

*Journal of Chromatography*, 376 (1986) 349–374

*Biomedical Applications*

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 2968

## LADUNGSKONTROLLIERTE HYDROPHOBE CHROMATOGRAPHIE: EIN EFFEKTIVES TRENNPRINZIP FÜR PROTEINE

WULFDIETER SCHÖPP\*, MARLIS GRUNOW, KRISTINA STOLARSKI, ANGELIKA SCHÄFER, DIETMAR KNOPP und RITA LORENZ

*Bereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften, Karl-Marx-Universität Leipzig, Talstrasse 33, DDR-7010 Leipzig (D.D.R.)*

---

### SUMMARY

#### *Charge-controlled hydrophobic chromatography: an effective enzyme purification technique*

More than twenty enzymes (oxidoreductases, hydrolases, lyases, transferases) from crude bacterial extracts or commercial preparations have been purified by charge-controlled hydrophobic chromatography on 10-carboxydecyl-Sepharose. The enzymes were adsorbed on columns in the presence of high concentrations of structure-forming anions (phosphate, sulphate, citrate) and were eluted by decreasing the concentration of the salts. As a rule crystalline enzyme preparations were obtained by dialysis of eluates against ammonium sulphate solutions. These results suggest the existence of a true affinity principle based on the ability of structure-forming anions to modify the enzyme conformation. The only supposition is the immobilization of a ligand with a specific combination of hydrophobic and ionic properties in that manner, that the columns are not able to bind enzymes in the presence of dilute buffer solutions.

---

### EINLEITUNG

Unter den verschiedenen Trennverfahren für Proteine nimmt die Chromatographie an Trägermaterialien mit gleichzeitig hydrophoben und ionischen Eigenschaften eine besondere Position ein. Während in einer Reihe von Fällen von ausserordentlich günstigen Trennergebnissen berichtet wurde [1], gibt es auch Auffassungen, die diese Technik ablehnen und Trennungen entweder an reinen Ionenaustauschern oder typisch hydrophoben Trägermaterialien empfehlen [2]. Andere Autoren streben dagegen bewusst eine Kombination hydrophober, kationischer wie anionischer Eigenschaften an und haben mit solchen Materialien hervorragende Trennergebnisse erhalten [3]. Besonders ungünstig wird der Einfluss amphiphatischer Liganden aus der Sicht der

Affinitätschromatographie eingeschätzt, da solche als Spacermoleküle benutzten Substanzen selbst einen entscheidenden Beitrag im Adsorptionsprozess leisten können [4–6]. Daher wird hier in zunehmendem Masse der Einsatz langkettiger hydrophiler Spacer angestrebt [7].

Basierend auf den guten Resultaten, die wir bei der Trennung von Alkoholdehydrogenasen an 10-Carboxydecyl-Sepharose (CD-Sepharose) erzielten [8], haben wir die Eigenschaften dieses Trägers auch gegenüber anderen Enzymen untersucht und zu unserer Überraschung in allen Fällen ähnlich gute Resultate erhalten. In der vorliegenden Arbeit soll ein Überblick über diese Befunde gegeben und der Versuch ihrer Deutung unternommen werden. Im Mittelpunkt stehen dabei Untersuchungen an Hefe-Alkoholdehydrogenase, die bezüglich ihrer Reaktion mit amphiphatischen Substraten besonders gut charakterisiert ist [9].

## EXPERIMENTELLES

### Chemikalien

Boehringer (Mannheim, B.R.D.): Alkoholdehydrogenase (ADH) (Leber, L-ADH; Hefe, H-ADH), Lactatdehydrogenase (LDH) (Schweineherz), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Kaninchenmuskel), Galactosedehydrogenase (GalDH) (*Pseudomonas fluorescens*), Aldolase (Kaninchenmuskel), Catalase (Rinderleber), Isocitratdehydrogenase (ICDH) (Schweineherz), Alkalische Phosphatase Grad II (Kälberdarm), Diaphorase Grad II (Schweineherz), Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-pDH) Grad II (Hefe), Peroxidase Grad II (Meerrettich),  $\text{NAD}^+$ , Natrium-glucose-6-phosphat, N-Benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid. Serva (Heidelberg, B.R.D.): D,L-Carnitinhydrochlorid, Natrium-D,L-isocitrat, Natrium-D,L-3-hydroxybutyrat, Natrium-L-malat, Natrium-L-lactat, D-Galactose, Guajacol, Rinderserumalbumin, Eialbumin. Fluka (Buchs, Schweiz): Hexanol, Heptanol, Octanol, Nonanol, Decanol, Ethanal, Butanal, Hexanal, Octanal, Decanal, Dodecanal, Hexylamin, Octylamin, Decylamin, 1,6-Diaminohexan, 1,8-Diaminooctan, 1,10-Diaminododecan, 6-Aminocapronsäure, Capronsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Korksäure, Sebacinsäure. Ferak (Berlin-West): Propanol, 1,4-Butandiol, 1,6-Hexandiol, 1,8-Octandiol, 1,10-Decandiol, 6-Aminohexan-1-ol, 11-Amino-undecansäure. VEB Laborchemie Apolda: Ethanol, Butanol, Pentanol, Ethylenglykol, Adipinsäure. Arzneimittelwerk (Dresden, D.D.R.): Malatdehydrogenase (MDH) (Schweineherz),  $\text{NADP}^+$ , NADH, 4-Nitrophenylphosphat. Leiboldt (Kleinmachnow, D.D.R.): Trypsin, Chymotrypsin. Pharmacia (Uppsala, Schweden): Sepharose 4B, Sephadex G-200, Dextranblau 2000. Chemapol (Prag, Tschechoslowakei): Safranin T, Nitroblautetrazoliumchlorid. Merck (Darmstadt, B.R.D.): Papain. Reanal (Budapest, Ungarn): N-Acetyl-L-tyrosinethylester.

### Aktivitätsbestimmung der Enzyme

Alle Aktivitätsmessungen wurden bei  $25^\circ\text{C}$  an einem Spektralphotometer DK2A (Beckman Instruments) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die 2 ml-Testansätze enthielten folgende Bestandteile: Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1): 0,5 M Ethanol und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,05 M

Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27): 45 mM L-Lactat und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (HBDH) (EC 1.1.1.30): 20 mM D,L-3-Hydroxybutyrat und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HACoADH) (EC 1.1.1.35): 0,065 mM Acetoacetyl-CoA und 0,2 mM NADH in 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0. Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37): 47 mM L-Malat und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Malatenzym (EC 1.1.1.40): 2,5 mM L-Malat, 0,25 mM  $\text{NADP}^+$ , 12 mM Magnesiumchlorid und 2,5 mM Ammoniumsulfat in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,2. Isocitratdehydrogenase (EC 1.1.1.42): 56 mM D,L-Isocitrat, 0,6 mM  $\text{NADP}^+$  und 0,5 mM Manganchlorid in 0,067 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5. Galactosedehydrogenase (EC 1.1.1.48): 25 mM D-Galactose und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Glucose-6-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49): 0,5 mM Glucose-6-phosphat, 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  und 20 mM Magnesiumchlorid in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5. Carnitindehydrogenase (CDH) (EC 1.1.1.108): 50 mM D,L-Carnitin und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,0.

Die Aktivität aller  $\text{NAD(P)}^+$ -abhängigen Dehydrogenasen wurde bei 340 nm gemessen.

Diaphorase (EC 1.6.4.3): 0,12 mM Nitroblautetrazoliumchlorid und 0,14 mM NADH in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 ( $\lambda = 510$  nm). Peroxidase (EC 1.11.1.7): 0,3 mM Guajacol und 0,12 M Wasserstoffperoxid in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 ( $\lambda = 436$  nm). Chymotrypsin (EC 3.4.21.1): 0,5 mM N-Acetyl-L-tyrosinethylester in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 ( $\lambda = 237$  nm). Trypsin (EC 3.4.21.4) und Papain (EC 3.4.22.2): 1,4 mM N-Benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 ( $\lambda = 405$  nm). Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1): 5 mM 4-Nitrophenylphosphat in 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 ( $\lambda = 405$  nm).

### *Kinetische Untersuchungen mit H-ADH*

Enzymstammlösungen wurden in 0,067 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 unter Zusatz von Glutathion (0,5 mM) oder Rinderserumalbumin (0,05%) hergestellt. Alle Testansätze enthielten ebenfalls Glutathion in dieser Konzentration. Die Ermittlung der spezifischen Aktivität erfolgte in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer pH 8,7, der 0,5 M Ethanol und 0,8 mM  $\text{NAD}^+$  enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10–50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung gestartet. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt, das Testvolumen betrug 2 ml. Die Initialgeschwindigkeiten wurden in der Regel über einen Zeitraum von 1–2 min photometrisch bei 340 nm oder fluorimetrisch gemessen [10]. Die kinetischen Untersuchungen bei Variation beider Substrate wurden grundsätzlich bei pH 8,0 durchgeführt wie bereits früher beschrieben wurde [10]. Die gemessenen Geschwindigkeiten waren im allgemeinen innerhalb 5%, die kinetischen Koeffizienten innerhalb 25% reproduzierbar. Zur Untersuchung des Einflusses von Phosphat und Chlorid auf die kinetischen Parameter der H-ADH wurden  $\text{NAD}^+$  im Konzentrationsbereich zwischen 0,204 und 0,82 mM, Hexanol im Konzentrationsbereich zwischen 1,6 und 8 mM variiert. Die Hemmstudien wurden in 0,067 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 unter Einsatz von  $\text{NAD}^+$  (0,164–0,82 mM) und Ethylenglykol (0,2–2 M) durchgeführt. Die

Inhibitoren wurden maximal in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Butylamin, Capronsäure, Adipinsäure, Korksäure, Sebacinsäure, Diaminohexan, Diaminooctan, Diaminodecan (jeweils 50 mM); Caprylsäure (25 mM); Hexylamin, Caprinsäure (14 mM); Octylamin (3 mM); Decylamin (2,5 mM).

#### *Herstellung der Sepharosederivate*

CD-Sepharose wurde nach unseren früheren Angaben aus Sepharose 4B und 11-Aminoundecansäure über die Bromcyan-Aktivierung hergestellt [8]. In ähnlicher Weise wurden Hexylamin, Octylamin, 1,6-Diaminohexan, 6-Aminocapronsäure und 6-Aminohexan-1-ol bzw. Safranin T an den Träger gekoppelt. Hierzu wurden jeweils 10 g Bromcyan-aktivierte Sepharose (etwa 35 ml gequollenem Gel entsprechend) in 100 ml 0,1 M Natriumcarbonatlösung, die 10 g der jeweiligen Aminoverbindung enthielt, suspendiert und ca. 20 h bei 25°C langsam geschüttelt. Safranin wurde in einer Konzentration von 1 g pro 100 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 8 eingesetzt. Nach beendeter Reaktion wurden die Gele jeweils mit dem fünffachen Volumen Wasser, 0,2 M Essigsäure und 3 M Natriumchlorid unter zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur gewaschen. NAD<sup>+</sup>-Sepharose wurde nach Periodatoxidation von NAD<sup>+</sup> durch Kopplung an Adipinsäuredihydrazid-Sepharose, wie bereits früher beschrieben, hergestellt [11].

#### *Substitutionsgrad der Sepharosederivate*

Der Substitutionsgrad der Alkyl-Sepharosen wurde aus dem Chloridbindungsvermögen ermittelt. Hierzu wurden 10-ml Portionen des Sepharosederivatives in Säulen gefüllt und jeweils mit 100 ml 0,02 M Salzsäure bzw. 100 ml Wasser gewaschen. Nach Beladung mit Chlorid (100 ml 1 M Natriumchlorid) wurde solange mit Wasser gewaschen, bis kein Chlorid im Eluat mehr nachweisbar war. Die Ablösung des Chlorids vom Träger erfolgte durch Elution mit 20 ml 0,1 M Natriumhydroxid. Nach Neutralisation mit Schwefelsäure wurde mit 0,1 M Silbernitratlösung unter Verwendung von Kaliumchromat als Indikator bis zum Verschwinden der gelben Farbe titriert. Die Dosierung erfolgte in 5- $\mu$ l Portionen. Der Substitutionsgrad der NAD<sup>+</sup>-Sepharose wurde nach Reduktion mit Natriumborhydrid durch Aufnahme des UV-Differenzspektrums unter Verwendung von Sepharose 4B als Leerwert aus der Extinktionsdifferenz bei 340 nm ermittelt [11]. Der Substitutionsgrad der Safranin-Sepharose wurde in analoger Weise direkt aus dem Differenzspektrum als Extinktionsdifferenz bei 520 nm bestimmt.

#### *Quantitative Bindungsstudien mit Alkyl-Sepharosen*

Zur Ermittlung der quantitativen Bindungsdaten wurden 50–500  $\mu$ g H-ADH mit einer konstanten Menge des Sepharosederivates bei 25°C unter vorsichtigem Umschwenken für 30 min inkubiert. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 2 ml. Nach Zentrifugation (2 min bei 3000 g) wurde der nichtgebundene Proteinanteil durch Messung der Extinktion bei 220 nm über eine Eichkurve ermittelt und die Bindungsdaten aus den Doppelt-Reziprok-Auftragungen ( $1/[\text{ADH}]_{\text{gebunden}}$  gegen  $1/[\text{ADH}]_{\text{frei}}$ ) bestimmt. Die bei Sättigung des Trägers mit dem Enzym graphisch ermittelte maximale Bindungskapazität wurde auf 1 g getrocknetes Sepharosegel bezogen.

### *Präparative Trennungen an CD-Sepharose*

Als Ausgangsmaterial für diese Versuche wurden entweder zellfreie Proteinextrakte aus *Pseudomonas putida* BL 1 (Kultursubstrate waren Hexan, Carnitin oder Benzylamin) [12, 13] oder partiell gereinigte Handelspräparate verschiedener Enzyme verwendet. Nach Aufschluss der Bakterien durch Ultraschallbehandlung und anschließender Zentrifugation wurde das gesamte Protein aus dem zellfreien Überstand durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur Sättigung ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 15 000 *g* wurde das Sediment mit Ammoniumsulfatlösungen (stets 0,05 *M* Dinatriumhydrogenphosphat enthaltend) abnehmender Konzentration extrahiert, wobei sich die Enzyme nacheinander wieder lösen. Diese Lösungen wurden direkt auf Säulen mit CD-Sepharose aufgetragen, die mit der gleichen Salzlösung äquilibriert worden waren. Pro ml CD-Sepharose können bis zu 100 mg Protein aufgetragen werden. In der Regel wurden 20 ml-Säulen verwendet, die mit 100–300 ml der Proteinextrakte (2–5 mg/ml) beschickt wurden. Die Elution der quantitativ adsorbierten Enzyme erfolgte mit abnehmender Ammoniumsulfatkonzentration. Konkrete Angaben für Konzentrationsdifferenzen, Elutionsvolumen und Zeitverlauf sind aus Fig. 12 zu entnehmen. Der Proteingehalt in den Eluaten wurde nach Angaben von Kalb und Bernlohr aus der Extinktionsdifferenz der Proben bei 230 and 260 nm ermittelt [14]. Alle Versuche wurden bei 22–25° C und einer Flussgeschwindigkeit von 0,4–0,7 ml/min durchgeführt. Die Enzyme wurden aus den Eluaten durch Dialyse gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung wieder ausgefällt, wobei in der Regel kristalline Präparate erhalten wurden, wenn die Proteinkonzentrationen über 1 mg/ml lagen. Nach gründlichem Waschen der Säulen mit Wasser waren diese erneut einsatzfähig und konnten bis zu einem Jahr ständig, ohne merkliche Verschlechterung der Trenneigenschaften benutzt werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### *Differenzierte Adsorption und Elution von Dehydrogenasen an CD-Sepharose in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration*

Zur Aufklärung der Natur des Adsorptions-/Elutionsprozesses an CD-Sepharose schien uns die systematische Untersuchung an verschiedenen Dehydrogenasen besonders sinnvoll, da hier über strukturell wie funktionell bedeutsame hydrophobe Regionen eine Reihe gesicherter Resultate vorliegen [15]. Das typische Bindungsverhalten für alle Enzyme ist in Fig. 1 am Beispiel der H-ADH dargestellt. In verdünnten Puffersystemen (< 0,1 *M*) tritt keinerlei Adsorption ein. Demgegenüber ist in Anwesenheit hoher Konzentrationen strukturformierender Ionen wie Phosphat, Sulfat, Citrat eine quantitative Adsorption festzustellen. Bei Zusatz von Chlorid in vergleichbaren Konzentrationen erfolgt dagegen eine Wiederablösung des Enzyms vom Sepharosederivat. Ähnliche Verhaltensweisen wurden in der Vergangenheit bereits für verschiedene Enzym-Träger-Wechselwirkungen beschrieben [1]. Diese Resultate sprechen dafür, dass die Adsorption unter den genannten Bedingungen über hydrophobe Wechselwirkungen realisiert wird. Aus Fig. 1a wird deutlich, dass das Enzym an unbehandelte Sepharose 4B in Anwesenheit von 1 *M* Phosphat nur in ausserordentlich geringem Ausmass adsorbiert wird,

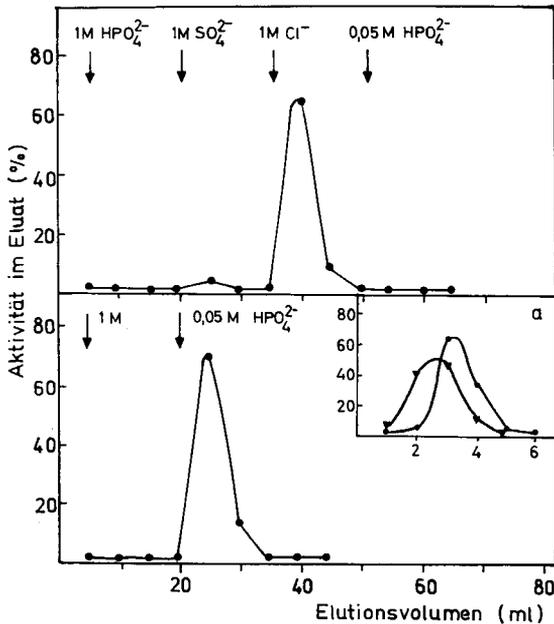


Fig. 1. Bindungsverhalten der Hefe-Alkoholdehydrogenase an CD-Sepharose in Abhängigkeit von der Ionenart und -konzentration. Eine 2 ml-Säule wurde mit 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8 äquilibriert und mit 0,5 ml einer Lösung von H-ADH im gleichen Puffer (0,2 mg/ml) beladen. Die Elution erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min unter Einsatz von Ammoniumsulfat bzw. Natriumchlorid. In einem zweiten Experiment wurde die Elution durch Verringerung der Phosphatkonzentration bewirkt. Gesammelt wurden 5 ml-Fraktionen. (a) Unter den gleichen Bedingungen wurde der Versuch an un behandelter Sepharose 4B in Anwesenheit von 0,05 M Phosphat ( $\blacktriangledown$ ) bzw. 1 M Phosphat ( $\bullet$ ) durchgeführt. Gesammelt wurden 1 ml-Fraktionen.

obwohl bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration eine Zunahme der Bindungsaffinität zu erwarten ist. So konnten Fujita et al. [16] nachweisen, dass H-ADH unter anderem auch an Cellulose in Anwesenheit von 2 M Ammoniumsulfat adsorbiert wird.

Fig. 2 zeigt das Bindungsverhalten von MDH, LDH, GAPDH, H-ADH und L-ADH an CD-Sepharose. Daraus wird deutlich, dass die Konzentration an Ammoniumsulfat, die zur vollständigen Adsorption der Enzyme notwendig ist, sehr unterschiedlich ist. So erfolgt eine vollständige Adsorption der L-ADH schon bei Ammoniumsulfatkonzentrationen von  $> 1,2 M$ , während MDH erst bei Konzentrationen  $> 2 M$  adsorbiert wird. Bei der bekannten ausserordentlich grossen Ähnlichkeit der Coenzymbindungsdomänen bzw. der Konformation des gebundenen Coenzym in allen Dehydrogenasen [15] erscheint eine Realisierung der Wechselwirkung über die hydrophobe Adeninbindungsregion zunächst recht unwahrscheinlich. Demgegenüber besitzen die katalytischen Domänen dieser Enzyme sehr unterschiedliche Strukturen, was zu verschiedenartigen räumlichen Anordnungen gegenüber ihrer gemeinsamen Dinukleotidbindungsdomäne führt [15]. Dadurch ergeben sich Unterschiede in den Subeinheitenwechselwirkungen, die sämtlich über Bereiche der Coenzymbindungsdomäne realisiert werden. Die Enzyme zeigen bezüglich ihrer Quartärstruktur deutliche Differenzen, woraus sich möglicherweise die in Fig. 2 dargestellten Unterschiede ableiten lassen.

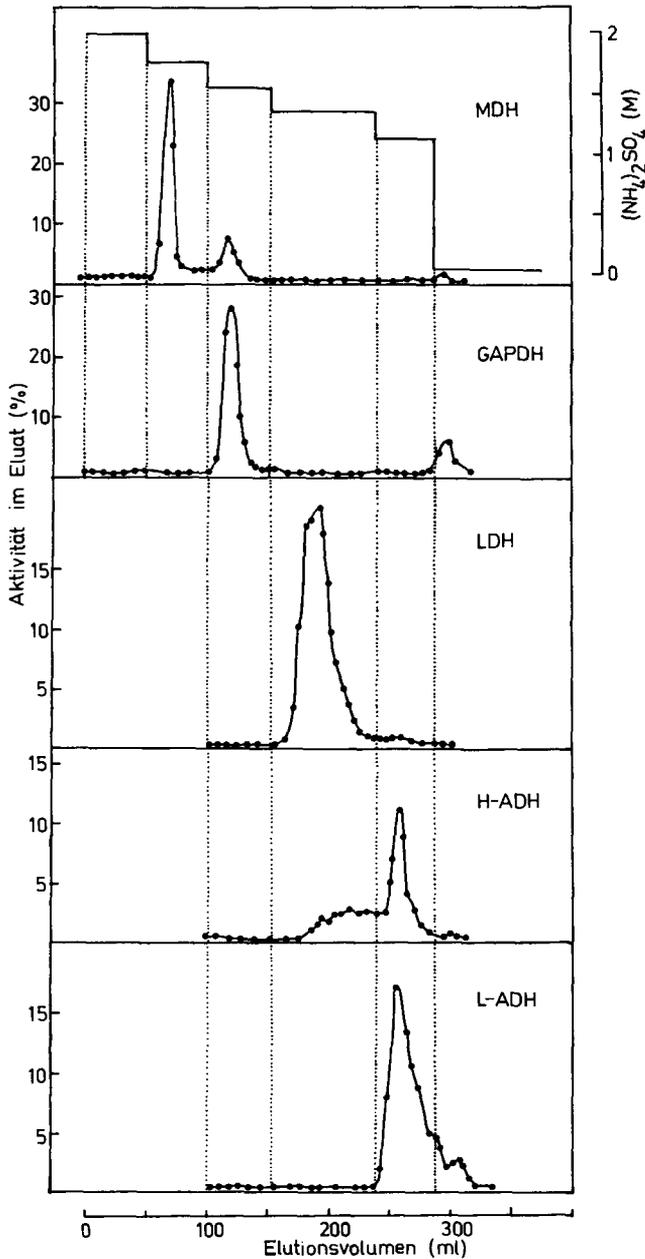


Fig. 2. Adsorptionsverhalten verschiedener Dehydrogenasen an CD-Sepharose in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration. Die in Ammoniumsulfatlösungen unterschiedlicher Konzentration gelösten Enzyme wurden auf 8 ml-Säulen, die vorher mit der entsprechenden Salzkonzentration äquilibriert worden waren, aufgetragen. MDH (5,2 mg in 4,5 ml 2 M Ammoniumsulfat); GAPDH (9 mg in 1,6 ml 2 M Ammoniumsulfat); LDH (7,4 mg in 2,4 ml 1,6 M Ammoniumsulfat); H-ADH (7,8 mg in 1,6 ml 1,6 M Ammoniumsulfat); L-ADH (6,4 mg in 1,5 ml 1,6 M Ammoniumsulfat). Die Elution erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min, wobei 5 ml-Fractionen gesammelt wurden.

### Beziehungen zwischen Adsorptionsverhalten und Substratbindung

Bemerkenswert sind die sehr ähnlichen Verhaltensweisen der dimeren L-ADH und der tetrameren H-ADH an CD-Sepharose, obwohl es zwischen beiden Enzymen erhebliche strukturelle wie funktionelle Unterschiede gibt [17, 18]. Beide Alkoholdehydrogenasen weisen jedoch eine beträchtliche Ähnlichkeit bezüglich ihrer Substratbindungsregionen auf, die wie Strukturdaten belegen, streng hydrophober Natur sind [18]. Dies lässt sich auch aus kinetischen Parametern ableiten, wenn man die Wirkung beider Enzyme gegenüber homologen Substraten untersucht. Als typischer Ausdruck einer hydrophoben Protein-Ligand-Wechselwirkung ergibt sich im Falle der H-ADH für alle Substanzen eine lineare Beziehung zwischen  $pK_m$ -Werten und C-Zahl im Bereich von vier bis zehn C-Atomen (Fig. 3A). Demgegenüber treten beträchtliche Unterschiede im Verlauf der  $pK_m$ -Werte zwischen Hefe- und Leber-ADH auf (Fig. 3B), obwohl auch hier eine weitgehende Identität zu erwarten war. Da die  $K_m$ -Werte für die L-ADH [17, 19] im Gegensatz zum Hefe-Enzym [9, 10] nicht annähernd die Dissoziationskonstanten der Enzym-Alkohol-Komplexe repräsentieren, ist dieses Verhalten jedoch verständlich. Die Ähnlichkeit beider Substratbindungsregionen lässt sich in überzeugender Weise demonstrieren, wenn man für L-ADH die  $K_i$ -Werte von Monocarbonsäuren, die kompetitive Inhibitoren sind, zum Vergleich heranzieht (Fig. 3B). Da die CD-Sepharose letztlich auch als substratanaloge Verbindung aufgefasst werden kann, wäre ein ähnliches Adsorptionsverhalten der beiden Alkoholdehydrogenasen an diesem Träger durchaus verständlich.

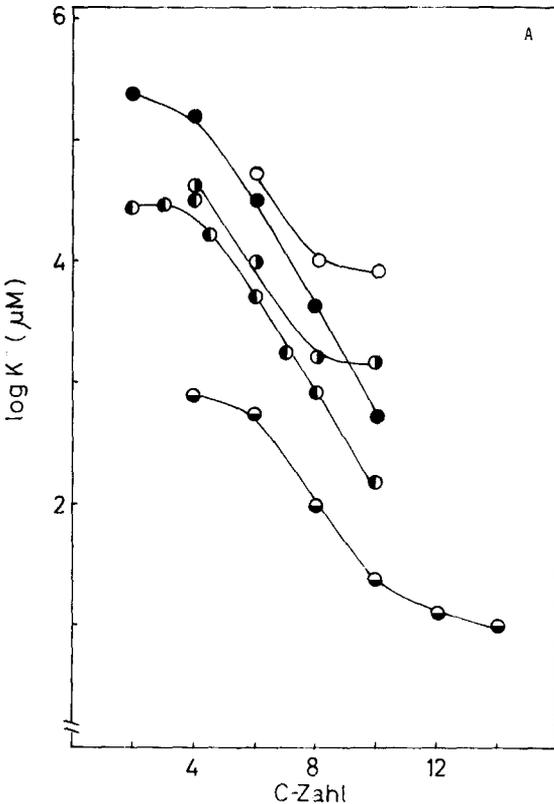


Fig. 3.

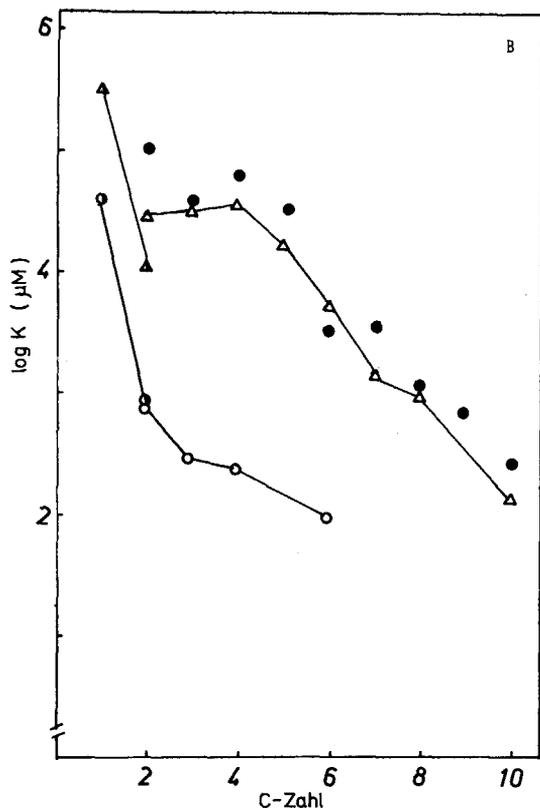


Fig. 3. Abhängigkeit von  $K_m$ -Werten und Inhibitorkonstanten der H-ADH und L-ADH von der Kettenlänge des Substrates bzw. Inhibitors. (A) Hefe-Alkoholdehydrogenase: ○, 1-Alkanole [20]; ◐, Aldehyde [20]; ●, Alkandiole; ○, Monocarbonsäuren; ◐, Monoamine [9]. (B) Hefe- und Leber-Alkoholdehydrogenase: ▲, △, 1-Alkanole (H-ADH) [20, 21]; ◐, ○, 1-Alkanole (L-ADH) [21, 22]; ●, Monocarbonsäuren (L-ADH) [23].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Fähigkeit zum Umsatz langkettiger aliphatischer Alkohole und damit auch zu deren Bindung prinzipiell alle bekannten Alkoholdehydrogenasen besitzen, also auch solche, die z.B. speziell zur Oxydation von Methanol oder aromatischer Alkohole gebildet werden [9]. Man kann daher davon ausgehen, dass das hydrophobe Milieu in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums weniger für die Substratbindung bedeutsam ist, sondern vielmehr als notwendige Voraussetzung für die Realisierung des Hydridtransfers anzusehen ist. Aus dieser Sicht wäre eine grundsätzliche Fähigkeit zur Bindung an CD-Sepharose auch für andere Dehydrogenasen zu erwarten, wobei wegen der beträchtlichen strukturellen Unterschiedlichkeit der Substrate exakte Übereinstimmungen unwahrscheinlich sind. Die in Fig. 2 deutlich werdenden Bindungsunterschiede könnten somit auch auf dieser Basis erklärt werden.

#### *Elution durch Bildung binärer bzw. ternärer Enzym-Ligand-Komplexe*

Bei Weiterführung der Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich im Falle der L-ADH eine Elution des adsorbierten Enzyms nicht nur durch Verringerung

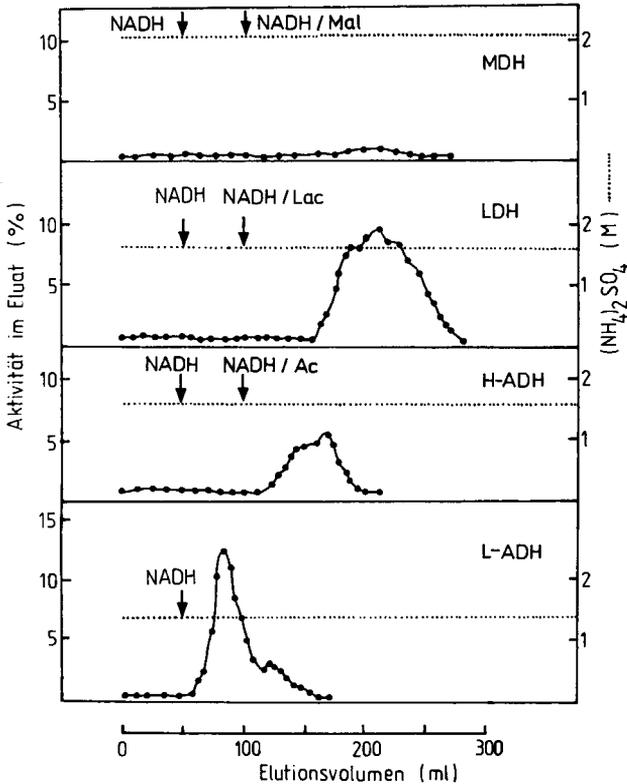


Fig. 4. Adsorption verschiedener Dehydrogenasen an CD-Sepharose in Anwesenheit hoher Ammoniumsulfatkonzentrationen und Elution durch Bildung binärer bzw. ternärer Enzym-Ligand-Komplexe. Die Bedingungen für die Adsorption entsprechen denen in Fig. 2. Die eingesetzten Ammoniumsulfatkonzentrationen lagen bei 2,1 M (MDH), 1,6 M (LDH und H-ADH) sowie 1,4 M (L-ADH). Für die Elution wurde zusätzlich NADH (0,4 mM), Acetamid (0,5 M) bzw. Lactat oder Malat (0,1 M) zugegeben.

der Ammoniumsulfatkonzentration von 1,4 M auf 1,2 M, sondern auch durch NADH-Zugabe unter Beibehaltung von 1,4 M Ammoniumsulfat erreichen lässt (Fig. 4). Eine Ablösung der anderen Enzyme gelang unter ähnlichen Bedingungen nicht. Demgegenüber liessen sich H-ADH durch gleichzeitige Zugabe von Acetamid, LDH durch gleichzeitige Zugabe von Lactat eluieren.

Es ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der Abdissoziation des NADH vom binären Enzym-Coenzym-Komplex mit  $k'_{-1} = 4,7 \text{ s}^{-1}$  im Falle der L-ADH ausserordentlich gering ist und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt [19]. Mit einer Dissoziationskonstante von  $K \approx 0,5 \mu\text{M}$  ist die Stabilität des Komplexes im Vergleich zu den anderen Dehydrogenasen sehr hoch. Die in Tabelle I zusammengestellten Daten korrelieren mit dem Elutionsverhalten in Fig. 4 ausserordentlich gut. Auch die Ablösung der H-ADH and LDH nach Acetamid- bzw. Lactatzugabe wäre erklärbar, da hierbei ternäre Komplexe gebildet werden, deren Stabilität grösser ist als die der entsprechenden binären Enzym-NADH-Komplexe [24, 25]. Ein charakteristisches Merkmal für die Wirkungsweise der untersuchten Dehydrogenasen ist eine obligatorische Bindungsfolge, nach der die

TABLE I

DISSOZIATIONSKONSTANTEN DER BINÄREN ENZYM—NADH-KOMPLEXE BZW. GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN DER NADH-DISSOZIATION FÜR VERSCHIEDENE DEHYDROGENASEN BEI pH 8 [18]

Enzym	$K_{\text{Enzym-NADH}} (\mu\text{M})$	$k'_{-1} (\text{s}^{-1})$
MDH (Schweineherz)	9,5	152
GAPDH (Kaninchenmuskel)	6,5	102
LDH (Schweineherz)	1,8	150*
H-ADH	12,5**	500**
L-ADH	0,62	4,7

\*LDH (Rinderherz), pH 9.

\*\*pH 7,0—7,1.

Substratbindung stets erst nach der Realisierung der Enzym—Coenzym-Wechselwirkung möglich ist. Ursache hierfür ist eine durch das Coenzym bewirkte Konformationsänderung am Enzym, in deren Folge die Bindung des Substrates erst möglich wird [15]. Bei Einbeziehung der Substratbindungsregion in die Wechselwirkung mit der CD-Sepharose wäre also eine Beeinflussung der Bindungsaffinität nach Coenzymbindung durchaus zu erwarten.

#### *Bindungsverhalten von H-ADH an Alkyl-Sepharosen*

Eine Reihe von Anzeichen sprechen dafür, dass im Elutionsprozess Konformationsänderungen dominieren, die für die Substratbindung von Bedeutung sind. Zur weiteren Charakterisierung dieser Wechselwirkung haben wir das Verhalten der H-ADH an verschiedenen Alkyl-Sepharosen untersucht. Die in Abhängigkeit von der Phosphat- und Enzymkonzentration durchgeführten Versuche ergaben die in Fig. 5 zusammengestellten Resultate. Bei Einsatz von Octyl-Sepharose zeigte sich im Gegensatz zu den bisher gemachten Beobachtungen, dass eine quantitative Adsorption des Enzyms bereits in verdünnten Pufferlösungen auftritt. An Hexyl-Sepharose wird das Enzym dagegen nur in Anwesenheit hoher Phosphatkonzentrationen quantitativ adsorbiert, während in verdünnten Pufferlösungen eine von der Proteinkonzentration abhängige partielle Adsorption erfolgt. Die Einführung einer zusätzlichen funktionellen Gruppe in  $\omega$ -Position des Alkylrestes der substituierten Sepharose führt zu einer beträchtlichen Verschlechterung der Enzymbindung, und zwar unabhängig davon, ob es sich um eine positiv oder negativ geladene Gruppe handelt. In allen Fällen ist wieder ein biphasischer Bindungsprozess in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration nachweisbar. In keinem Fall gelingt eine quantitative Adsorption des Enzyms. Am ungünstigsten macht sich der Einfluss einer Carboxylgruppe bemerkbar, der erst nach Verlängerung der  $\text{CH}_2$ -Kette aufgehoben wird. Dadurch ergibt sich das für CD-Sepharose typische Bindungsverhalten.

#### *Hemmstudien an H-ADH unter Verwendung homologer Inhibitoren*

Um eine Erklärung für das unterschiedliche Bindungsvermögen zu erhalten, haben wir eine grosse Zahl von Hemmstudien mit den löslichen Liganden durchgeführt und dabei eine Reihe weiterer widersprüchlicher Resultate

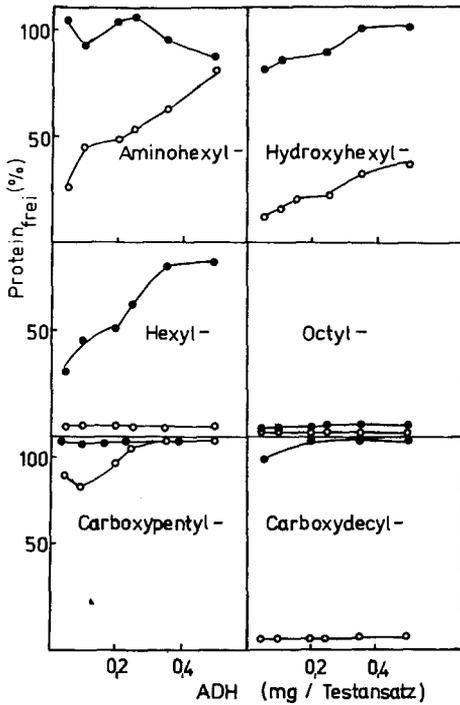


Fig. 5. Adsorption von H-ADH an verschiedenen Alkyl-Sepharosen bei pH 8,5 in 0,067 *M* Kaliumphosphatpuffer (●) bzw. 1 *M* Kaliumphosphatpuffer (○). Dargestellt ist die nach Äquilibration des Sepharosederivates mit H-ADH im Überstand verbleibende Proteinmenge (%) in Abhängigkeit von der Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms. Die 2 ml-Ansätze enthielten jeweils 0,25 ml gesetztes Sepharosegel. Die Herstellung der Sepharosederivate erfolgte durch Kopplung von 1,6-Diaminohexan, 6-Aminohexan-1-ol, Hexylamin, Octylamin, 6-Aminocapronsäure und 11-Aminoundecansäure an Bromcyan-aktivierte Sepharose.

TABELLE II

WIRKUNG VON INHIBITOREN AUS VERSCHIEDENEN HOMOLOGEN REIHEN AUF DIE REAKTION DER HEFE-ALKOHOLDEHYDROGENASE BEI pH 8

Kettenlänge des Inhibitors	$K_i$ (mM)			
	Diamin	Monoamin	Dicarbonsäure	Monocarbonsäure
<i>Variation der NAD<sup>+</sup>-Konzentration (0,164–0,82 mM) bei konstanter Ethylenglykolkonzentration (2 M)</i>				
C <sub>6</sub>	38 (C)	14 (C)*	90 (C)	38 (C)
C <sub>8</sub>	38 (C)	2,9 (C)	—	6 (C)
C <sub>10</sub>	—	—	45 (C)	7 (NC)**
<i>Variation der Ethylenglykolkonzentration (0,2–2 M) bei konstanter NAD<sup>+</sup>-Konzentration (0,82 mM)</i>				
C <sub>6</sub>	42 (C)	11 (C)	65 (C)	51 (C)
C <sub>8</sub>	42 (C)	1,7 (C)	—	7 (C)
C <sub>10</sub>	9 (C)	0,9 (C)	38 (C)	7 (NC)

\*C = Kompetitive Hemmung.

\*\*NC = Nichtkompetitive Hemmung.

erhalten. Bei Sättigung des Enzyms mit  $\text{NAD}^+$  erhält man ein eindeutiges Bild allein für den Hemmeffekt der Monoamine (Tabelle II). Alle sind kompetitive Inhibitoren, wenn die Alkoholkonzentration variiert wird. Dieser Hemmtyp stimmt mit anderen kinetischen Daten gut überein, nach denen unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei Verwendung von Ethylenglykol als Substrat das Enzym einem random bi bi Mechanismus folgt [9]. Die  $pK_i$ -Werte stehen in proportionaler Beziehung zur Kettenlänge des Alkylrestes und verhalten sich somit völlig analog zu den  $pK_m$ -Werten für homologe primäre Alkohole (Fig. 3). Im Bereich zwischen sechs und acht C-Atomen ergeben sich auch für Monocarbonsäuren ähnliche Verhältnisse.

Ein völlig anderes Bild erhält man bei Einsatz von Diaminen und Dicarbonsäuren als Inhibitoren. In allen Fällen nimmt die hemmende Wirkung im Vergleich zu den entsprechenden Monoverbindungen stark ab. Dies stimmt exakt mit dem beobachteten Adsorptionsverhalten der H-ADH an verschiedenen substituierten Alkyl-Sepharosen überein. Zusammen mit der Tatsache, dass die systematischen Beziehungen zwischen Hemmstärke und Kettenlänge des Alkylrestes verloren gehen, muss man daraus ableiten, dass sich die Bindungsverhältnisse ändern, wenn zusätzliche funktionelle Gruppen in den Liganden bzw. den Inhibitor eingeführt werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass mit 6-Aminocaprinsäure keinerlei Hemmeffekte erzielt werden konnten. Auch dies stimmt mit der ausserordentlich geringen Affinität des Enzyms gegenüber dem entsprechenden Sepharosederivat überein (Fig. 5). Wir nehmen an, dass in Abhängigkeit vom Abstand der geladenen Gruppen im Liganden bzw. deren Natur einerseits unterschiedliche Bereiche der Proteinregion, andererseits nur ein Teil des Liganden für den Bindungsprozess in Anspruch genommen werden können.

Unverständlich ist allerdings, dass die untersuchten Inhibitoren auch bei Sättigung des Enzyms mit dem Alkohol und Variation der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration wirksam werden (Tabelle II). Hierbei zeigen sich jedoch einige Besonderheiten. Am auffallendsten ist einerseits das völlige Fehlen einer Hemmung für Monoamine mit zehn C-Atomen, andererseits die teilweise numerische Identität der  $K_i$ -Werte in beiden Versuchsreihen. Hieraus ergeben sich erste Hinweise dafür, dass eine Wechselwirkung der substituierten Alkyl-Sepharosen unter bestimmten Bedingungen auch mit der Adeninbindungsregion, die Eigenschaften einer ausgeprägt hydrophoben, relativ begrenzten Fläche besitzt [15], möglich ist. Es wäre somit verständlich, dass einige Verbindungen besonders dann, wenn ihr Alkylrest eine bestimmte Länge überschreitet, an dieser Region nicht mehr gebunden werden können. Besonders eindrucksvoll lässt sich diese These stützen, wenn man den Umsatz von Alkandiolen durch H-ADH untersucht. Hierbei zeigt sich, dass die  $K_m$ -Werte, ähnlich wie bei den Alkanolen, systematisch mit der Kettenlänge abnehmen, dass jedoch nur für die mittelkettigen Alkohole das Phänomen einer ausgeprägten Substrathemmung nachweisbar ist (Fig. 6). Oberhalb einer Kettenlänge von acht C-Atomen lässt sich dieser Effekt, der kompetitiv gegenüber  $\text{NAD}^+$  ist [9], nicht mehr nachweisen. Problematisch ist dabei natürlich die Tatsache, dass einerseits die meisten der untersuchten Substanzen eine weitgehend ähnliche Hemmwirkung aufweisen, unabhängig davon, ob Substrat- oder Coenzymkonzentration variiert werden, und andererseits, dass der Hemmtyp in nahezu allen Fällen kompetitiv ist. Dies

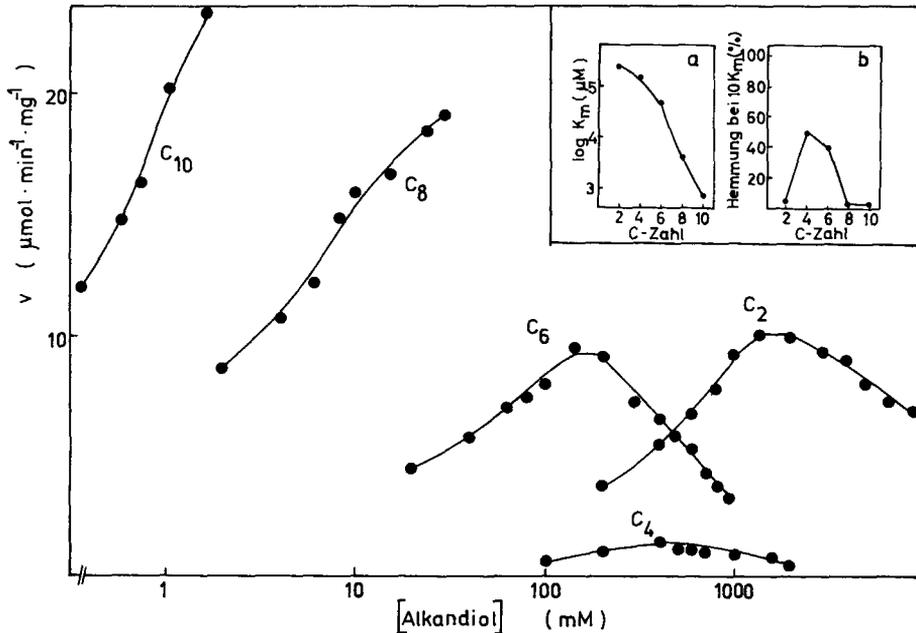


Fig. 6. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration beim Umsatz von Alkandiolen durch Hefe-Alkoholdehydrogenase. (a) Beziehungen zwischen den ermittelten  $K_m$ -Werten und der Kettenlänge des Substrates. (b) Beziehungen zwischen Hemmstärke bei Substratüberschuss und der Kettenlänge des Substrates.

deutet darauf hin, dass die Wechselwirkungen möglicherweise nicht direkt an der Substrat- bzw. Coenzymbindungsregion erfolgen, sondern an einer anderen Stelle, die offenbar infolge von Konformationsänderungen durch Substrat- bzw. Coenzymbindung nicht mehr für eine Inhibitorbindung verfügbar ist.

In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, dass die Bindung von Anilinsonaphthalensulfonsäure an H-ADH zwar kompetitiv zur  $\text{NAD}^+$ -Bindung erfolgt, als Bindungsort jedoch eine hydrophobe Nische zwischen den Subeinheiten angenommen wird, die nicht mit der Coenzymbindungsstelle identisch ist [26]. Somit käme für die Wechselwirkung eine Enzymregion in Betracht, die mit dem Subeinheitenkontakt in Beziehung steht. Da dieser jedoch erst durch die spezifische Kombination von katalytischer Domäne und Coenzymbindungsdomäne realisiert wird, wäre auch die komplexe Einbeziehung von Coenzym- und Substratbindungsregion verständlich, besonders wenn Konformationsänderungen im Gesamtprozess eine dominierende Rolle spielen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass Glycerol und andere Polyole an H-ADH Konformationsänderungen bewirken können, die zu einer bemerkenswerten Verringerung des  $K_m$ -Wertes sowohl gegenüber Ethanol als auch gegenüber  $\text{NAD}^+$  führen [27].

#### *Eigenschaften der H-ADH bei hoher Ionenstärke*

Die Realität von Konformationsänderungen auch in Abhängigkeit von der Ionenart und Ionenkonzentration kann aus einer Reihe weiterer Resultate abgeleitet werden. So zeigt sich, dass hohe Phosphatkonzentrationen zu

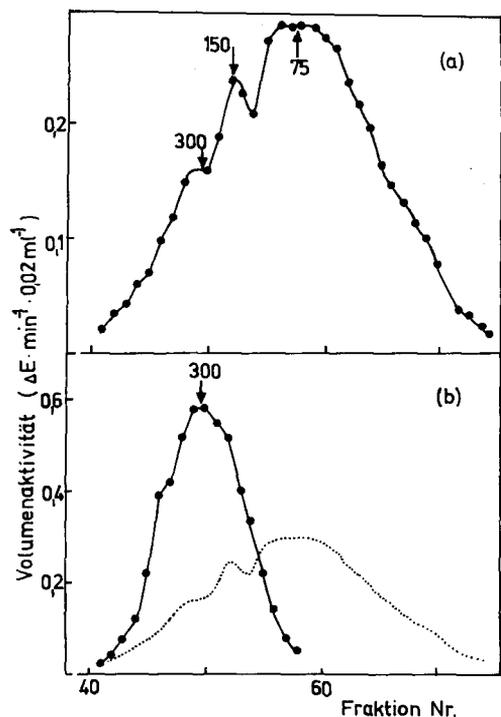


Fig. 7. Gelchromatographie von Hefe-Alkoholdehydrogenase an Sephadex G-200 bei 4°C. (a) 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0; (b) 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (—) und 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 (---). Aufgetragen wurden jeweils 0,2 mg Enzym auf eine 60 × 0,9 cm Säule. Gesammelt wurden Fraktionen von 0,43 ml, in denen ADH im Standardaktivitätstest bestimmt wurde. Als Eichproteine wurden Isocitratdehydrogenase, Aldolase, Catalase, Ovalbumin, Lactatdehydrogenase und Malatdehydrogenase verwendet. Die in der Abbildung enthaltenen Zahlen repräsentieren die aus der Eichkurve ermittelten Molekulargewichte (weitere Angaben siehe Lit. 9).

### TABELLE III

MAXIMALE REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT,  $K_m$ - UND  $K_s$ -WERTE FÜR DEN UMSATZ VON HEXANOL DURCH HEFE-ALKOHOLDEHYDROGENASE IN ANWESENHEIT HOHER IONENKONZENTRATIONEN BEI pH 8,0

Detaillierte Interpretation siehe Lit. 9.

	$k_{\text{kat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_s^{\text{NAD}^+}$ (μM)	$K_m^{\text{NAD}^+}$ (μM)	$K_m^{\text{Hex}}$ (mM)
0,067 M Phosphat	14,9	152	177	3,4
0,067 M Phosphat + 1 M Natriumchlorid	12,8	132	359	3,9
1 M Phosphat	75,2	225	263	2,6

deutlichen Veränderungen im UV-Differenzspektrum der H-ADH im Bereich von 280–300 nm führen [9]. Unter solchen Bedingungen liess sich mit Hilfe von Gelfiltrationsstudien eindeutig eine Proteinassoziation nachweisen (Fig. 7). Die veränderte Oligomerenstruktur kommt auch in den kinetischen Eigenschaften des Enzyms zum Ausdruck (Tabelle III). Bemerkenswert ist dabei die

fünffache Steigerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei Übergang von 0,067 *M* zu 1 *M* Phosphatpuffer, während Natriumchlorid keinerlei Effekt zeigt. Gleichzeitig erhöht sich die  $\text{NAD}^+$ -Bindungskonstante von Werten zwischen 100 und 150  $\mu\text{M}$  auf Werte von 200–250  $\mu\text{M}$ .

In diesem Zusammenhang ist das von Yamada und Yamato [28] postulierte "Dimer von Dimeren"-Modell der H-ADH interessant. Diese Autoren fanden mit nichtkinetischen Methoden, dass das Enzym 2 verschiedene  $\text{NAD}^+$ -Bindungsstellen besitzt, die negativ miteinander kooperieren. Die von der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration abhängigen Dissoziationskonstanten wurden zu 120 und 310  $\mu\text{M}$  ermittelt. Diese Daten liegen im Bereich der oben angegebenen Werte, wodurch ein weiterer Hinweis auf die enge Verflechtung von Konformationsänderungen, Oligomerenassoziation, Coenzym- bzw. Substratbindung und Salzkonzentration gegeben wird. Zusätzlich muss auch die Konzentration des Enzyms in dieses Konzept eingeordnet werden. Erste Hinweise hierfür hatten sich bereits aus dem biphasischen Bindungsverlauf der Adsorption (Fig. 5) ergeben. Dieser würde mit einer bei abnehmender Enzymkonzentration verstärkt auftretenden Oligomeren dissoziation im Einklang stehen. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen auch die Enzymaktivität stark von der Proteinkonzentration abhängt, wobei auf die Möglichkeit von reversibel ineinander umwandelbarer ADH-Formen ausführlich eingegangen wurde [9].

#### *Bindungsverhalten von Dehydrogenasen an $\text{NAD}^+$ - und Safranin-Sepharose*

Zur weiteren Klärung der Bedeutung von Coenzymbindung und Enzymkonformation für den Bindungsprozess von Dehydrogenasen an CD-Sepharose haben wir Untersuchungen mit immobilisiertem  $\text{NAD}^+$  einbezogen. Wir benutzten hierfür ein Präparat, das bei Einsatz von L-ADH und Ethanol eine Coenzymaktivität von etwa 1% des löslichen Coenzyms zeigt. Dies liegt im Bereich anderer  $\text{NAD}^+$ -Präparate [29, 30], obwohl nach Mosbach [31] Immobilisierungen über die Ribosereste zu Coenzym-inaktiven Präparaten führen sollten. Zusätzlich wurde mit Safranin-Sepharose ein immobilisierter Farbstoff, der ohne Spacer an die Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt wurde, in die Untersuchungen einbezogen.

Alle Versuche, an Säulen mit diesen Präparaten eine effektive Adsorption von Dehydrogenasen zu erzielen, schlugen fehl, wenn in verdünnten Puffersystemen gearbeitet wurde. Lediglich eine etwas verzögerte Elution der Enzyme war unter den Bedingungen des Auftrags (0,03–0,1 *M* Phosphatpuffer) zu registrieren. Die daraufhin durchgeführten quantitativen Untersuchungen zum Bindungsverhalten brachten — besonders nach Einbeziehung ähnlicher Experimente mit den Alkyl-Sepharosen — zumindest teilweise eine Erklärung für dieses unerwartete Verhalten. So wird aus Tabelle 4 deutlich, dass die Bindungsaffinität der H-ADH an  $\text{NAD}^+$ - und Safranin-Sepharose in 0,1 *M* Phosphatpuffer ausserordentlich gering ist und in der Grössenordnung der meisten Alkyl-Sepharosen liegt. Die Verhältnisse ändern sich auch hier signifikant, wenn in Anwesenheit hoher Phosphatkonzentrationen gearbeitet wird. Wie bei allen Alkyl-Sepharosen ist auch bei diesen beiden Präparaten eine enorme Erhöhung der Bindungsaffinität festzustellen.

Unter Einbeziehung der oben geführten Diskussion zur Wirksamkeit von

TABELLE IV

BINDUNGSDATEN FÜR DIE WECHSELWIRKUNG VON HEFE-ALKOHOL-DEHYDROGENASE MIT VERSCHIEDENEN SEPHAROSEDERIVATEN

Experimentelle Bedingungen siehe Experimentelles.

Sepharose-derivat	Substitutions-grad ( $\mu\text{mol/g}$ )	$K^*$ ( $\mu\text{M}$ )		$n^{**}$ ( $\mu\text{mol H-ADH pro g Sepharosederivat}$ )	
		0,1 M	1 M	0,1 M	1 M
		Phosphat (pH 8)	Phosphat (pH 8)	Phosphat (pH 8)	Phosphat (pH 8)
Hydroxyhexyl	65	5	0,15	0,4	0,3
Aminoheptyl	100	3,5	0,15	0,45	0,3
Carboxypentyl	70	10	0,3	0,1	0,2
Hexyl	35	1	0,12	0,4	0,5
Octyl	60	0,2	0,09	0,7	0,6
Carboxydecyl	70	10	0,08	0,1	0,7
Safranin	3	3	0,25	0,13	0,2
NAD <sup>+</sup>	7	4	0,15	0,4	0,6

\*  $K = [\text{H-ADH}][\text{NAD}^+\text{-Sepharose}]/[\text{H-ADH-NAD}^+\text{-Sepharose}]$ .

\*\* Bei Sättigung des Trägers mit Enzym.

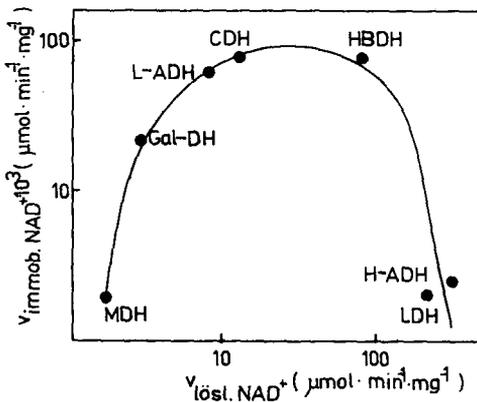


Fig. 8. Abhängigkeit der spezifischen Aktivität verschiedener Dehydrogenasen bei Einsatz von löslichem und immobilisiertem NAD<sup>+</sup> als Coenzym. Die 1,7 ml-Testansätze enthielten jeweils 1,6  $\mu\text{mol}$  lösliches NAD<sup>+</sup> oder 0,15 ml gesetzte NAD<sup>+</sup>-Sepharose und das jeweilige Substrat (siehe Experimentelles). Die Reaktion wurde in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 durchgeführt und im Falle des immobilisierten Coenzym mit jeweils 250  $\mu\text{g}$  Enzym gestartet. Die Untersuchungen in heterogener Phase wurden unter kontinuierlichem Rühren in der Kuvette mit Hilfe eines Magnetrührers durchgeführt [32].

Konformationsänderungen im Adsorptions-/Elutionsprozess hätte dieses Resultat weitreichende Bedeutung. Es zeigt, dass selbst bei Immobilisierung der echten Coenzyme oder diesen sehr ähnlichen Verbindungen nicht a priori eine effektive Enzym-Träger-Wechselwirkung gewährleistet sein muss. Diese These wird durch ein weiteres Experiment gefestigt. So lässt sich eine starke Abhängigkeit der Coenzymaktivität der NAD<sup>+</sup>-Sepharose von der Enzymreak-

tion, in der das Präparat eingesetzt wird, nachweisen (Fig. 8). Die erwartete lineare Beziehung zwischen löslichem und immobilisiertem Coenzym ist in keiner Weise erfüllt. Bei der bekannten Ähnlichkeit der Coenzymbindungsregionen in verschiedenen Dehydrogenasen war dieses Resultat nicht zu erwarten. Die starke Zunahme der Coenzymaktivität gegenüber H-ADH und LDH bei Erhöhung der Phosphatkonzentration [32] spricht auch hier dafür, dass eine zur Wechselwirkung geeignete Enzymkonformation möglicherweise erst geschaffen werden muss. Auch aus den Beziehungen zwischen der Enzymaktivität bei Einsatz von immobilisiertem  $\text{NAD}^+$  und der Enzymkonzentration lässt sich eine ähnliche Überlegung ableiten. Fig. 9 zeigt, dass beide Alkoholdehydrogenasen nicht das für Reaktionen in heterogener Phase typische

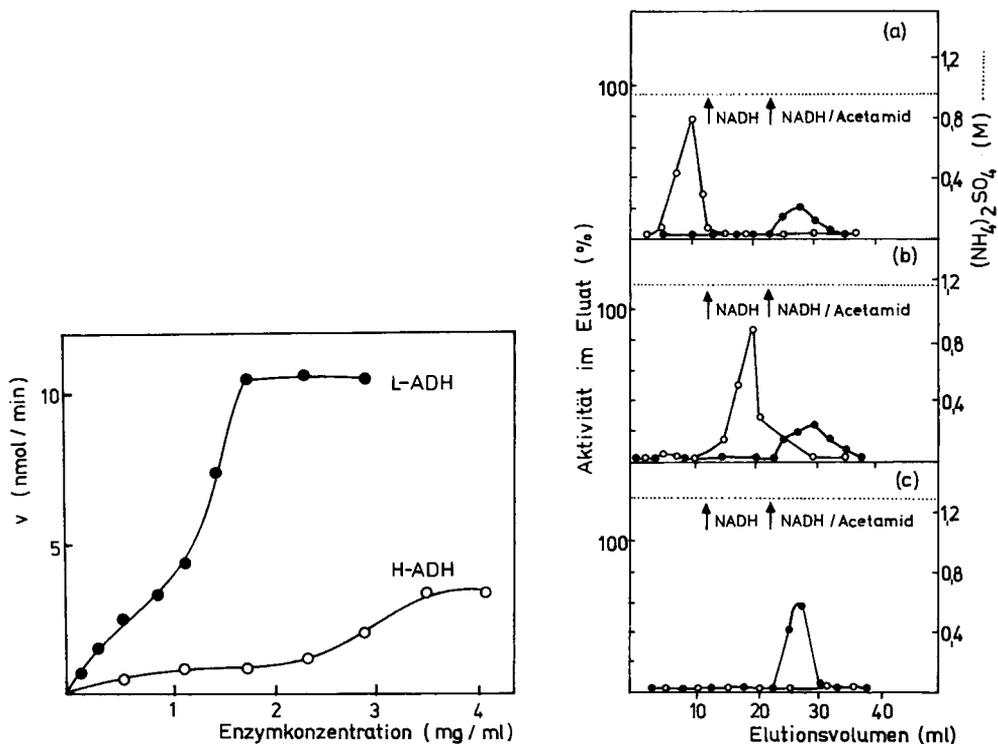


Fig. 9. Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten von der Enzymkonzentration beim Umsatz von immobilisiertem  $\text{NAD}^+$  durch L-ADH ( $\bullet$ ) und H-ADH ( $\circ$ ). Die 1,7 ml-Testansätze enthielten jeweils 0,025 ml gesetzte  $\text{NAD}^+$ -Sephrose und 1 mmol Ethanol in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 bzw. in 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 (H-ADH). Die Reaktion wurde mit Enzym gestartet.

Fig. 10. Adsorption von LDH und H-ADH an  $\text{NAD}^+$ -Sephrose in Anwesenheit hoher Ammoniumsulfatkonzentrationen und Elution durch Bildung binärer bzw. ternärer Enzyme-Ligand-Komplexe.  $\text{NAD}^+$ -Sephrose-Säulen (2 ml) wurden mit 0,55 M (a), 1,12 M (b) und 1,3 M (c) Ammoniumsulfatlösungen äquilibriert und anschliessend ein Gemisch von 0,1 mg LDH ( $\circ$ ) und 0,1 mg H-ADH ( $\bullet$ ) in 0,5 ml der jeweiligen Salzlösung aufgetragen. Die Elution wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt, wobei 5 ml-Fractionen gesammelt wurden. An den durch Pfeile gekennzeichneten Stellen wurde den Lösungen NADH (0,4 mM) bzw. Acetamid (0,5 M) zugesetzt.

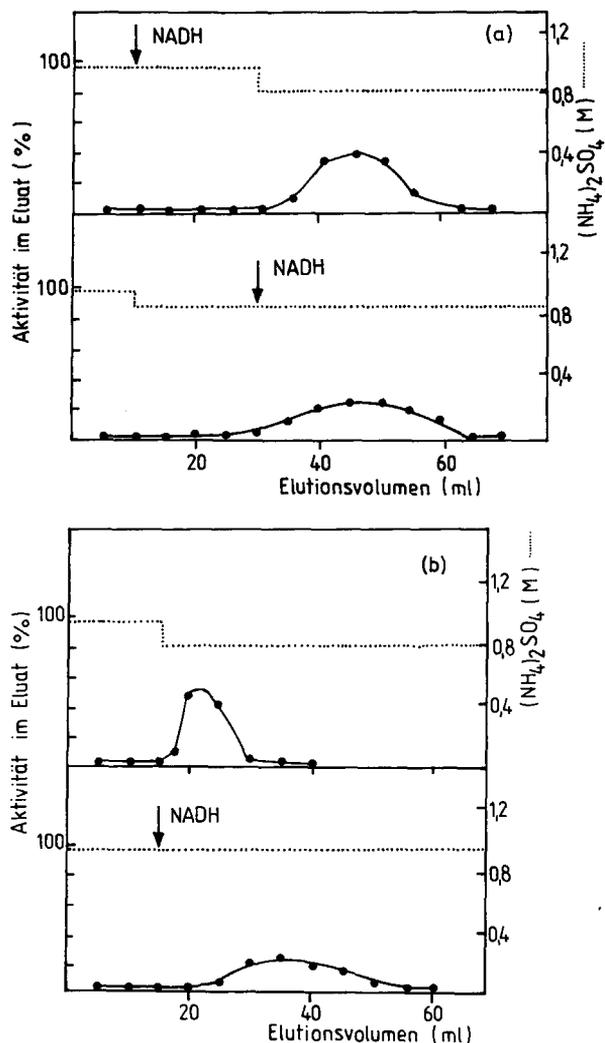


Fig. 11. Adsorption von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase an CD-Sepharose (a) bzw. Safranin-Sepharose (b) in Anwesenheit von 0,95 M Ammoniumsulfat und Elution durch NADH-Zugabe. Aufgetragen wurden jeweils 0,2 mg HBDH in 0,5 ml 0,95 M Ammoniumsulfatlösung. (a) Elution durch Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 0,8 M bzw. auf 0,85 M bei gleichzeitigem NADH-Zusatz (0,4 mM). (b) Elution durch Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 0,8 M bzw. durch NADH-Zusatz (0,4 mM) unter Beibehaltung der Ammoniumsulfatkonzentration (0,95 M).

Verhalten zeigen. Es ist eindeutig ein biphasischer Prozess nachweisbar, der dem Adsorptionsverhalten an den Alkyl-Sepharosen ähnelt (Fig. 5). Führt man die Trennversuche an NAD<sup>+</sup>- und Safranin-Sepharose unter Einbeziehung dieser Resultate in Anwesenheit hoher Konzentrationen strukturformierender Ionen durch, erhält man nunmehr ein eindeutiges Bild. So zeigen LDH und H-ADH an NAD<sup>+</sup>-Sepharose praktisch das gleiche Verhalten wie an CD-Sepharose (Fig. 10). Während eine effektive Adsorption beider Enzyme erst bei Ammoniumsulfatkonzentrationen oberhalb 1,1 M möglich ist, gelingt die

differenzierte Ablösung nach Bildung binärer bzw. ternärer Komplexe. Aus dem Verhalten der HBDH an Safranin- und CD-Sepharose (Fig. 11) wird deutlich, dass es auch im Bindungsverhalten an diesen Präparaten keine grundsätzlichen Unterschiede gibt, wenn nur die Ammoniumsulfatkonzentration hinreichend hoch ist. In beiden Fällen lässt sich eine komplette Elution sowohl durch NADH-Zugabe als auch durch Verringerung der Salzkonzentration erreichen.

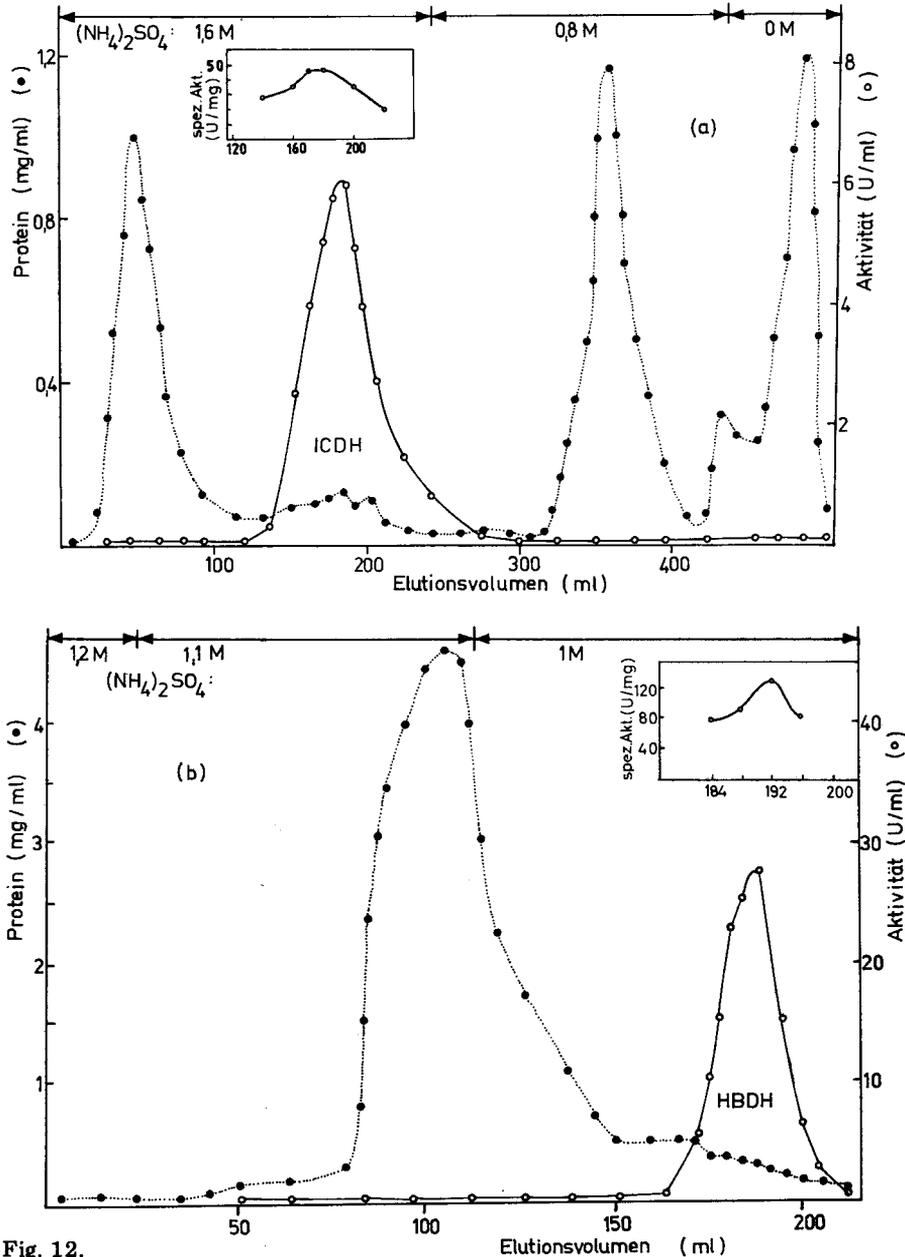


Fig. 12.

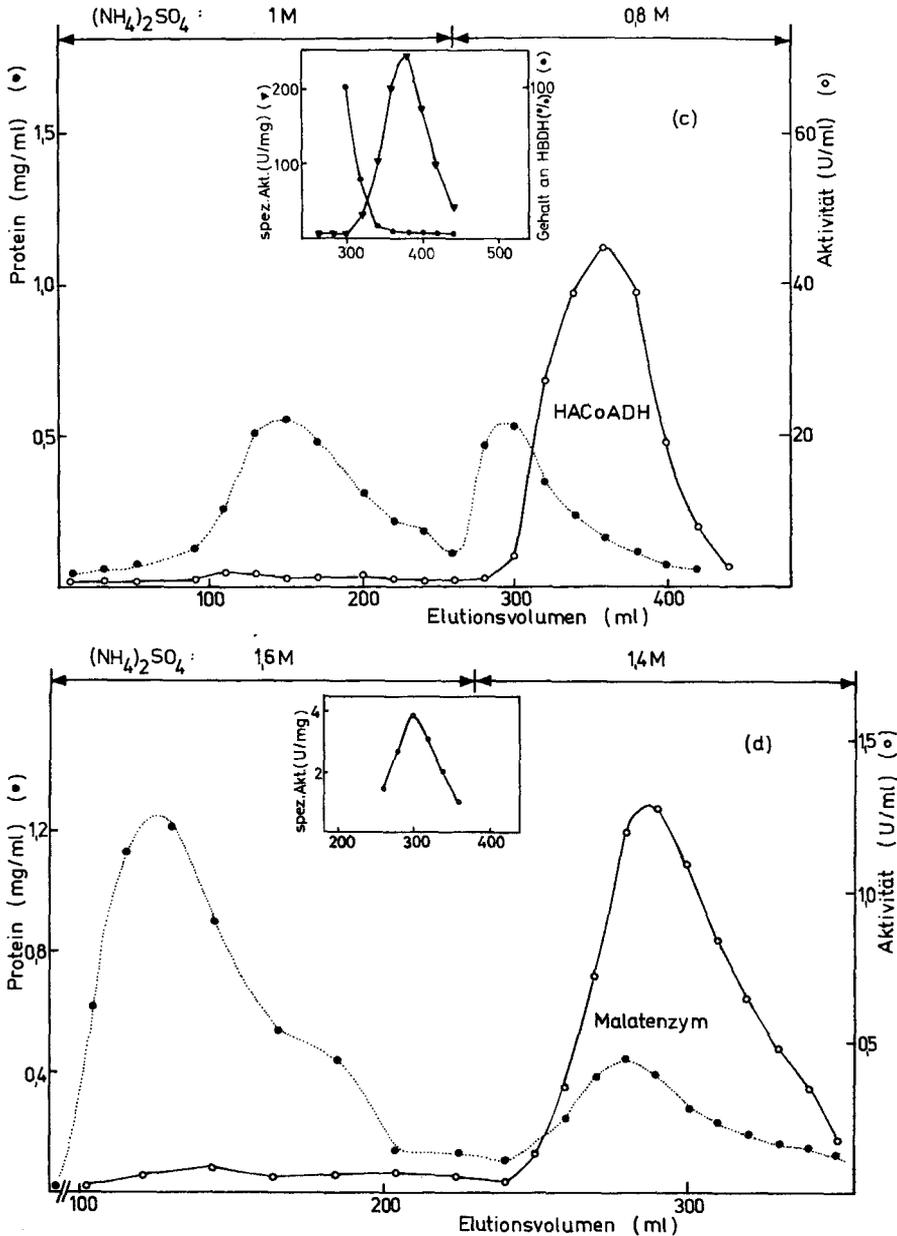


Fig. 12. Anreicherung verschiedener Dehydrogenasen aus Proteinextrakten von *Pseudomonas putida* an CD-Sepharose. Die Gewinnung der zellfreien Extrakte erfolgte nach Kultivierung von *Pseudomonas putida* BL 1 auf *n*-Hexan (a-c) bzw. auf D,L-Malat (d) durch Ultraschallaufschluss und Zentrifugation. Nach Ausfällen des gesamten Proteins durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zur Sättigung wurden die Enzyme nacheinander durch fraktionierte Ammoniumsulfatextraktion gelöst und auf die CD-Sepharose-Säulen (Bettvolumen 20 ml), die mit Salzlösungen gleicher Konzentration äquilibriert worden waren, aufgetragen. Folgende Mengen wurden eingesetzt: (a) Isocitratdehydrogenase: 400 mg Protein pro 90 ml 1,6 M Ammoniumsulfat; (b) 3-Hydroxybutyratdehydrogenase: 260 mg Protein pro 60 ml 1,2 M Ammoniumsulfat; (c) Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase: 480 mg Protein pro 115 ml 1,0 M Ammoniumsulfat; (d) Malatenzym: 310 mg Protein pro 90 ml 1,6 M Ammoniumsulfat. Weitere Bedingungen siehe Experimentelles.

### Anreicherung von Enzymen aus Proteinrohextrakten an CD-Sepharose

Wir haben die Verhaltensweise vieler anderer Enzyme an CD-, Safranin- und NAD<sup>+</sup>-Sephärose untersucht und stets ein ähnliches Bild erhalten. Als wichtigstes Resultat unserer Untersuchungen möchten wir somit die These aufstellen, dass das Adsorptionsverhalten von Dehydrogenasen an CD-Sephärose nicht weniger spezifisch als an den sogenannten "echten" Affinitätsmaterialien ist. Aus der Tatsache, dass die Enzyme selbst an einem Coenzym-aktiven NAD<sup>+</sup>-Präparat in verdünnten Pufferlösungen nur in geringem Umfang adsorbiert werden, lässt sich ableiten, dass auch bei Immobilisierung der natürlichen Enzymliganden keine Gewähr für eine effektive Proteinbindung gegeben ist. Die in den vergangenen Jahren eingesetzte grosse Zahl von immobilisierten Farbstoffen, an denen einzelne Enzyme sehr erfolgreich angereichert werden konnten [33], zeigt, dass es sich hier um Strukturen handelte, die höchstwahrscheinlich zufällig mit der jeweiligen in verdünnter Pufferlösung vorgegebenen Proteinkonformation in Wechselwirkung treten konnte. Die Beibehaltung dieses Konzeptes führt zwangsläufig zu dem Schluss, dass für jedes Enzym empirisch ein eigener Farbstoff gesucht werden muss, wenn Trennungen erfolgreich durchgeführt werden sollen.

Wir glauben, dass wir mit der von uns gewählten Verfahrensweise bei geringerem Aufwand zum gleichen Resultat kommen. Wir gehen dabei davon aus, dass Trägermaterialien vom Typ der CD-Sephärose strukturell hinreichend kompliziert sind, um spezifische Wechselwirkungen mit entsprechenden Proteinregionen auszubilden. Voraussetzung ist jedoch, dass eine geeignete Enzymkonformation durch Vorgabe einer bestimmten Konzentration eines strukturformierenden Ions erst geschaffen wird. Dadurch wären spezifische Trennungen an einem einheitlichen Trägermaterial allein durch Variation der Salzkonzentration möglich, wodurch eine jeweilige Anpassung des Enzyms an den Liganden erreicht wird. Ein weiterer erheblicher Vorteil dieser Ver-

TABELLE V

ANREICHERUNG PARTIELL GEREINIGTER HANDELSPRÄPARATE VON ENZYMEN AN CD-SEPHAROSE

Alle Versuche wurden an 5 ml-Säulen unter den in Experimentelles angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Enzyme	Aufgetragene Proteinmenge (mg)	Ammoniumsulfat konzentration (M)		Spezifische Aktivität (U/mg)		Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
		Adsorption	Elution	Ausgangslösung	Eluat		
MDH*	5	2,2	2	80	280	75	3,5
LDH*	5	2	1,2	102	195	68	1,9
G-6pDH**	5	2	1,6	135	245	50	1,8
Diaphorase**	17	1,6	1,4	1,2	15,5	43	13
Peroxidase**	20	2	2	80	230	60	2,9
Trypsin***	100	1,28	1	0,011	0,45	50	50
Chymotrypsin***	20	2,4	2	3500	13000	80	3,7
Papain §	78	1,4	1,2	0,004	0,047	22	12
Alkalische Phosphatase**	50	1,8	1,4	30	135	45	4,5

\* Arzneimittelwerk, Dresden, D.D.R.

\*\* Boehringer, Mannheim, B.R.D. (Grad II).

\*\*\* Leidholdt, Kleinmachnow, D.D.R.

§ Merck, Darmstadt, B.R.D.

fahrensweise ist, dass sich die Anwesenheit hoher Konzentrationen strukturformierender Ionen ausserordentlich günstig auf die Enzymstabilität auswirkt. Besonders geeignet ist eine Verfahrensweise, bei der man das gesamte Protein aus einem Rohextrakt durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällt und die gewünschten Enzyme durch Behandeln mit Ammoniumsulfatlösungen abnehmender Konzentration fraktioniert extrahiert. Diese Lösungen können direkt auf die Säulen aufgetragen werden, wodurch zeitraubende und verlustreiche Konzentrierungs- und Dialyseoperationen entfallen.

Zur Bestätigung unseres Konzeptes haben wir eine grosse Zahl von Dehydrogenasen aus mikrobiellen Rohextrakten angereichert und in allen Fällen überzeugende Resultate erhalten. In Fig. 12 sind stellvertretend die Elutionsprofile für vier Dehydrogenasen dargestellt. Dabei wurden beträchtliche Anreicherungen erzielt. ICDH: 96-fach (von 0,5 auf 48 U/mg); HBDH: 416-fach (von 0,3 auf 125 U/mg); HAcCoADH: 114-fach (von 2,1 auf 240 U/mg) und Malatenzym: 13-fach (von 0,3 auf 4 U/mg). In ähnlicher Weise konnten auch Carnitindehydrogenase und  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase gereinigt werden.

Aufbauend auf diesen Resultaten gelangten wir zu der Überzeugung, dass das Reinigungsprinzip nicht auf NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenasen begrenzt sein sollte, da praktisch alle Enzyme über hydrophobe Regionen verfügen. In der Tat gelang es uns, aus Rohextrakten von *Pseudomonas putida* auch Amindehydrogenase (EC 1.4.99), Superoxiddismutase (EC 1.15.11), Catecholdioxygenase (EC 1.13.11.2), Citratsynthase (EC 4.1.3.7), Fumarase (EC 4.2.1.2), Succinyl-CoA-transferase (EC 2.8.3.5) und Cytochrom c in der beschriebenen Weise anzureichern [34]. Wir haben darüber hinaus das Verhalten

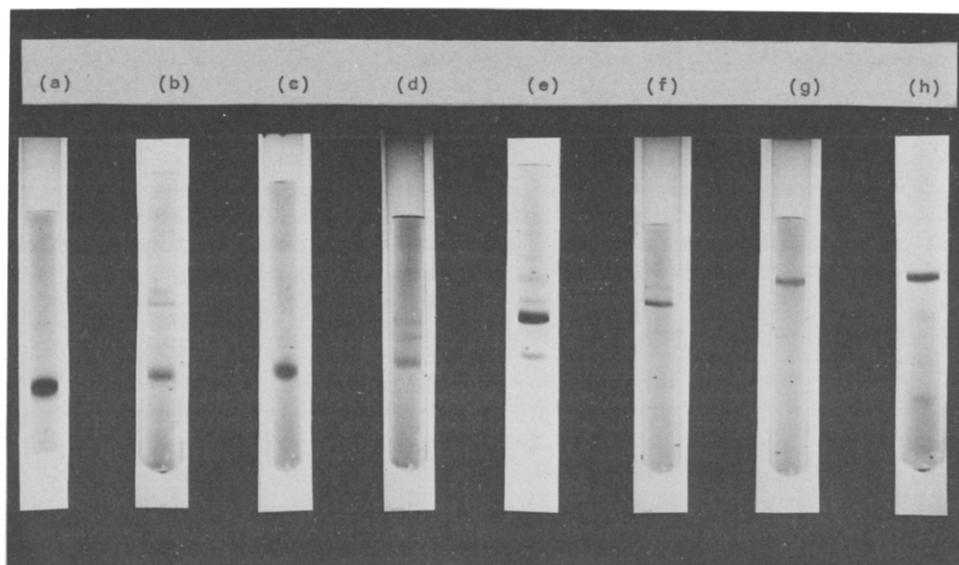


Fig. 13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [35] verschiedener Enzyme nach Anreicherung an CD-Sepharose. (a) Papain; (b) 3-Hydroxybutyratdehydrogenase; (c) Superoxiddismutase; (d) Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase; (e) Carnitindehydrogenase; (f) Diaphorase; (g) Alkalische Phosphatase; (h) Isocitratdehydrogenase.

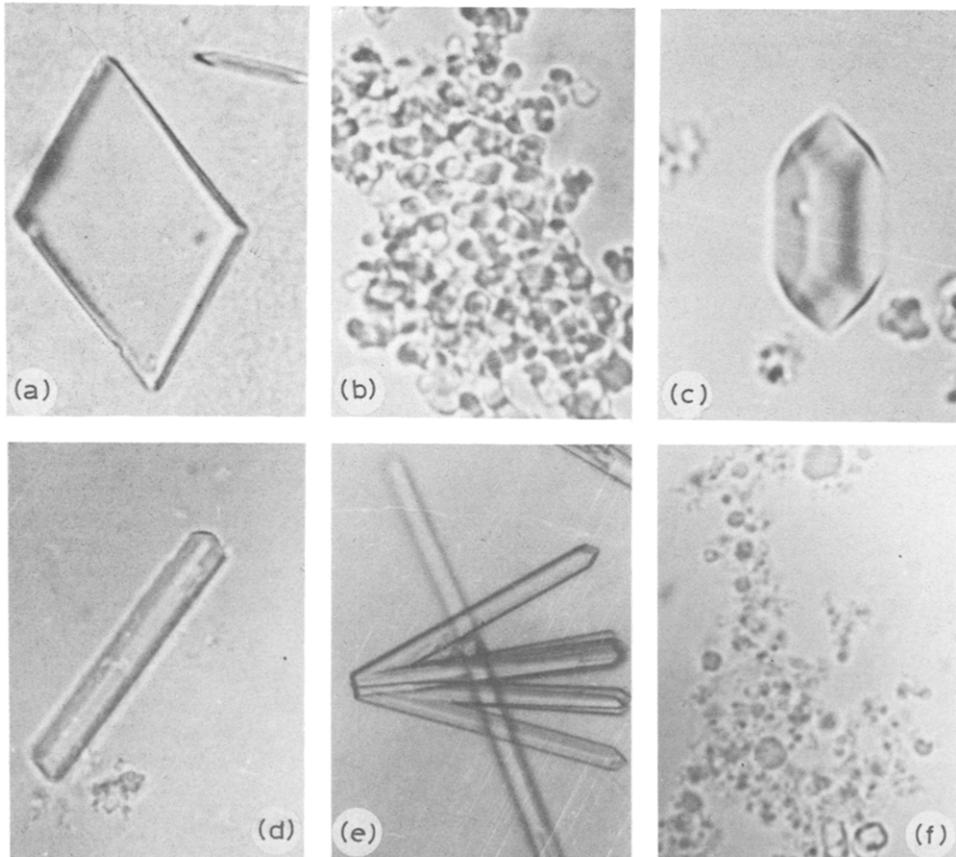


Fig. 14. Kristalline Präparate von Enzymen aus *Pseudomonas putida* nach Anreicherung an CD-Sepharose. (a) Amindehydrogenase; (b) Isocitratdehydrogenase; (c) Carnitindehydrogenase; (d) Malatenzym; (e) Superoxiddismutase; (f)  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase.

einer Reihe partiell angereicherter Handelspräparate von Enzymen an CD-Sepharose untersucht und ebenfalls in allen Fällen Anreicherungen erzielt (Tabelle V). Bei allen Präparationen liess sich in den Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten bei guter Qualität des Ausgangsmaterials in der SDS-Elektrophorese [35] im wesentlichen nur eine Proteinbande nachweisen (Fig. 13). Nach Konzentrierung kristallisierten die meisten Enzyme bei Dialyse gegen höher konzentrierte Ammoniumsulfatlösungen aus (Fig. 14).

#### Schlussfolgerungen

Bei niedriger Ionenstärke gibt es zwischen allen untersuchten Enzymen und CD-Sepharose keine Tendenz für eine Wechselwirkung entweder weil bindende Proteinregionen nicht verfügbar sind oder/und die ionischen Gruppierungen am Sepharosepräparat eine Bindung nicht zulassen. Durch Erhöhung der Konzentration an strukturformierenden Anionen werden Konformationsänderungen am Enzym bewirkt, wodurch Wechselwirkungen mit dem Träger möglich werden. Gleichzeitig wird ein vorhandener störender Einfluss ionischer

Gruppen zurückgedrängt. Es ist davon auszugehen, dass die Bindung über Bereiche der katalytischen Domänen realisiert wird. Dies könnte die Substratbindungsregion oder aber das katalytische Zentrum selbst sein. Zusätzlich muss man berücksichtigen, dass es durch die in Kombination mit der Coenzymbindungsdomäne realisierten Subeinheitenkontakte weitere Möglichkeiten komplizierter Wechselbeziehungen gibt.

Trägermaterialien mit amphiphatischen Ampholyten als Liganden (z.B. vom Typ der CD-Sepharose) sind somit hervorragend für effektive Proteintrennungen geeignet. Bei variierender Konzentration strukturformierender Anionen werden einerseits hydrophobe Wechselwirkungen, die im Gesamtprozess dominierend sind, durch ionische Beziehungen kontrolliert, andererseits Proteinkonformationen so modifiziert, dass Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial grundsätzlich erst möglich werden. Die wichtigste Voraussetzung für das Gelingen der Trennungen ist eine spezifische Kombination hydrophober und ionischer Eigenschaften im Liganden, so dass in verdünnten Pufferlösungen eine Affinität der Enzyme zum Träger nicht vorhanden ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Durch Chromatographie an 10-Carboxydecyl-Sepharose konnten mehr als zwanzig Enzyme verschiedener Klassen aus mikrobiellen Rohextrakten bzw. wenig gereinigten Handelspräparaten bis zur Homogenität angereichert werden. Alle Enzyme wurden bei hohen Konzentrationen strukturformierender Anionen (Phosphat, Sulfat, Citrat) an das Säulenmaterial adsorbiert, während eine selektive Elution mit abnehmender Salzkonzentration erfolgte. Aus den Eluatn erhält man nach Dialyse gegen Ammoniumsulfatlösungen in der Regel kristalline Präparate. Diese Resultate weisen auf ein echtes Affinitätsprinzip hin, das offenbar auf der Fähigkeit strukturformierender Ionen zur Modifizierung der Enzymkonformation beruht. Voraussetzung ist die Immobilisierung eines Liganden, der eine spezifische Kombination hydrophober und ionischer Eigenschaften aufweist, so dass eine Affinität der Enzyme zum Trägermaterial lediglich bei hoher Salzkonzentration, nicht aber in verdünnten Pufferlösungen vorhanden ist.

#### LITERATUR

- 1 S. Shaltiel, *Methods Enzymol.*, 104 (1984) 69.
- 2 J. Porath, in T.C.J. Gribnau, J. Visser und R.J.F. Nivard (Herausgeber), *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Elsevier, Amsterdam, 1982, S. 3.
- 3 R.J. Yon und R.J. Simmonds, *Biochem. J.*, 151 (1975) 281.
- 4 P.M. Cuatrecasas, M. Wilchek und C.B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 61 (1968) 636.
- 5 C.R. Lowe, *Eur. J. Biochem.*, 73 (1977) 265.
- 6 P. O'Carra, S. Barry und T. Griffin, *Methods Enzymol.*, 34 (1974) 108.
- 7 J. Porath, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 241.
- 8 W. Schöpp, M. Grunow, H. Tauchert und H. Aurich, *FEBS Lett.*, 68 (1976) 198.
- 9 W. Schöpp, Dissertation B, Karl-Marx-Universität, Leipzig, 1978.
- 10 W. Schöpp und H. Aurich, *Biochem. J.*, 157 (1976) 15.
- 11 W. Schöpp und R. Lorenz, *Acta Biol. Med. Ger.*, 39 (1980) 335.
- 12 W. Schöpp, C. Toaspern und H. Tauchert, *J. Basic Microbiol.*, 25 (1985) 187.

- 13 W. Schöpp und A. Schäfer, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 320 (1985) 285.
- 14 V.F. Kalb und R.W. Bernlohr, *Anal. Biochem.*, 82 (1977) 362.
- 15 M.R. Rossmann, A. Lilius, I. Bränden und L. Banaszak, in P.D. Boyer (Herausgeber), *The Enzymes*, Vol. 11, Academic Press, New York, 1975, S. 62.
- 16 T. Fujita, Y. Suzuki, J. Yamauti, I. Takagahara, K. Fujii, J. Yamashita und T. Horio, *J. Biochem.*, 87 (1980) 89.
- 17 H. Sund und H. Theorell, in P.D. Boyer (Herausgeber), *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York, 1963, S. 25.
- 18 C.I. Bränden, H. Jörnvall, H. Eklund und B. Furugren, in P.D. Boyer (Herausgeber), *The Enzymes*, Vol. 11A, Academic Press, New York, 1975, S. 103.
- 19 K. Dalziel, in P.D. Boyer (Herausgeber), *The Enzymes*, Vol. 11A, Academic Press, New York, 1975, S. 2.
- 20 W. Schöpp und H. Aurich, *Acta Biol. Med. Ger.*, 31 (1973) 19.
- 21 J.C. Mani, R. Pietruszko und H. Theorell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 140 (1970) 52.
- 22 R. Pietruszko, K. Crawford und D. Lester, *Arch. Biochem. Biophys.*, 159 (1973) 50.
- 23 A.D. Winer und H. Theorell, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 1792.
- 24 F.M. Dickinson, *Biochem. J.*, 120 (1970) 821.
- 25 A.D. Winer und G.W. Schwert, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1155.
- 26 F.M. Dickinson, *FEBS Lett.*, 15 (1971) 17.
- 27 J.S. Myers und W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 3785.
- 28 T. Yamada und M. Yamato, *J. Biochem.*, 74 (1973) 971.
- 29 M. Lindberg, P.-O. Larsson und K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.*, 40 (1973) 187.
- 30 H.-L. Schmidt und G. Grenner, *Eur. J. Biochem.*, 67 (1976) 295.
- 31 K. Mosbach, *Adv. Enzymol.*, 44 (1978) 205.
- 32 R. Lorenz, Dissertation A, Karl-Marx-Universität, Leipzig, 1981.
- 33 C.R. Lowe und J.C. Pearson, *Methods Enzymol.*, 104 (1984) 97.
- 34 W. Schöpp, M. Grunow, C. Toasperm und A. Simon, nicht veröffentlichte Ergebnisse.
- 35 K. Weber und M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4406.