

STEROIDUMWANDELNDE ENZYME AUS MIKRO- ORGANISMEN—VIII. EINFLUß ORGANISCHER LÖSUNGS- MITTEL UNTERSCHIEDLICHER HYDROPHOBIZITÄT AUF DIE BINDUNG AN DER AFFINITÄTSMATRIX-AFFINITÄTS- CHROMATOGRAPHIE EINER 4-EN-3-OXO-STEROID: (AKZEPTOR)-1-EN-OXIDOREDUKTASE AUS *NOCARDIA OPACA*

P. ATRAT, V. DEPPMEYER und C. HÖRHOLD

Technische Assistenz:

L. MÖLLER und R. KNÖLL

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

Die biospezifische Adsorption einer 4-En-3-oxosteroid: (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase (EC 1.9.99.4.) aus *Nocardia opaca* am immobilisierten Testosteronliganden wurde in Gegenwart organischer Lösungsmittel untersucht.

Dabei wurde ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität des Lösungsmittels und der Bindung des Enzyms aufgefunden. So ließ sich das logarithmische Verhältnis von gebundener und freier Enzymaktivität ($\log B$) linear mit dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im System Oktanol/Wasser ($\log P$) der untersuchten Lösungsmittel korrelieren:

$$\log B = 0,002 (\pm 0,067) + 0,300 (\pm 0,051) \log P.$$

Damit ist eine weitere quantitative Beziehung sowohl für die Affinitätschromatographie als auch für die gezielte Untersuchung der biospezifischen Wechselwirkung von Steroidligand und Protein gegeben.

SUMMARY

In the presence of organic solvents the biospecific adsorption of a 4-en-3-oxosteroid: (acceptor)-1-en-oxidoreductase (EC 1.3.99.4.) from *Nocardia opaca* on an immobilized testosterone ligand was investigated. Between hydrophobicity of the solvent and the matrix-binding of enzyme a quantitative relation was found. Thus a linear correlation was obtained of the logarithmic relation of matrix bound and free enzyme activity ($\log B$) with the logarithms of the distribution coefficient in the system octanol/water ($\log P$) of the organic solvents:

$$\log B = 0.002 (\pm 0.067) + 0.300 (\pm 0.051) \log P.$$

Thus a further quantitative relation was obtained for affinity chromatography and for investigation of the nature of biospecific interaction between steroid ligand and protein.

EINLEITUNG

Hydrophobe Bindungen spielen bei der Wechselwirkung von Steroiden mit Proteinen eine wichtige Rolle [1-3]. Die Festigkeit derartiger Bindungen ist sowohl von der Hydrophobizität des Proteins als auch von der des Steroidliganden entscheidend abhängig.

Bei der quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse nach Hansch [4] kommt der Hydrophobizität als Parameter eine zentrale Bedeutung zu. Derartige Beziehungen lassen sich auch bei der Quantifizierung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Steroidhormonen auffinden [5].

In der Praxis der Affinitätschromatographie macht sich der hydrophobe Effekt neben weiteren Einflüssen insbesondere bei der unspezifischen Proteinbindung am Spacer, an der Matrix, aber auch am Liganden bemerkbar. Durch Zusatz chemischer Agentien (organische Lösungsmittel, Salze, Detergentien usw.) lässt sich die Adsorption eines Proteins an der Matrix gezielt beeinflussen. Die Affinitätschromatographie, aber auch die Hydrophobchromatographie haben damit in der letzten Zeit einen bedeutenden Aufschwung erfahren [6, 7]. Eine derartige gezielte Einflussnahme auf die Bindung an der Affinitätsmatrix gestatten es, Aussagen zur Natur der biospezifischen Bindung am immobilisierten Liganden zu treffen [8].

Auch auf die biospezifische Bindung von steroid-transformierenden Enzymen an der Affinitätsmatrix haben z.B. organische Lösungsmittel auf Grund ihres hydrophoben Charakters Einfluß [9, 10, 13]. Quantitative Beziehungen zwischen Hydrophobizität des organischen Lösungsmittels und der Bindung an der Matrix wurden bisher jedoch nicht beschrieben.

Bei Untersuchungen zur affinitätschromatographischen Reinigung einer 4-En-3-oxosteroid-(Akzeptor)-1-en-oxido-reduktase (Steroid-1-Dehydrogenase), EC 1.3.99.4., aus *Nocardia opaca* konnte nachgewiesen werden, daß die biospezifische Bindung des Enzyms am immobilisierten Testosteronliganden hydrophobe Anteile besitzen muß [11, 12, 13].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Hydrophobizität zugesetzter organischer Lösungsmittel quantitativ zu erfassen.

MATERIALIEN UND METHODEN

1. Steroid-1-Dehydrogenase

Die Präparation des Enzyms aus *Nocardia opaca* ist ausführlich in [14] beschrieben. Für die Bindungsuntersuchungen wurde eine Ammoniumsulfatsfällung in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 8 benutzt.

Die spezifische Aktivität dieser Fraktion betrug 100 μM 4-Androstendion min^{-1} mg^{-1} .

2. Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte spektralphotometrisch bei 600 nm mit Hilfe von 2,6-Dichlorphenolindophenol als artifizieller Akzeptor und 4-Androstendion als Substrat [12].

3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Waddell und Hill [15] bestimmt.

4. Affinitätsmatrix

Für Bindungsuntersuchungen wurde eine Affinitätsmatrix, die durch Kupplung von *N*-(4-Androsten-3-

on-17 β -oxy-carbonyl)- ϵ -aminocapronsäure an Amino-hexyl-Sepharose 4B erhalten wurde, verwendet [12]. Die Ligandendichte betrug 4 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Gel.

5. Lösungsmittel

Die organischen Lösungsmittel, Glyzerin, Dimethylsulfoxid, Äthylenglykol, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, *n*-Propanol, Aceton, 2-Butanon, *n*-Butanol und Propylenglykol waren analytisch rein und wurden unmittelbar vor dem Einsatz nochmals destilliert.

6. Durchführung der Bindungsuntersuchungen

Im Inkubationsröhren werden 1 ml dreifach mit Puffer verdünntes Affinitätsgel, 10 mg Protein einer Ammoniumsulfatsfällung (500 μM min^{-1} Steroid-1-Dehydrogenaseaktivität) und 1 ml Phosphatpuffer vermischt. Das organische Lösungsmittel wird als 1,4 molare Lösung im gleichen Puffer zugesetzt (2 ml), so daß eine Endkonzentration von 0,7 M (bei Butanol 0,3 M) im Röhrchen entsteht. Die Inkubation erfolgt 60 min bei 4 °C unter Schütteln. Nach dem Abzentrifugieren des Gels wird eine Bestimmung der freien und gebundenen Enzymaktivität vorgenommen.

Zur Überprüfung der Stabilität des Enzyms gegenüber den obengenannten organischen Lösungsmitteln wurde unter gleichen Bedingungen eine Inkubation ohne Affinitätsgel vorgenommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase an der Affinitätsmatrix, selbst bei hohen Proteinkonzentrationen, biospezifisch erfolgt [11, 12].

Die Ergebnisse der Bindungsuntersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen erfolgt keine bzw. nur eine geringfügige Beeinflussung der Enzymaktivität, wie aus Ansätzen ohne Affinitätsgel hervorgeht.

Die unspezifische Proteinbindung an der Affinitätsmatrix, die im wesentlichen durch ionische Wechsel-

Tabelle 1. Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase an die Affinitätsmatrix in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Konzentration: 0,7 M, Batch-Verfahren, 60 min bei 4 °C inkubiert, eingesetzte Aktivität 500 μM 4-Androstendion min^{-1} , 0,01 M Phosphatpuffer, pH 8)

Lösungsmittel	ungebundene Enzymaktivität %	log gebundene Aktivität (= log B)
1 Glyzerin	17,2	0,683
2 Dimethylsulfoxid	21,7	0,557
3 Äthylenglykol	18,7	0,639
4 Propylenglykol	27,6	0,419
5 Dimethylformamid	32,6	0,316
6 Dimethylacetamid	38,3	0,207
7 <i>n</i> -Propanol	45,7	0,075
8 Aceton	42,3	0,135
9 2-Butanon	53,5	-0,061
10 <i>n</i> -Butanol*	70,5	-0,379

* Konz.: 0,3 M.

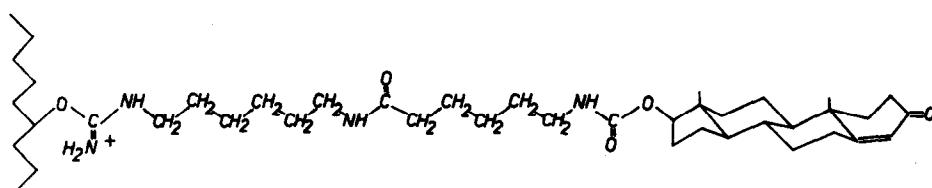


Abb. 1. Struktur des verwendeten Affinanten.

wirkungen am Isoharnstoffrest (Abb. 1) zustande kommt [13], wird durch das organische Lösungsmittel nicht signifikant beeinflußt. Die experimentellen Ergebnisse diskutieren wir demnach als direkten Einfluß des organischen Lösungsmittels auf die biospezifische Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase am fixierten Liganden.

Unter Vernachlässigung elektronischer, sterischer und anderer Parameter wurden die in Tabelle 1 zusammengestellten Lösungsmittel unter dem Gesichtspunkt ihrer Hydrophobizität ausgewählt. Als quantitativer Parameter der Hydrophobizität diente der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im System Oktanol/Wasser [16]. In Abb. 2 ist dieser Parameter gegen das logarithmische Verhältnis von freier und trägergebundener Enzymaktivität ($\log B$) aufgetragen worden.

Nach einer einfachen linearen Regression ergab sich die in Gleichung [1] angegebene Beziehung zwischen Bindung am Affinanten und Hydrophobizität des organischen Lösungsmittels.

$$\log B = -0,002 + 0,300 \log P. \quad (1)$$

Damit besteht unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen ein signifikanter Zusammenhang

zwischen der Hydrophobizität des organischen Lösungsmittels im Inkubationsansatz und der biospezifischen Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase (E) am immobilisierten Steroid-liganden L_{im} . Das belegt wiederum die Aussage, daß die biospezifische Bindung (Gleichung 2) selbst weitgehend hydrophober Natur sein muß.

$$L_{im} + E \rightleftharpoons L_{im}E. \quad (2)$$

Damit ergibt sich eine weitere quantitative Beziehung in der Praxis der Affinitätschromatographie sowie bei der Untersuchung der Natur von steroidbindenden und transformierenden Proteinen.

Voraussetzung jedoch ist, daß unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Enzymaktivität weitgehend erhalten bleibt. Das ist bei hohen Lösungsmittelkonzentrationen bzw. Lösungsmitteln mit besonders ausgeprägter Hydrophobizität oder bei Vorliegen andersartiger Wechselwirkungen mit dem Protein nicht mehr gegeben.

Herrn J. Draftehn aus der Abteilung Steroidsynthese des Zentralinstitutes für Mikrobiologie und experimentelle Therapie danken wir für gemeinsame Diskussion und Interpretation der Ergebnisse, insbesondere der Regressionsanalyse.

LITERATUR

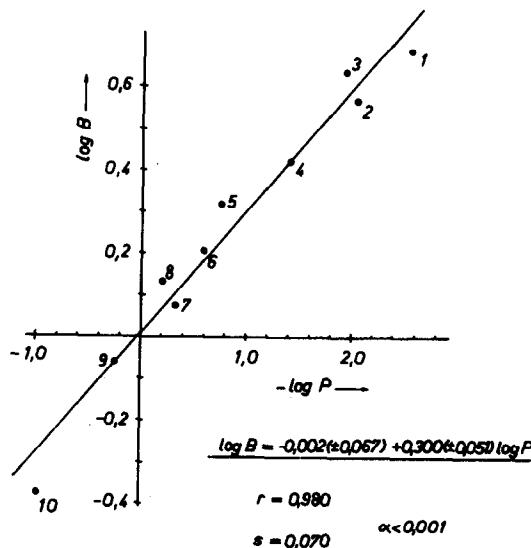


Abb. 2. Einfluß organischer Lösungsmittel auf die biospezifische Bindung der Steroid-1-Dehydrogenase aus *Nocardia opaca* an der Affinitätsmatrix. (B = gebundene Enzymaktivität/freie Enzymaktivität, P = Verteilungskoeffizient im System Oktanol/Wasser.) 1. Glycerin, 2. Dimethylsulfoxid, 3. Äthylenglykol, 4. Propylenglykol, 5. *N,N*-Dimethylformamid, 6. *N,N*-Dimethylacetamid, 7. *n*-Propanol, 8. Aceton, 9. 2-Butanon, 10. *n*-Butanol.

1. Lutz R. A., Wiegand U.-W. and Weder H. G.: Steroid-globulin-interaction. In *Protein-Ligand Interactions*. Proceedings of a Symposium held at the University of Konstanz, West Germany, September 2-6, 1974 (Edited by H. Sund and G. Blauer) Walter de Gruyter, Berlin, New York (1975) pp. 385-398.
2. Hansen P. E., Johnson A., Schrader W. T. and O'Malley B. W.: Kinetics of progesterone binding to the chick oviduct receptor protein. *J. steroid Biochem.* 7 (1976) 723.
3. Westphal U.: In *Monographs on Endocrinology* (Edited by F. Gross, A. Labhart, T. Mann, L. T. Samuels and J. Zander). Steroid-Protein Interactions. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Vol. 4 (1971) pp. 65, 146, 157, 483.
4. Biological Correlations-The Hansch Approach. *Adv. Chem. Series* 114 (Edited by W. van Valkenburg), Am. Chem. Soc., Washington, D.C., (1972).
5. Ponsold K., Schönecker B. und Draftehn J.: Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen physiko-chemischer Parameter 16α-heterosubstituierter Östradioide und dem Bindungsvermögen an Rezeptoren des Ratentuterus *in vitro*. *Pharmazie* (1977) im Druck.
6. Porath J.: Bioaffinity chromatography—methodology and application. *J. Macromol. Sci. Chem.* A 10 (1976) 1-14.
7. Hofstee B. H. J.: Hydrophobic effects in adsorptive protein immobilization. *J. Macromol. Sci. Chem.* A 10 (1976) 111-147.

8. Lowe Ch.R. and Mosbach K.: Biospecific affinity chromatography in Aqueous-organic cosolvent mixtures. *Eur. J. Biochem.* **52** (1975) 99-105.
9. Benson A. M., Suruda A. J., Barrack E. R. and 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.
10. Aukrust L. E., Norum K. R. and Skalhegg B. A.: Affinity chromatography of 3α -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.
11. Hörold C., Atrat P., Deppmeyer V., Gabert A., Flemming Ch. und Schubert K.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—II. Reinigung einer 3-Oxosteroid- Δ^1 -Oxidoreduktase aus *Nocardia opaca* mit Hilfe der Affinitätschromatographie. *Z. Allg. Mikrobiol.* **7** (1976) 559-561.
12. Atrat P., Deppmeyer V., Gabert A., Flemming Ch. und Hörold 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.
13. Atrat P., Deppmeyer V. und Hörold C.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—VII. Untersuchungen zur Natur der biospezifischen Bindung an der Affinitätsmatrix-Affinitätschromatographie einer 4-En-3-oxosteroid (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase aus *Nocardia opaca*. *J. steroid Biochem.* **9** (1978) 579-582.
14. Lestrovaja N. N., Dänhardt S. und Hörold C.: Steroidumwandelnde Enzyme aus Mikroorganismen—V. Reinigung einer 4-En-3-oxosteroid (Akzeptor)-1-en-oxidoreduktase aus *Nocardia opaca* und Charakterisierung der prosthetischen Gruppe. *Z. Allg. Mikrobiol.* (1977) im Druck.
15. Waddell W. J. and Hill Ch.: A simple ultraviolet spectrometric method for the determination of protein. *J. lab. clin. Med.* **48** (1956) 311-314.
16. Leo A., Hansch C. and Elkins D.: Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71** (1971) 525-616.