited by William B. Jakoby and Meir Wilchek). Academic Press, New York, San Francisco and London, Vol. 34 (1974) p. 555.
 10. Chang-Chen, Chin and Warren J. C.: *Steroids* **22** (1973) 373-378.
 11. Golf S. W., Graef V. und Nowotny E.: *Z. physiol. Chem.* **357** (1976) 35-40.
 12. Aukrust L. E., Norum K. R. and Skalhegg B. A.: *Biochim. biophys. Acta* **438** (1976) 13-22.
 13. Sih J. Ch. and Bennett E. R.: *Biochim. biophys. Acta* **56** (1962) 584-592.
 14. Penassee L. and Peyre M.: *Steroids* **12** (1968) 525-544.
 15. Penassee L. and Nomine G.: *Eur. J. Biochem.* **47** (1974) 555-559.
 16. Lestrovaja N. N.: *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol.* **5** (1973) 755-759.
 17. Lestrovaja N. N., Dähnhardt S. und Hörhold C.: *Z. Allg. Mikrobiologie*, (1977).
 18. Levy R. H. and Talalay P.: *J. biol. Chem.* **234** (1959) 2014-2026.
 19. Hörhold C., Atrat P., Deppmeyer V., Gabert A., Flemming Ch. und Schubert K.: *Z. Allg. Mikrobiologie* **16** (1976) 559-561.
 20. Waddell W. J. and Hill Ch.: *J. Lab. and clin. Med.* **48** (1956) 311-314.
 21. Miescher K., Kägi H., Wettstein A. und Tschopp E.: *Biochem. Z.* **294** (1937) 39.
 22. Cuatrecasas P. and Anfinsen C. B.: In *Methods in Enzymology* (Edited by William B. Jakoby). Academic Press, New York and London, Vol. 22 (1971) p. 345.
 23. Failla D. and Santi V. S.: *Analyt. Biochem.* **52** (1973) 363-368.
 24. Sharma M. and Slaunwhite Jr. W. R.: *Analyt. Biochem.* **68** (1975) 76-86.
 25. Rosengren J., Pahlman S., Glad M. and Hjerten St.: *Biochim. biophys. Acta* **412** (1975) 51-61.

26. Shaltiel S.: In *Methods in Enzymology* (Edited by William B. Jakoby and Meir Wilchek). Academic Press, New York, San Francisco and London, Vol. 34 (1974) p. 126.
27. Lowe C. R. and Dean P. D. G.: In *Affinity Chromatography*. John Wiley, London (1974) p. 23 and p. 188.
28. Hofstee B. H. J.: In *Advances in Experimental Medicine* (Edited by R. Bruce Dunlap). Plenum Press, New York and London, Vol. 42 (1974) p. 43.