

## Herstellung einer spezifisch substituierten Sepharose zur Affinitätschromatographie von Enzymen, die *myo*-Inosit umsetzen

(Kurze Mitteilung)

Von

**F. Koller** und **O. Hoffmann-Ostenhof**

Aus dem Institut für Allgemeine Biochemie der Universität Wien  
und der Ludwig-Boltzmann-Forschungsstelle für Biochemie in Wien,  
Österreich

(Eingegangen am 24. Januar 1974)

*Synthesis of a Specifically Substituted Sepharose Derivative for the Affinity Chromatography of Enzymes Acting on myo-Inositol*

Manche Enzyme, welche Umsetzungen des *myo*-Inosits katalysieren, sind den konventionellen Methoden der Enzymisolierung und -reinigung kaum zugänglich. Dies veranlaßte uns, ein Gel herzustellen, das auf Grund seiner chemischen Zusammensetzung für die Affinitätschromatographie solcher Enzyme geeignet sein sollte. Wir gingen dabei von DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon aus, einer Verbindung, die sich vom *epi*-Inosit ableitet. Es wurde damit beabsichtigt, eine Konfiguration, die die charakteristische Konfiguration äquatorial—axial—äquatorial der C-Atome 1 bis 3 des *myo*-Inosits im Gel enthält, frei zugänglich zu erhalten. Allerdings entspricht dabei die äquatoriale Hydroxylgruppe am C-4 des *myo*-Inosits einer axialen Hydroxylgruppe im Derivat des *epi*-Inosits, doch dürfte das unter Berücksichtigung der durch Substituierung am gleichen Kohlenstoffatom zu erwartenden sterischen Hinderung wenig Einfluß auf die Spezifität der Affinität ausüben.

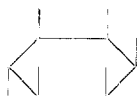
Bisherige Versuche, über die demnächst ausführlich berichtet werden soll, zeigen, daß das Gel, dessen Herstellung hier beschrieben ist, tatsächlich spezifisch Enzyme, die am Stoffwechsel des *myo*-Inosits katalytisch beteiligt sind, adsorbiert, und daß die Enzyme dann mit Hilfe einer gepufferten Lösung von *myo*-Inosit von der Säule wieder abgelöst werden können. Derartige Beobachtungen wurden bisher an der *myo*-Inosit-Oxygenase (EC 1.13.99.1) aus Hafer, an *myo*-Inosit-

1-phosphat-synthase (EC 5.5.1.4) aus Hühner-Reticulozyten sowie an *myo*-Inosit-phosphorylierenden Enzymen aus demselben Material gemacht.

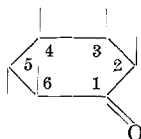
### Experimenteller Teil

4-C-[N(Äthylamino)aminomethyl]-DL-*epi*-inosit. DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon wurde nach *Posternak*<sup>1</sup> durch kontrollierte Oxidation von *myo*-Inosit mit Salpetersäure und darauffolgende Reinigung über das Phenylhydrazon und das Pentaacetat dargestellt.

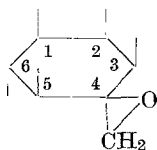
Aus diesem Pentahydroxycyclohexanon wurde nunmehr, ebenfalls im wesentlichen nach einer Vorschrift von *Posternak*<sup>2</sup>, DL-4,7-Anhydro-4-



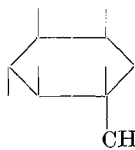
*epi*-Inosit



D-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon



L-4,7-Anhydro-4-hydroxymethyl-*epi*-inosit



L-4-C[N(Äthylamino)aminomethyl]-*epi*-inosit

(Der Einfachheit halber wird jeweils nur eines der beiden Enantiomeren dargestellt.)

hydroxymethyl-*epi*-inosit hergestellt; im Vergleich zur ursprünglichen Methode wurde die eingesetzte Menge von Diazomethan etwas reduziert, ohne daß dadurch die Ausbeute geringer wurde. Diazomethan (aus 5 g N-Nitrosomethylharnstoff) in etwa 50 ml Diäthyläther ergab mit 0,7 g Pentahydroxycyclohexanon im Durchschnitt 0,5 g DL-4,7-Anhydro-4-hydroxymethyl-*epi*-inosit.

Zur Herstellung von DL-4-C[N(Äthylamino)aminomethyl]-*epi*-inosit wurden nun in Analogie zu einer Vorschrift von *May* und *Mosettig*<sup>3</sup> 0,5 g des zuletzt erhaltenen Produkts mit 0,3 ml Äthylendiamin in 3 ml absol. Methanol 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde die Base durch tropfenweise Zugabe von 1 ml Petroläther (30–60°) und darauffolgendes 24stdg. Stehenlassen ausgefällt. Das semikristalline Produkt wurde nach Abdekantieren der überstehenden Lösung in Methanol aufgenommen und durch Zugabe von HCl-gesätt. Methanol gegen Kongorot neutralisiert. Das so erhaltene rohe Hydrochlorid (etwa 380 mg) wurde durch Umkristallisieren aus Wasser/Methanol gereinigt, wobei etwa 310 mg erhalten wurden; das Produkt zersetzt sich ab 145° in der Kapillare. Durch Behand-

lung mit ammoniak-gesätt. Methanol oder mit methanol. NaOH kann das freie Amin wiedergewonnen werden (etwa 250 mg). Die angenommene Struktur konnte durch IR- und NMR-Spektroskopie bestätigt werden.

*Kopplung mit Sepharose.* 100 ml Sepharose 4 B (Pharmacia, Uppsala) wurden mit Wasser azidfrei gewaschen, dann nach *Cuatrecasas* und *Anfinsen*<sup>4</sup> mit 30 g BrCN bei 20 °C und pH 11 aktiviert und sofort anschließend mit 10 g  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure gekoppelt. Nach 15stdg. Rühren wurde das Gel abfiltriert und mit je 1 l 0,1M-NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, 0,01M-HCl, 0,5M-NaCl-Lösung sowie Wasser und schließlich mit 800 ml wäbr. Pyridin (80%, *v/v*) gewaschen. Nach Überführen des Gels in einen 500 ml Erlenmeyer-Kolben gab man nun abwechselnd in kleinen Portionen insgesamt 0,5 g DL-4-C[N(Äthylamino)aminomethyl]-*epi*-inosit in 10 ml Wasser und 40 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 100 ml Pyridin zu. Das verschlossene Gefäß wurde danach 10 Tage bei Zimmertemp. geschüttelt. Man filtrierte das Gel ab und wusch mit je 1 l Wasser, Äthanol, 40° warmem n-Butanol, Äthanol, wiederum mit Wasser und zuletzt mit wäbr. Pyridin (80%, *v/v*). Danach wurde das Gel wiederum im ersten Filtrat suspendiert und nach Zugabe von weiteren 10 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid 1 Woche geschüttelt. Nach Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges (unter Weglassung des Pyridins) wurde noch anschließend mit 1mM-HCl (30 Min.), eiskalter 0,1M-NaHCO<sub>3</sub> (5 Min.), 0,5M-NaCl-Lösung und zuletzt mit viel Wasser gewaschen.

Das so erhaltene Gel ist, wenn es in etwa dem doppelten Volumen Wasser bei + 4° aufbewahrt wird, weitgehend haltbar.

## Literatur

- <sup>1</sup> T. Posternak, *Biochem. Preparations* **2**, 62 (1952).
- <sup>2</sup> T. Posternak und J. G. Falbriard, *Helv. Chim. Acta* **43**, 2142 (1960).
- <sup>3</sup> E. L. May und E. Mosettig, *J. Org. Chem.* **16**, 1471 (1951).
- <sup>4</sup> P. Cuatrecasas und C. B. Anfinsen, in: *Methods in Enzymology* (S. Colowick und N. O. Kaplan, Hrsg.), Bd. XXII, S. 345. 1971.

Prof. Dr. O. Hoffmann-Ostenhof  
Institut für Allgemeine Biochemie  
Universität Wien  
Währinger Straße 38  
A-1090 Wien  
Österreich