

SHORT COMMUNICATION

STEROIDUMWANDELNDE ENZYME AUS MIKROORGANISMEN—VII. UNTERSUCHUNGEN ZUR NATUR DER BIOSPEZIFISCHEN BINDUNG AN DER AFFINITÄTSMATRIX—AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE EINER 4-EN-3-OXO-STEROID: (AKZEPTOR)-1-EN-OXIDO- REDUKTASE AUS *NOCARDIA OPACA*

P. ATRAT, V. DEPPMEYER und C. HÖRHOOLD

Technische Assistenz: R. KNÖLL und L. MÖLLER

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

(Received 18 August 1977)

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Affinitätschromatographie einer 4-En-3-oxosteroid: (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase (Steroid-1-Dehydrogenase; EC 1.3.99.4) aus *Nocardia opaca* wurden zwei Affinanten verwendet, bei denen der Testosteronligand über verschiedene Spacer an die Matrix gebunden war. Zur Anwendung kamen Hexamethylen-diamin (Affinant 1) und Adipinsäuredihydrazid (Affinant 2). An beiden Affinanten wurde das Enzym biospezifisch gebunden. Beide Träger zeigten ein unterschiedliches Elutionsverhalten. Dabei konnte aus dem Einfluß von KCL und organischen Lösungsmitteln, wie Glycerin, Äthylenglykol und Dimethylformamid nachgewiesen werden, daß die biospezifische Bindung zwischen dem immobilisierten Testosteronliganden und der Steroid-1-Dehydrogenase hydrophoben Charakter trägt. Diese Wechselwirkung wird durch die Natur des Spacers und insbesondere durch die Art und Weise der Spacer-Matrix-Bindung bei konstanter Ligandendichte und Matrix-Ligand-Abstand beeinflußt.

SUMMARY

For affinity chromatography of the 4-en-3-oxosteroid: (acceptor)-1-en-oxidoreductase (EC 1.3.99.4) from *Nocardia opaca* were applied two affinants with different spacers between the immobilized testosterone ligand and matrix. Affinant 1 contains hexamethylenediamine and affinant 2 adipinic acid dihydrazide as the spacer. On both affinants the enzyme was bound biospecifically. These affinants show a different elution behaviour. From the effect of potassium chloride and such organic solvents as glycerol, ethyleneglycol and dimethylformamide the biospecific binding on the immobilized testosterone ligand was concluded to be hydrophobic. This interchange can be influenced by the nature of spacer and spacer-matrix-binding in the case of a given ligand density and a constant ligand-matrix distance.

EINLEITUNG

Seit einigen Jahren wird die Methode der biospezifischen Adsorption erfolgreich zur Reinigung und biochemischen Untersuchung von steroidtransformierenden Enzymen eingesetzt [1–6].

Bisher gibt es jedoch nur wenige klare Aussagen zur Natur der Bindung dieser Proteine an der Affinitätsmatrix und zur Natur der biospezifischen Bindung des Enzyms am immobilisierten Steroidliganden. Als Grund kann die Komplexität der Bindungsverhältnisse am Affinitätsträger [7, 8]—biospezifische Bindung am Liganden, ionische und hydrophobe Wechselwirkung am Spacer, an der Matrix, aber auch am Liganden—angesehen werden.

Im Schrifttum gibt es Hinweise zum hydrophoben Charakter der biospezifischen Wechselwirkung zwischen steroidtransformierendem Enzym und trägerfixiertem Steroidliganden [1, 2, 6].

Am Beispiel der biospezifischen Adsorption einer

4-En-3-oxosteroid: (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase (Steroid-1-Dehydrogenase, EC 1.3.99.4) aus *Nocardia opaca* an zwei ihrer Natur nach unterschiedlichen Affinitätsträgern und dem gezielten Einfluß auf den Desorptionsprozeß sollen Rückschlüsse auf die Natur der biospezifischen Bindung am immobilisierten Liganden gezogen werden.

MATERIAL UND METHODEN

Ammoniumsulfatpräparation der Steroid-1-Dehydrogenase

Die Präparation des Enzyms aus *Nocardia opaca* (IMET 7030) erfolgte nach dem bereits beschriebenen Verfahren [10].

Bestimmung der Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität

Die Enzymaktivität wurde aus der spektralphotometrischen Registrierung der Extinktionsänderung

des artifiziellen Akzeptors 2,6-Dichlorphenolindo-phenol bei 600 nm unter Verwendung von 4-Androsten-3,17-dion als Substrat bestimmt [6].

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden aus der Differenz der Extinktionen bei 215 und 225 nm nach Wadell und Hill [11] berechnet.

Präparation der Affinanten

1. *N*-(4-Androsten-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ϵ -aminocaproylamino-hexyl-Sepharose 4B (Affinant 1, Abb. 1). Dieser Affinant wurde aus Amino-hexyl-Sepharose 4B und *N*-(4-[14 C]-Androst-4-en-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ϵ -aminocapronsäure (930 d.p.m./ μ M) unter Verwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids synthetisiert [6].

2. *N*-(4-Androsten-3-on-17 β -oxycarbonyl)- ϵ -aminocaproyl-adipinsäuredihydrazido-Sepharose 4B (Affinant 2, Abb. 1). Die Synthese erfolgte in gleicher Weise wie die des Affinanten 1. An Stelle von Amino-hexyl-Sepharose wurde Adipinsäuredihydrazido-Sepharose in gleicher Menge eingesetzt [12].

Bestimmung der Ligandendichte

Die Bestimmung der Ligandendichte erfolgte aus der spezifischen Radioaktivität des Gels [12]. Danach konnte für beide Träger eine Ligandendichte von 4 μ Mol/ml Gel ermittelt werden.

Affinitätschromatographie der Ammoniumsulfatpräparation

Es wurden Affinitätssäulen vom Ausmaß 10 \times 40 mm (Gelvolumen 3 ml) verwendet. Nach dem Einstellen der Säulen mit 0,01 m Phosphatpuffer pH 8,0 wurde jeweils eine Ammoniumsulfatpräparation mit einer Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität von 3200 μ M min $^{-1}$ (32 mg Protein) in 10 ml des gleichen Puffers aufgegeben. Nach gründlichem Waschen mit etwa 10–15 Säulenvolumina Puffer erfolgte die Elution des Enzyms entweder im KCl-Gradienten, mit 20% Glycerin-Phosphatpuffer oder mit Phosphatpuffer, der 5% Dimethylformamid oder

30% Äthylenglykol enthielt. Bei 4°C wurden die Säulen mit einer Laufgeschwindigkeit von 12 ml/h betrieben, wobei das Volumen der gesammelten Fraktionen 3 ml betrug.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, daß es sich bei der Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase am immobilisierten Steroidliganden um eine echte biospezifische Adsorption handelt [6].

Unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen wird von beiden Affinanten praktisch die gesamte applizierte Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität gebunden.

Bei gleicher Ligandenkonzentration und vergleichbarer Ausdehnung des Spacers unterscheiden sich beide Affinanten lediglich in der Natur des Spacers.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2a-f zusammengestellt. Es lassen sich prinzipielle Unterschiede im Verhalten beider Affinitäts-träger feststellen:

So erweist sich KCl bei der Verwendung des Affinanten 1 mit Hexamethyldiamin als Spacer als notwendiger Bestandteil des Elutionspuffers. Eine Desorption der Steroid-1-Dehydrogenase erfolgt so bereits allein im KCl-Gradienten (Abb. 2a).

Werden apolare, wasserlösliche, organische Lösungsmittel dem KCl-haltigen Puffer zugesetzt, z.B. 20% Glycerin (Abb. 2b), wird eine erhebliche Verminderung des Elutionsvolumens beobachtet. In Gegenwart von 5% Dimethylformamid oder 30% Äthylenglykol wird eine spontane Elution beobachtet (Abb. 2c).

Ein anderes Verhalten zeigt der Affinant 2 mit Adipinsäuredihydrazid als Spacer. Zur Elution ist hier die Anwesenheit eines die Polarität des Puffersystems reduzierenden Agens essentiell. So kann die steroid-1-Dehydrogenase bereits mit einem Puffer, der 20% Glycerin, aber kein KCl enthält, eluiert werden (Abb. 2d).

Im Vergleich zur Anwendung von Phosphatpuffer, der 20% Glycerin enthält, vermindert sich auch hier

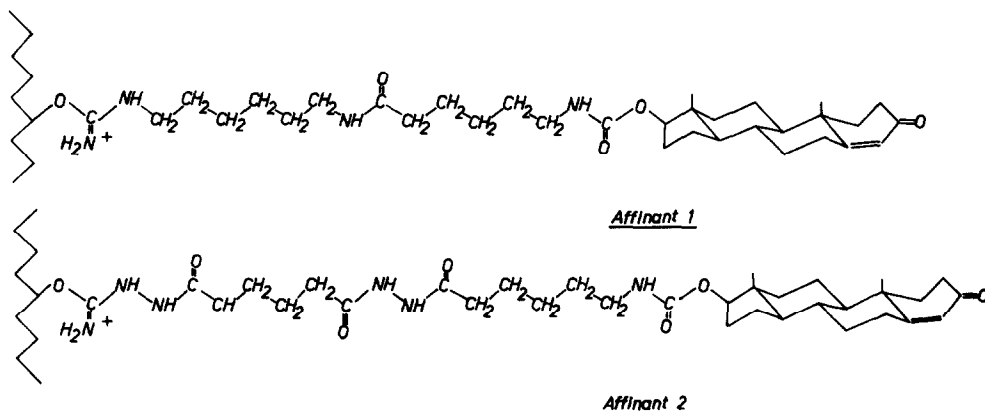


Abb. 1. Struktur der verwendeten Affinanten.

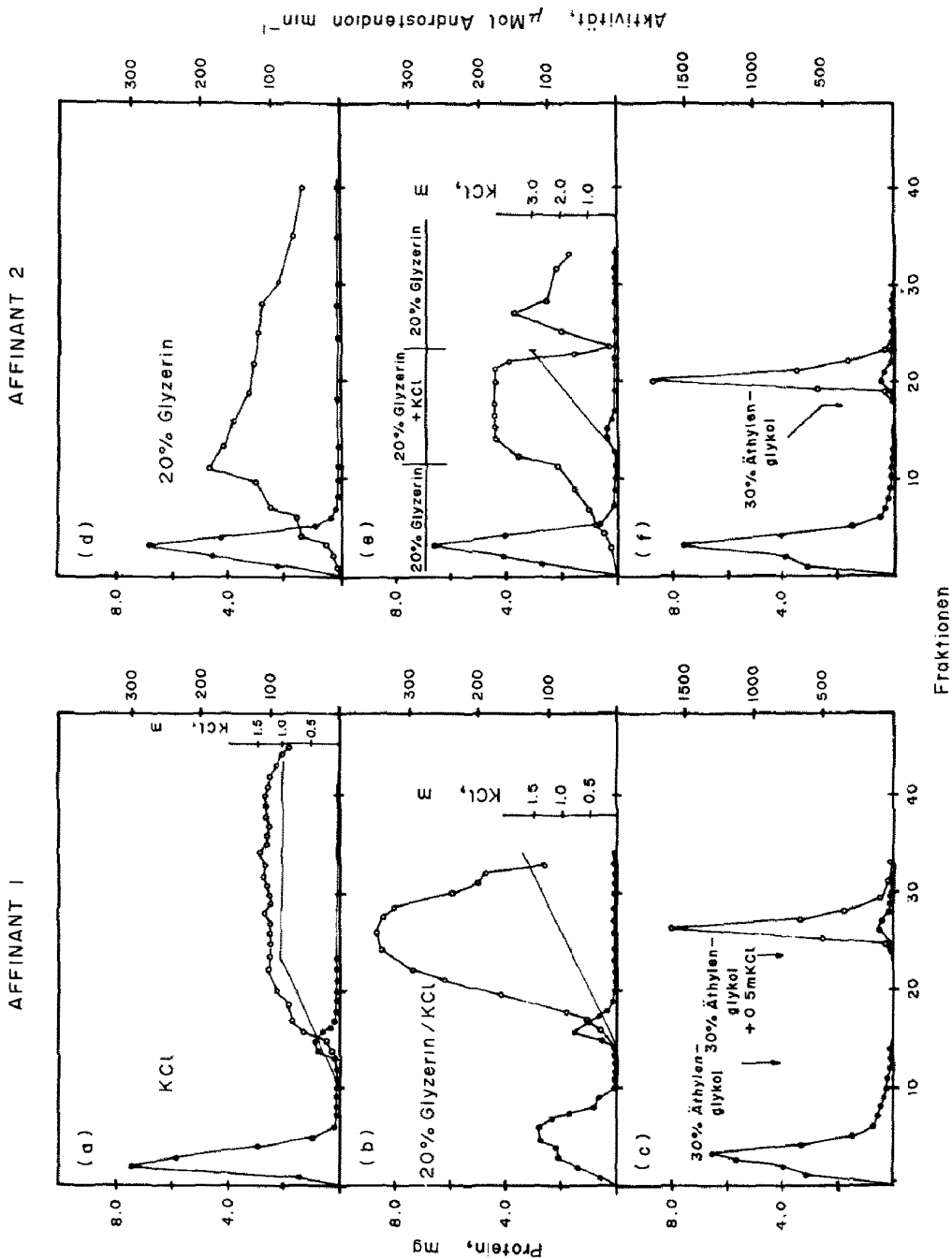


Abb. 2. Affinitätschromatographie einer Steroid-1-Dehydrogenase aus *Nocardia opaca* an zwei verschiedenen Affinanten (Abb. 1). Die Elution wurde unter folgenden Bedingungen vorgenommen: (a) KCl-Gradient, (b) KCl-Gradient; 20% Glycerin, (c) 0.5 M KCl; 30% Äthylenglykol, (d) 20% Glycerin, (e) KCl Gradient; 20% Glycerin, (f) 30% Äthylenglykol. (●) Protein; (○) Aktivität.

durch Zusatz von 5% Dimethylformamid oder 30% Äthylenglykol zum Puffer das erforderliche Elutionsvolumen wesentlich (Abb. 2f).

Im Gegensatz zum Affinanten 1 wird durch KCl allein keine Desorption erwirkt. Bei kombinierter Anwendung von KCl mit organischen Lösungsmitteln wie z.B. 20% Glycerin wird, insbesondere bei hohen KCl-Konzentrationen, eine Stabilisierung des immobilisierten Enzym-Substrat-Komplexes beobachtet. So läßt sich bei KCl-Konzentrationen oberhalb von 2,5 M keine Desorption des Enzyms mehr feststellen. Durch Waschen mit KCl-freiem Phosphatpuffer, der 20% Glycerin enthält, wird hingegen weitere Steroid-1-Dehydrogenase freigesetzt (Abb. 2e).

Das unterschiedliche Verhalten beider Affinitästräger resultiert im wesentlichen aus der unterschiedlichen Natur des zwischen dem Steroidliganden und der Sepharose befindlichen Spacers.

Die positive Ladung am Isoharnstoffrest (Abb. 1) bewirkt, daß der Affinant 1 Ionenaustauschereigenschaften besitzt [7]. Durch den Aminohexylrest schließt sich ein hydrophober Spacer an. Beide Effekte beeinflussen die biospezifische Bindung, und zwar im Sinne einer Verminderung der Bindungsstärke. Damit läßt sich der Einfluß von KCl allein oder in Verbindung mit organischen Lösungsmitteln erklären.

Aus dem dominierenden Einfluß von hydrophoben organischen Lösungsmitteln und dem unterschiedlichen Effekt von KCl auf die Desorption des Steroid-1-Dehydrogenase schließen wir, daß auch die biospezifische Bindung zwischen dem Enzym und dem immobilisierten Steroidliganden hydrophoben Charakter besitzt. Über quantitative Beziehungen zwischen der Hydrophobizität organischer Lösungsmittel und der Bindung am immobilisierten Steroidliganden berichten wir in [14].

Ähnliche Effekte beobachteten Lowe und Mosbach bei der Desorption von Lactatdehydrogenase an immobilisierten AMP-Derivaten [9].

Beim Affinanten 2 kommt die positive Ladung des Isoharnstoffrestes aus Mesomeriegründen praktisch nicht mehr zur Wirkung [7], womit die Ionenaustauschereigenschaften fehlen. Außerdem besitzt der Spacer im Vergleich zum Affinanten 1 weniger hydrophoben Charakter.

Bei der Adsorption der Steroid-1-Dehydrogenase kann somit die biospezifische Bindung wesentlich ungestörter zur Wirkung kommen. Nichtspezifische hydrophobe Wechselwirkungen (multiple point attachment) am Steroidliganden sind allerdings auch hier zu diskutieren.

LITERATUR

1. Benson A. M., Suruda A. J., Barrack E. R. und Talalay P.: Steroid-transforming enzymes. 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. Aukrust L. E., Norum K. R. und Skälhegg B. A.: Affinity chromatography of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. Use of *N,N*-Dimethylformamide to prevent hydrophobic interactions between the enzyme and the ligand. *Biochim. biophys. Acta* **438** (1976) 13–22.
3. Nicolas J. C., Pons M., Descomps B. und Crastes de Paulet A.: Affinity chromatography: Large-scale purification of the soluble oestradiol-17 β -dehydrogenase of human placenta. *FEBS Lett.* **23** (1972) 175–179.
4. Golf S. W., Greaf V. und Nowotny E.: Solubilisierung und Anreicherung einer 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Rattenleber-Mikrosomen. *Z. physiol. Chem.* **357** (1976) 35–40.
5. Chang-Chen Chin und Warren J. C.: Purification of estradiol-17 β -dehydrogenase from human placenta by affinity chromatography. *Steroids* **22** (1973) 373–378.
6. Atrat P., Deppmeyer V., Gabert A., Flemming Ch. und Hörhold C.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—VI. Reinigung einer 4-En-3-oxosteroid (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase aus *Nocardia opaca* durch Affinitätschromatographie. *J. steroid Biochem.* **8** (1977) 1017–1024.
7. Wilchek M.: Affinity chromatography. New approaches for the preparation of spacer containing derivatives and for specific isolation of peptides. In *Advances in Experimental Medicine* (Edited by R. Bruce Dunlap). Plenum Press, New York and London, Vol. 42 (1974) p. 15.
8. Hofstee B. H. J.: Non-specific binding of proteins by substituted agaroses. In *Advances in Experimental Medicine* (Edited by R. Bruce Dunlap). Plenum Press, New York and London, Vol. 42 (1974) p. 43.
9. Lowe Ch.R. und Mosbach K.: Biospecific affinity chromatography in aqueous-organic cosolvent mixtures. *Eur. J. Biochem.* **52** (1975) 99–105.
10. Lestrova N. N., Dänhardt S. und Hörhold C.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—V. Reinigung einer 4-En-3-oxosteroid (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase aus *Nocardia opaca* und Charakterisierung der prothetischen Gruppe. *Z. Allg. Mikrobiol.* (1977) im Druck.
11. Waddell W. J. und Hill Ch.: A simple ultraviolet spectrometric method for the determination of protein. *J. lab. clin. Med.* **48** (1956) 311–314.
12. Atrat P., Deppmeyer V. und Hörhold C.: Träger für die Affinitätschromatographie von steroid-bindenden und transformierenden Enzymen. In Vorbereitung (1977).
13. Hofstee B. H. J.: Hydrophobic effects in adsorptive protein immobilization. *J. macromolec. Sci. Chem.* **A 10** (1/2) (1976) 111–147.
14. Atrat P., Deppmeyer V. und Hörhold C.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—VIII. Einfluß organischer Lösungsmittel unterschiedlicher Hydrophobizität auf die Bindung an der Affinitätsmatrix-Affinitätschromatographie einer 4-En-3-oxosteroid (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase aus *Nocardia opaca*. *J. steroid Biochem.* (1978) im Druck.