

CHROM. 6366

**Note****Verbesserte säulenchromatographische Bestimmung N<sup>ε</sup>-methylierter Lysine in physiologischen Flüssigkeiten**

Die Tatsache, dass N<sup>ε</sup>-methylierte Lysine erst spät in biologischem Material (Flagellin, Histone, Plasma, Cytochrom *c*, Urin, Myosin, Actin)<sup>1</sup> entdeckt wurden, zeigt, dass eine Auftrennung dieser basischen Aminosäuren schwierig ist. Unter den Bedingungen der konventionellen Aminosäure-Analyse nach MOORE UND STEIN werden N<sup>ε</sup>-methylierte Lysine nicht getrennt. Aus diesem Grund wurden von den einzelnen Untersuchern die verschiedensten Modifikationen zur Bestimmung dieser Verbindungen angegeben. Diese Methoden haben aber entweder den Nachteil, dass sie eine lange Analysenzeit<sup>2-5</sup> beanspruchen oder nur bei idealen Mengenverhältnissen der Aminosäuren<sup>6</sup> bzw. bei Abwesenheit einzelner Aminosäuren wie 1- oder 3-Methylhistidin<sup>7</sup> eine ausreichende Trennung gewährleisten.

Wir fanden, dass sich das Kationenaustauscher-Harz M-82 von der Firma Beckman, München, wesentlich besser für diese Trennung eignet als bisher benutzte Harzsorten (z.B. Aminex A-5, M-81, PA-35, Durrum DC-2). Durch die Korngrösse des M-82 von rund 20  $\mu$  gegenüber 10-15  $\mu$  der anderen Harze konnte trotz tiefer Temperatur (30°), hoher Durchflussrate (60 ml/h) und grosser Säulenlänge (0.9  $\times$  58 cm) mit geringen Drucken (10-12 Atm) gearbeitet werden.

**Säulenchromatographie und Diskussion**

Fig. 1 zeigt die Trennung eines synthetischen Aminosäuregemisches, das ausser den methylierten Lysinen (N<sup>ε</sup>-Monomethyllysin, N<sup>ε</sup>-Dimethyllysin, und N<sup>ε</sup>-Trimethyllysin) noch Ornithin, Hydroxylysin, Lysin, Histidin und 1-Methyl-

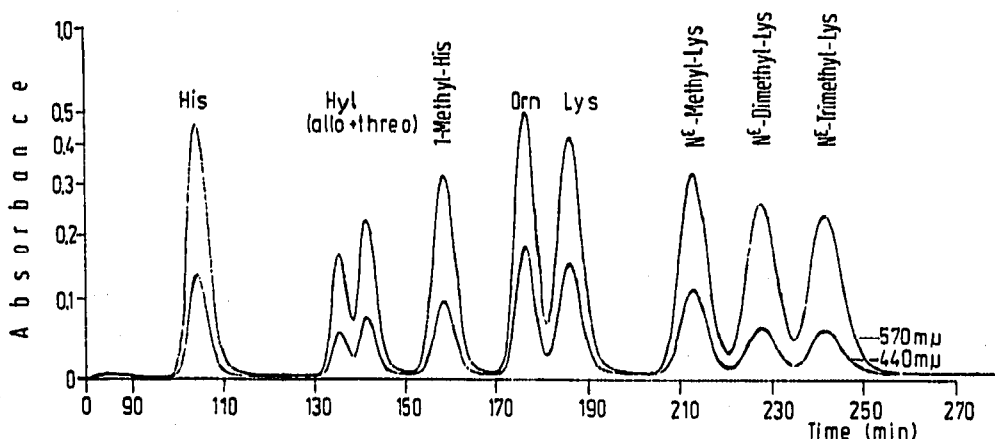


Fig. 1. Auftrennung eines synthetischen Aminosäuregemisches. Säule, 0.9  $\times$  58 cm; Harz, M-82; Puffer, Na-Citrat, pH = 6.92, 0.35 N; Temperatur, 30°; Durchflussrate, 60 ml/h; Küvetten-schichtdicke, 10 mm. Das Gemisch enthält ca. 0.15  $\mu$ Mol jeder Aminosäure.

histidin enthielt. 3-Methylhistidin wird unter den von uns gewählten Bedingungen zusammen mit Histidin und Tryptophan mit Trimethyllysin eluiert. Grössere Mengen an Ammoniak stören nicht, da der Ammoniak-Peak erst 75 min nach dem  $N^{\epsilon}$ -Trimethyllysin eluiert wird. Die Reproduzierbarkeit des säulenchromatographischen Verfahrens beträgt  $\pm 2\%$ . Die Trennung wurde mit dem Aminosäureanalysator "Unichrom" der Firma Beckman, München, ausgeführt. Es ist wichtig, dass der pH-Wert des Puffers eingehalten wird, da sich sonst die Trennung zwischen  $N^{\epsilon}$ -Dimethyllysin und  $N^{\epsilon}$ -Trimethyllysin stark verschlechtert.

Fig. 2 zeigt zwei Anwendungsbeispiele. Abbildung A gibt einen Ausschnitt der Analyse basischer Aminosäuren einer Urinprobe wieder. Die Probe wurde vorher durch Dowex 50W-X8,  $H^+$ -Form (Säule  $0.9 \times 5$  cm), von störenden Begleitstoffen sowie von neutralen und sauren Aminosäuren befreit und anschliessend hydrolysiert ( $6 N HCl$ ,  $110^{\circ}$ , 24 h). Die Hydrolyse zerstört unter anderem Tryptophan, das die Bestimmung von Trimethyllysin beeinträchtigen könnte.

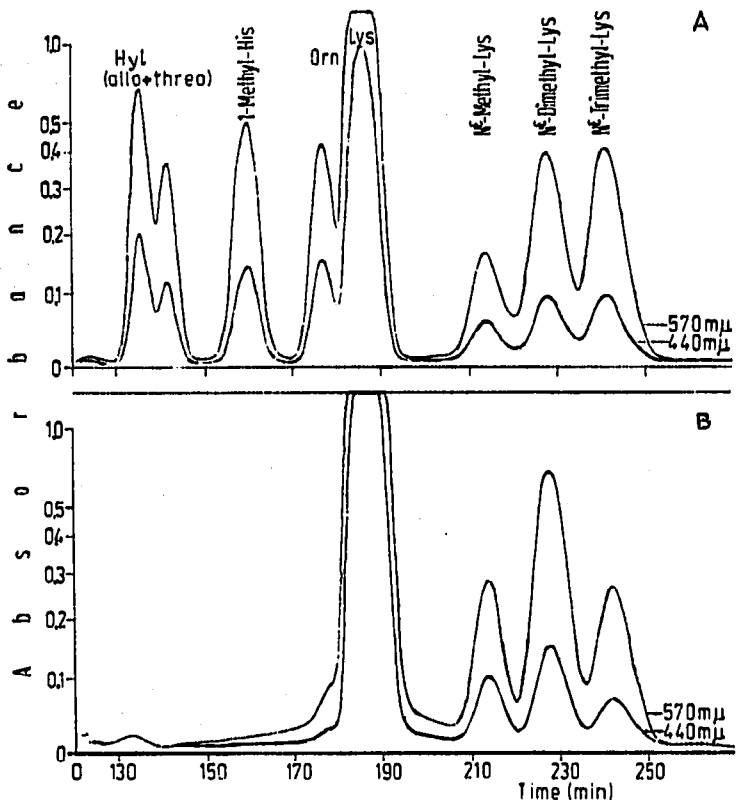


Fig. 2. (A) Analyse einer Urinprobe (= 3.5 mg Kreatinin). (B) Analyse eines Histonhydrolysats (7.28 mg  $F_3$ -Fraktion aus Asciteszellen). Analysen-Bedingungen siehe Fig. 1.

In Abbildung B der Fig. 2 wurden 7.28 mg  $F_3$ -Histonhydrolysat von Asciteszellkernen<sup>9</sup> aufgetragen. Eine Vortrennung an Dowex 50W-X8 war nicht erforderlich, da hier ein reines Protein vorlag.

$F_3$ -Histone aus Asciteszellen enthalten nach LANGE<sup>9</sup> 10.3 Mol% Lysin,

0.20 Mol % N<sup>ε</sup>-Monomethyllysin, 0.63 Mol % N<sup>ε</sup>-Dimethyllysin und 0.35 Mol % N<sup>ε</sup>-Trimethyllysin. Wie Fig. 2B zeigt, können methylierte Lysine selbst in Gegenwart eines 20- bis 50-fachen Überschusses an Lysin gut bestimmt werden.

Selbst bei Plasmaproben, die extremste Mengenverhältnisse zwischen Lysin und N<sup>ε</sup>-methylierten Lysinen aufweisen, ergibt die beschriebene Methode sehr gute Trennungen<sup>9</sup>.

*Inst. f. Med. Strahlenkunde  
der Universität Würzburg,  
87 Würzburg (B.R.D.)*

H. W. LANGE\*  
R. LÖWER  
K. HEMPEL

- 1 W. K. PAIK UND S. KIM, *Science*, 174 (1971) 114 (Zusammenfassung).
- 2 R. I. DE LANGE, A. N. GLAZER UND E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 3325.
- 3 W. K. PAIK UND S. KIM, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 (1967) 479.
- 4 K. HEMPEL, H. W. LANGE UND L. BIRKOFER, *Naturwissenschaften*, 55 (1968) 36; *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 603.
- 5 M. F. HARDY, C. I. HARRIS, S. V. PERRY UND D. STONE, *Biochem. J.*, 120 (1970) 653.
- 6 Y. KAKIMOTO UND S. AKAZAWA, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5751.
- 7 I. H. SEELY, R. EDATTEL UND N. L. BENOITON, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 618.
- 8 H. W. LANGE, *Dissertation*, Köln, 1968.
- 9 H. W. LANGE, R. LÖWER UND K. HEMPEL, *Z. Physiol. Chem.*, (1972) in press.

Eingegangen am 25. September 1972

---

\* Adresse: Dr. H. W. Lange, Inst. f. Med. Strahlenkunde der Universität Würzburg, 87 Würzburg, Versbacher Landstr. 5, B.R.D.