

Herstellung von Sepharosederivaten zur Affinitätschromatographie von Enzymen des *myo*-Inositphosphatstoffwechsels

Kurze Mitteilung

Von

Otto Scheiner und Michael Breitenbach

Institut für Allgemeine Biochemie, Universität Wien,
und Ludwig Boltzmann-Forschungsstelle für Biochemie, Wien, Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 20. Januar 1976)

Synthesis of Sepharose Derivates Suited for the Affinity Chromatography of Enzymes of the Metabolism of myo-Inositolphosphates

In order to obtain an affinity gel for the affinity chromatography of enzymes acting on phosphorylated derivatives of *myo*-inositols, aminohexylsepharose was coupled with *myo*-inositol 2-phosphate with the help of dicyclohexylcarbodiimide. In the product the concentration of ligand is 15 mmole/l. The method seems to have wider applicability; phytic acid could be coupled with aminohexylsepharose under similar conditions.

Einleitung

Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von *myo*-Inosit in einem zellfreien Extrakt aus Hühner-reticulozyten fanden wir ein Enzym, das die Phosphorylierung von L-*myo*-Inosit-1-phosphat und *myo*-Inosit-2-phosphat zu höheren *myo*-Inositphosphaten katalysiert (unveröffentlicht). Dieses Enzym, das offensichtlich an der Biosynthese des 1,3,4,5,6-*myo*-Inositpentakisphosphats der Hühnererythrozyten beteiligt ist, konnte mit konventionellen Methoden der Proteinreinigung bisher nicht wesentlich angereichert werden. Es akzeptiert *myo*-Inosit als Substrat nicht und konnte an dem in diesem Institut kürzlich hergestellten Affinitätsgel¹, das über das C-Atom 4 gebundenen *epi*-Inosit als *myo*-Inosit-analogen Liganden enthält, nicht adsorbiert werden.

Wir entschlossen uns daher, ein Affinitätsgel zu synthetisieren, das *myo*-Inosit-2-phosphat als Liganden enthält, um dieses Enzym sowie *myo*-Inositphosphatkinasen aus anderen Organismen, wie z. B. aus der Wasserlinse *Lemna gibba*², zu reinigen.

Material und Methoden

Synthese der Gele: 50 ml Sepharose 4 B* (Pharmacia) wurden nach Porath³ mit Epichlorhydrin quervernetzt und aktiviert. Die gewaschene „epoxyaktivierte“ Sepharose wurde mit einer Lösung von 3,3 g 1,6-Diaminohexan in 50 ml 0,01N-NaOH versetzt, 2 Stdn. unter Rühren auf 60 °C gehalten und anschließend mit 3 l Wasser gewaschen. 20 ml des so erhaltenen Sepharosederivates (Aminohexylsepharose) wurden mit 36 ml Wasser, 36 ml *tert.*-Butylalkohol und einer wäßr. Lösung (etwa 2 ml) von *myo*-Inosit-2-phosphat (freie Säure; 1,5fache molare Menge, bez. auf die durch Titration ermittelte Molarität der primären Aminogruppen an der Aminohexylsepharose) versetzt und mit NaOH auf pH = 6,1 gebracht**. Nun wurde auf 70 °C erwärmt und unter vorsichtigem Rühren und weiterem Erwärmen bis zum Rückfluß eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; 6,7fache molare Menge) in 54 ml *tert.*-Butylalkohol im Laufe einer Stunde zugegot. Nachdem eine weitere Stunde unter Rückfluß erhitzt worden war, wurde das Produkt abgesaugt und mit je 500 ml n-Butanol, Äthanol, Wasser, n-Butanol, Äthanol sowie mit 3 l Wasser gewaschen.

Zur Kopplung von Phytinsäure wurde wie oben verfahren. An Stelle von *myo*-Inosit-2-phosphat wurde Phytinsäure (freie Säure; 2fache molare Menge, gelöst in möglichst wenig Wasser) zugegeben und die Mischung mit NaOH auf pH = 3,8 titriert**.

Titration der Aminohexylsepharose: 2 ml Aminohexylsepharose wurden mit 2 Mol 1N-NaOH äquilibriert und danach mit 1 l Wasser neutral gewaschen. Nun wurde in 100 ml Wasser suspendiert und mit 0,01N-HCl titriert. Nach jeder Zugabe von Säure wurde zur Gleichgewichtseinstellung am Gel 2 Min. gerührt und dann ohne Rühren der pH-Wert gemessen. Die erhaltene Titrationskurve wurde zweimal numerisch differenziert; auf diese Weise wurde der Äquivalenzpunkt bestimmt. Die Titrationskurve zeigte nur einen Wendepunkt, obwohl in jedem „spacer“ an der Aminohexylsepharose sowohl eine primäre als auch eine sekundäre Aminogruppe vorhanden ist (primäre und sekundäre aliphatische Aminogruppen unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Basizität⁴). Aus diesem Grund wurde die errechnete Molarität an basischen Gruppen durch 2 dividiert, um die Molarität an primären Aminogruppen zu erhalten.

Bestimmung des gelgebundenen Phosphors: 1 ml Gel wurde mit HNO₃/H₂SO₄ (2/1, V/V) vorsichtig bis zu einem Restvolumen von etwa 0,5 ml abgeraucht. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und das anorganische Phosphat nach Chen et al.⁵ spektralphotometrisch bestimmt.

* Die Volumangaben beziehen sich auf gequollenes Gel.

** Bei pH = 3,8 war die Ausbeute an Gel in diesem Schritt nur etwa 10%; bei pH = 6,1 betrug sie 60%.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurde nach einer Methode gesucht, um aus Phosphorsäuremonoestern und primären Aminen Phosphorsäuremonoestermonoamine unter Bedingungen herzustellen, unter denen Sepharose stabil ist. Eine solche Kondensation kann nach unserer Erfahrung nicht in wäßriger Lösung mit Hilfe von 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (*EDC*) durchgeführt werden; dies ist die übliche Kopplungsmethode für Carbonsäuren an Aminoxylysepharose. *Moffat* und *Khorana*⁶ beschrieben ein Verfahren zur Kondensation von ungeschützten Nukleosidmonophosphaten mit primären und sekundären Aminen mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid in *tert.*-Butylalkohol/H₂O (2 : 1), wobei primäre Amine sich als reaktiver erwiesen. Störende Nebenreaktionen, wie etwa die Selbstkondensation von AMP durch Bildung von Phosphorsäurediesterbindungen mit den OH-Gruppen der Ribose oder mit der aromatischen Aminogruppe des Adenins, traten unter den gewählten Bedingungen nicht auf. Geringe Mengen von Guanidinderivat, das durch Addition des Amins direkt an Dicyclohexylcarbodiimid entsteht, wurden allerdings gefunden.

Vorversuche zeigten uns:

1. Unter den Reaktionsbedingungen nach *Moffatt*⁶ geht Aminoxylysepharose, die nach Bromcyanaktivierung hergestellt ist⁷, vollständig in Lösung. Andererseits war Aminoxylysepharose, die nach Epichlorhydrinaktivierung hergestellt worden war³, stabil. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche die Methode der Aktivierung mit Epichlorhydrin verwendet.

2. *myo*-Inosit-2-phosphat und Phytinsäure konnten mit Hexylamin unter den von *Moffatt*⁶ beschriebenen Bedingungen vollständig amidiert werden.

Es waren also die Voraussetzungen gegeben, um unter eben denselben Bedingungen mit *myo*-Inosit-2-phosphat zu einem chemisch definierten Affinitätsgel zu koppeln. Eine Mehrfachreaktion an der Phosphorsäure ist in diesem Fall nicht möglich, weil die primären Aminogruppen der Aminoxylysepharose an dem rigiden Gel relativ weit voneinander entfernt sind; die Konzentration an Aminogruppen beträgt 20 mMol/l, was einer mittleren Entfernung von ca. 43 Å entspricht. Es sollte unter denselben Bedingungen aber auch möglich sein, Phytinsäure an Aminoxylysepharose zu koppeln. Verwendungszwecke für ein solches Gel wären: Affinitätschromatographie von Phytase (E.C.3.1.3.8.; ebenfalls ein Enzym des *myo*-Inositphosphatstoffwechsels, dessen Isolierung aus verschiedenen Quellen Gegenstand großen Interesses ist) und von Hämoglobinen, die Phytinsäure unter bestimmten Bedingungen mit großer

Affinität binden können⁸. Bei der Kopplung von Phytinsäure konnten wir allerdings nicht bestimmen, welche der sechs im Molekül vorhandenen Phosphatgruppen reagiert hat. Mehrfachreaktionen sind aus demselben Grund wie oben ausgeschlossen.

Wir haben somit eine von zwei möglichen Strategien bei der Synthese von Sepharosederivaten für Affinitätschromatographie verwendet, nämlich die Kopplung des „spacer“ an das Gel im ersten Schritt und Kopplung des Liganden an den „spacer“ im zweiten. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer chemischen Einfachheit und in der Tatsache begründet, daß polyfunktionelle Liganden ohne Gefahr einer Mehrfachreaktion verwendet werden können. Ein störender Effekt, der durch unvollständige Reaktion im zweiten Schritt entsteht, konnte in unserem Fall durch Wahl geeigneter Elutionsbedingungen ausgeschaltet werden.

Die zweite mögliche Strategie besteht darin, zuerst Ligand und „spacer“ zu verknüpfen. Dazu ist in unserem Fall das Arbeiten mit Schutzgruppen in einer mehrstufigen chemischen Synthese notwendig. Die Kopplung an BrCN-aktivierte Sepharose kann dann unter milden Bedingungen und ohne Einführen unerwünschter hydrophober oder ionenaustauschaktiver Gruppen durchgeführt werden. Versuche in dieser Richtung sind in unserem Laboratorium im Gange.

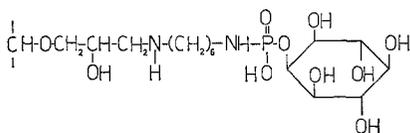
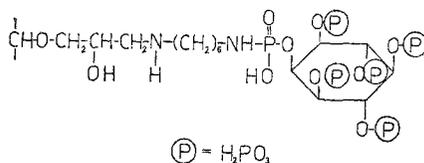


Abb. 1. Struktur von *myo*-Inositol-2-phosphat-Sepharose

Bei der hier beschriebenen Synthese von Sepharosederivaten blieb die Quellfähigkeit und damit die makroporöse Gelstruktur sowie die Perlförmigkeit der Sepharose erhalten. Das Gewichtsverhältnis von gequollenem Gel zur Trockenmasse (Trocknung 2 Std. bei 120 °C) betrug 22 ± 1 . Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Sepharose 4B, Aminohexylsepharose und phosphorhaltigen Sepharosederivaten. Diese Beobachtung beruht vermutlich auf folgender Tatsache: Die Quervernetzungen werden nur innerhalb einer Superhelix der Sepharose, nicht zwischen verschiedenen Superhelices, hergestellt und führen daher zu keiner Änderung der makroporösen Gelstruktur der Sepharose⁹, was Voraussetzung für Affinitätschromatographie von Proteinen ist.

Die Konzentration der primären Aminogruppen der Aminohexylsepharose betrug 20 mMol/l, die Konzentration des Phosphors an der

myo-Inosit-2-phosphat-Sepharose 15 mMol/l; es hatten also 75% der Aminogruppen reagiert. Die Konzentration des Phosphors in dem beschriebenen Phytinsäure-Affinitätsgel betrug 6 mMol/l (entspricht 1 mMol/l Phytinsäure); 5% der Aminogruppen hatten reagiert. Zum Vergleich sei erwähnt, daß bei der Kopplung von Liganden mit Carboxyl-



2

Abb. 2. Struktur von Phytinsäure-Sepharose. Die Bindung erfolgt wahrscheinlich statistisch an jeweils einer der Phosphatgruppen. Das erste C-Atom gehört zu einer Galktoseeinheit der Sepharose

gruppen an Aminoethyl-Sepharose mit Dicyclohexylcarbodiimid in 80proz. Pyridin ebenfalls restliche freie Aminogruppen nachgewiesen werden können. Bei der analogen Herstellung von Carbonsäureamiden mittels *EDC* in wäßriger Lösung tritt dieser Effekt nicht auf (eigene unveröffentlichte Versuche).

Bei den hier beschriebenen Sepharosederivaten wirken die restlichen Aminogruppen bei Affinitätschromatographie zusätzlich als schwach basische Anionenaustauscher, was zu einer unspezifischen Adsorption von Proteinen bei niedriger Ionenstärke führt. Eigene Versuche mit *myo*-Inositphosphat-Kinase aus Hühnerreticulozyten zeigen aber, daß hochspezifische Adsorption des Enzyms an *myo*-Inosit-2-phosphat-Sepharose durch geeignete Elutionsbedingungen nachgewiesen werden kann (Publikation in Vorbereitung).

Literatur

- ¹ F. Koller und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **105**, 379 (1974).
- ² E. Molinari und O. Hoffmann-Ostenhof, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 1797 (1968).
- ³ J. Porath und N. Fornstedt, J. Chromatogr. **51**, 479 (1970).
- ⁴ Handbook of Chemistry and Physics, 53rd edition, p. D 117 (1972/73).
- ⁵ P. S. Chen, T. Y. Toribara und H. Warner, Anal. Chem. **28**, 1756 (1956).
- ⁶ J. G. Moffatt und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **83**, 649 (1961).

- ⁷ P. Cuatrecasas und C. B. Anfinsen, *Methods Enzymol.* (S. Colowick und N. O. Kaplan, Hrsg.), Bd. XXII, S. 345. 1971.
- ⁸ A. Arnone und M. F. Perutz, *Nature* **249**, 34 (1974).
- ⁹ S. Arnott, *J. Mol. Biol.* **90**, 269 (1974).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

*Dr. M. Breitenbach
Institut für Allgemeine Biochemie
Universität Wien
Währinger Straße 38
A-1090 Wien
Österreich*

Eigentümer: Österreichische Akademie der Wissenschaften, Dr. Ignaz Seipel-Platz 2, A-1010 Wien.—
Herausgeber: Österreichische Akademie der Wissenschaften, Dr. Ignaz Seipel-Platz 2, A-1010 Wien,
und Verein Österreichischer Chemiker, Eschenbachgasse 9, A-1010 Wien. — Verlag: Springer-Verlag,
Mölkerbastei 5, A-1011 Wien. — Für den Textteil verantwortlich: Prof. Dr. Friedrich Kuffner,
Währinger Straße 38, A-1090 Wien. — Für den Anzeigenteil verantwortlich: Bruno Schweder,
Mölkerbastei 5, A-1011 Wien. — Druck: Adolf Holzhausens Nachfolger, Kandlgasse 19-21,
A-1070 Wien.

Printed in Austria