

Anwendung der Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose zum Nachweis und zur Reinigung von *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase in Erythrocyten von Hühnern und in *Lemna gibba*

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclitol, 32. Mitt.¹

Von

R. Schwarz, W. Fried, F. Pittner und O. Hoffmann-Ostenhof

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

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 12. Februar 1974)

Studies on the Biosynthesis of Cyclitols, XXXII: Application of Affinity Chromatography on NAD-Sepharose to the Identification and Purification of myo-Inositol-1-phosphate Synthase in Chicken Erythrocytes and in Lemna gibba

With the help of affinity chromatography on NAD-Sepharose it was possible to find *myo*-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) in blood of anaemic chicken and to obtain a relatively active preparation of the enzyme. In the blood of normal chicken, which had no reticulocytes, no activity of this enzyme could be detected. The same method was also successfully applied for the concentration of an enzyme of the same specificity from *Lemna gibba* (duckweed).

In einer vorhergehenden Mitteilung aus dieser Serie² berichteten wir über die Reinigung von *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus Rattenhoden mit Hilfe von Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose. Dabei arbeiteten wir mit einem bereits weitgehend vorgereinigten Enzym und erreichten mit unserer Methode elektrophoretische Homogenität des Enzyms. Ein Versuch, die Methode der Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose auch zur Isolierung der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus wenig vorgereinigten Extrakten aus Rattenhoden anzuwenden, hatte Erfolg; es konnten auf diese Weise Präparationen des Enzyms erhalten werden, die etwa 50% der spezifischen Aktivität des homogenen Enzyms zeigten.

Es ist anzunehmen, daß *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase in allen Organismen, die *myo*-Inosit produzieren, das Schlüsselenzym bei der Bildung dieser Substanz ist. Nun gibt es zwei biologische Systeme, die wir seit längerer Zeit in diesem Laboratorium bearbeiten, in denen wir aber dieses Enzym entweder gar nicht oder nur mit Schwierigkeiten nachweisen konnten, obwohl kaum ein Zweifel darüber bestehen kann, daß dort eine quantitativ bedeutende Synthese von *myo*-Inosit erfolgt. Es handelt sich dabei um die Erythrocyten von Vögeln, bei denen ein Pentakisphosphat des *myo*-Inosits eine regulierende Rolle auf die Sauerstoffkapazität des Hämoglobins spielt³, sowie die Wasserlinse, *Lemna gibba*, von der wir wissen, daß dieser Organismus besonders gut zur Synthese von Phytinsäure, dem Hexakisphosphat des *myo*-Inosits, befähigt ist⁴.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir nunmehr über Versuche, *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase in diesen beiden biologischen Systemen nachzuweisen und aktive Präparationen herzustellen.

Materialien und Methoden

NAD-Sepharose. Das Gel NAD-Sepharose wurde nach einer Vorschrift von Mosbach und Mitarb.⁵ dargestellt; dabei wurde Sepharose 4 B (Pharmacia, Uppsala) mit BrCN aktiviert und dann mit 6-Aminocapronsäure gekoppelt, welche als „spacer“ fungiert, woran mit Hilfe von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid NAD gebunden wurde. Die Affinität des Gels gegenüber NAD-spezifischen Enzymen wurde mit Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27), von der man weiß, daß sie von NAD-Sepharose gebunden wird⁵, überprüft.

Bestimmung von 1L-myoinosit-1-phosphat; Bestimmung der Aktivität der myo-Inosit-1-phosphat-Synthase. Für die Messung der Aktivität des hier untersuchten Enzyms wurde nach Barnett und Mitarb.⁶ das entstandene 1L-*myo*-Inosit-1-phosphat bestimmt. Die Methode beruht auf dem selektiven Abbau von *myo*-Inosit-1-phosphat bei Behandlung mit 0,2M-Natriumperjodat, wobei das Substrat, D-Glucose-6-phosphat, kaum angegriffen wird, während das Produkt der Reaktion, 1L-*myo*-Inosit-1-phosphat quantitativ derart abgebaut wird, daß eine entsprechende Menge Orthophosphat freigesetzt wird. Die Bestimmung des Orthophosphats erfolgte nach Chen und Mitarb.⁷

Für die Enzymbestimmung wurden zu 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung 0,2 ml 5 mM-Lösung von D-Glucose-6-phosphat und 0,1 ml 5 mM-NAD⁺-Lösung in 50 mM-Tris-Acetat-Pufferlösung, pH 7,4, die in bezug auf ADP 0,1 mM und in bezug auf Ammoniumacetat 1 mM war, zugegeben. Die Mischung wurde 1 Stde. bei 37° inkubiert und danach durch Zugabe von 0,2 ml 20proz. Trichloressigsäure abgestoppt. Dann wurde der Proteinniederschlag durch Zentrifugieren entfernt und in der überstehenden Lösung das entstandene 1L-*myo*-Inosit-1-phosphat nach der geschilderten Methode bestimmt. Ein Leerwert, der dadurch erhalten wurde, daß man die Trichloressigsäure bereits vor Zugabe der Enzymlösung hinzufügte, diente der Bestimmung des bereits im Glucose-6-phosphat

enthaltenen anorganischen Phosphats sowie der sehr geringen Phosphatmenge, die durch die Behandlung mit Perjodat aus D-Glucose-6-phosphat freigesetzt wird. Dieser Leerwert wurde von den erhaltenen Werten für die Enzymaktivität subtrahiert.

Mit weniger reinen Enzympräparationen wurde auch entsprechend *Barnett* und Mitarb.⁶ ein Leerwert für die vorhandene Phosphatase bestimmt und von den Werten für die Aktivität der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase abgezogen.

Bestimmung der Proteinkonzentration: Es wurde die Methode mit Folin-Reagens nach *Lowry* und Mitarb.⁸ verwendet.

Hühnerblut. Für die Isolierung und Konzentrierung des Enzyms aus Hühnererythrocyten wurde Blut von weißen Leghorn-Hennen, die etwa 4 Monate alt waren, verwendet. Das Blut wurde durch Herzpunktur entnommen.

Um das reticulocyten-reiche Blut anämischer Hühner zu erhalten, wurden Hühner dadurch anämisch gemacht, daß man ihnen 8 Tage lang täglich 10 ml Blut entnahm; Blut, das nach dieser Zeit abgenommen wurde, enthielt etwa 10% Reticulocyten unter den roten Blutkörperchen; der Hämatokrit-Test und die Bestimmung des Hämoglobingehalts ergaben deutlich verminderte Werte.

Lemna gibba. Der Organismus — eine der kleinsten bekannten Blütenpflanzen — wurde nach Sterilisierung nach *Kandeler*⁹ im Medium von *Cleland* und *Briggs* unter den Bedingungen eines 20-Stunden-Öages — 20 Stunden Licht und 4 Stunden Dunkelheit — gezüchtet.

Ergebnisse

Isolierung und Konzentrierung des Enzyms aus Hühnerblut

10 ml heparinisieretes Blut aus einem anämischen Huhn wurden 15 Min. bei 3000 Upm zentrifugiert, das Plasma abdekantiert und die Zellen durch Auffüllen auf das ursprüngliche Volumen mit Aqua dest. hämolysiert. Dann wurde 30 Min. unter Kühlung bei 18 000 Upm zentrifugiert; darauf wurden aus dem überstehenden Hämolysat alle Proteine durch Einrühren von festem Ammoniumsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren von der überstehenden Lösung befreit, dann in 5 ml Tris—Acetat-Pufferlösung, pH 7,4, die in bezug auf *ADTA* 0,1M war, gelöst, und die Lösung über Nacht gegen $\frac{1}{2}$ l desselben Puffers in der Kälte unter Rühren dialysiert. Das Dialysat wurde dann langsam — innerhalb von 3 Stdn. — auf 5 ml des NAD-Sepharose-Gels, die sich in einem Chromatographie-Röhrchen mit 1 cm Durchmesser befanden und vorher mit 30 ml der Tris—Acetat-Pufferlösung äquilibriert worden waren, aufgebracht. Die Säule wurde über Nacht mit 100 ml derselben Pufferlösung nachgewaschen.

Die Elution des Proteins erfolgte mit 42 ml 10mm-NAD⁺-Pufferlösung. Es wurden 6 Fraktionen zu 7 ml aufgefangen, von denen jede unter Rührung gegen $\frac{1}{2}$ l Tris—Acetat-Pufferlösung dialysiert und danach auf Proteingehalt und Enzymaktivität untersucht wurde.

Wie in Abb. 1 gezeigt ist, sind die ersten vier Fraktionen wenig aktiv, obwohl hier erwähnt werden muß, daß gerade diese Fraktionen am meisten Protein enthalten. In der 5. Fraktion findet sich dann eine beachtliche spezifische Aktivität des Enzyms (270 μ Kat/kg), die fast von der Größen-

ordnung ist, die bei dem bisher am weitesten gereinigten tierischen Enzym dieser Spezifität, der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus Rattenhoden, gemessen wurde. Die letztgenannte Präparation konnte, wie vor kurzem berichtet wurde², elektrophoretisch einheitlich erhalten werden, was bei dem hier beschriebenen Enzym sicher nicht der Fall ist.

Versuche, dasselbe Enzym im Blut nicht-anämischer Hühner mit Hilfe der gleichen Methode nachzuweisen, ergaben bisher immer negative Ergebnisse.

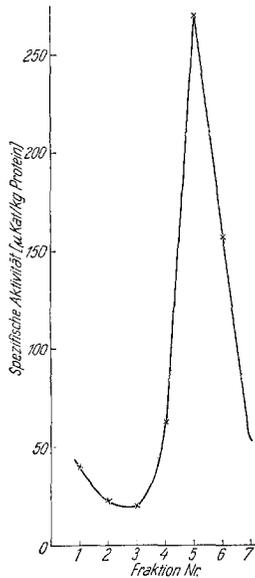


Abb. 1. Elution der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus dem Blut anämischer Hühner mit 10 mM-NAD⁺-Lösung in Tris—Acetat-Puffer

Konzentrierung des Enzyms aus Lemna gibba. Etwa 20 g Wasserlinsen (Frischgewicht) wurden mit 100 ml Pufferlösung (50 mM-Tris—Acetat, 5 mM-Mercaptoäthanol, pH 7,4) im Glashomogenisator nach *Potter* zerkleinert. Das Homogenisat wurde durch eine zweifache Lage von „Miracloth“ abgepreßt und dann 2 Stdn. bei 25 000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Zur Lösung wurde portionsweise festes Ammoniumsulfat unter Rühren und Kühlung zugegeben, bis alle Proteine ausgefallen waren. Der Niederschlag wurde genau so behandelt wie das bei der Aufarbeitung der Proteine aus Hühnerblut beschrieben wurde. Bereits im Dialysat aus der Totalfällung der Proteine ließ sich Enzymaktivität nachweisen (spezifische Aktivität 175 µKat/kg).

3 ml der nach Totalfällung in Pufferlösung aufgenommenen Proteine wurden auf die mit Pufferlösung äquilibrierte bereits beschriebene Säule mit NAD-Sepharose-Gel aufgebracht; die Säule wurde dann mit Pufferlösung gewaschen und darauf zuerst mit 10 mM-NAD⁺-Pufferlösung 12 Frak-

tionen zu 2,5 ml und dann mit 20 mM-NAD⁺-Pufferlösung weitere vier Fraktionen zu 2,5 ml aus der Säule eluiert. Dabei erwiesen sich die Fraktionen 14 und 15 am aktivsten (Abb. 2), obwohl sie sehr wenig Protein enthielten. Die Messung der spezifischen Aktivität der Fraktion 14 ergab einen Wert von 93,8 mKat/kg Protein, aber auch Fraktion 15 hatte noch eine spezifische Aktivität von 58,4 mKat/kg Protein.

Diskussion

Der vorliegende Bericht zeigt vor allem, daß die Methode der Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose bei *myo*-Inosit-1-phos-

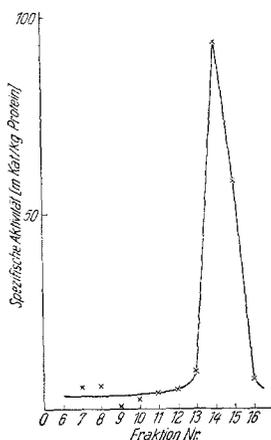


Abb. 2. Elution der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus *Lemna gibba* mit 10 mM bzw. ab Fraktion 13 mit 20 mM-NAD⁺-Lösung in Tris—Acetat-Puffer

phat-Synthase nicht nur dazu verwendet werden kann, bereits weitgehend vorgereinigte Präparationen zur höchsten Reinheit zu bringen, wie das in einer früheren Mitteilung² über das Enzym aus Rattenhoden berichtet wurde. Sie kann auch dazu dienen, das Enzym aus Rohextrakten zu isolieren, wobei natürlich kaum hochgereinigte Präparationen erhalten werden, aber doch zumindest ein beachtlicher Reinigungseffekt erzielt wird.

Das Enzym aus dem Blut anämischer Hühner konnte bisher überhaupt nur nach Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose nachgewiesen werden. Es ist schwer, eine plausible Erklärung für die Unmöglichkeit des Enzymnachweises in vorgereinigten Extrakten zu finden, denn aus den gemessenen Aktivitäten des Enzyms nach Affinitäts-

chromatographie lassen sich Aktivitäten im Extrakt berechnen, die durchaus meßbar sein sollten. Man könnte daran denken, daß die Extrakte neben dem Enzym auch einen Hemmstoff enthalten, der aber keine Affinität zur NAD-Sepharose aufweist.

Die Beobachtung, daß nur das Blut anämischer Hühner das Enzym enthält, während Normalblut, d. h. solches, das keine Reticulocyten enthält, anscheinend kein Enzym aufweist, ist insoweit besonders interessant, als in einer früheren Mitteilung aus diesem Laboratorium¹¹ berichtet wurde, daß nur anämisches Blut, nicht aber Normalblut, zur Phosphorylierung von *myo*-Inosit zu höheren Phosphaten, so insbesondere zu *myo*-Inosit-1,3,4,5,6-pentakisphosphat, imstande ist. Ein Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und unserem jetzigen Befund läßt sich im Moment noch nicht ganz klar erkennen.

Im Falle von *Lemna gibba* findet sich bereits im Rohextrakt eine nicht unbeträchtliche Aktivität des Enzyms. Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose führt hier zu einem Reinigungseffekt bis zum 500fachen. Obwohl kaum anzunehmen ist, daß es sich hier bereits um ein einheitliches Enzym handelt, ist die gemessene Aktivität erstaunlich hoch. Sie ist etwa 50mal größer als diejenige des elektro-phoretisch einheitlichen Enzyms aus Rattenhoden, der bisher aktivsten Präparation der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase. Dies ist deshalb besonders überraschend, weil — wenn auch eine allgemeine Regel darüber nicht aufgestellt werden kann — im allgemeinen pflanzliche Enzyme eher eine geringere Aktivität aufweisen als solche tierischen Ursprungs.

Weitere Untersuchungen der hier beschriebenen Enzyme sind in Vorbereitung.

Die Autoren danken Herrn Dozent Dr. *H. Ruis* für Ratschläge und kritisches Durchlesen des Manuskripts.

Literatur

¹ 31. Mitt.: *W. Woloszczuk* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, *Z. physiol. Chem.* (im Druck).

² *F. Pittner*, *W. Fried* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, *Z. physiol. Chem.* **355**, 222 (1974).

³ *R. Benesch*, *R. E. Benesch* und *C. I. Yu*, *Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 526 (1968).

⁴ *R. M. Roberts* und *F. Loewus*, *Plant Physiol.* **43**, 1710 (1968).

⁵ *K. Mosbach*, *H. Guilford*, *H. Ohlson* und *M. Scott*, *Biochem. J.* **127**, 625 (1972).

⁶ *J. E. G. Barnett*, *R. E. Brice* und *D. L. Corina*, *Biochem. J.* **119**, 625 (1970).

- ⁷ P. S. Chen, Jr., T. Y. Toribara und H. Warner, *Anal. Chem.* **28**, 1756 (1956).
- ⁸ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- ⁹ R. Kandeler, *Z. Botanik* **43**, 61 (1955).
- ¹⁰ C. S. Cleland und W. R. Briggs, *Plant Physiol.* **42**, 1553 (1967).
- ¹¹ M. Breitenbach und O. Hoffmann-Ostenhof, *Z. physiol. Chem.* **352**, 488 (1971).

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