

## Herstellung hochgereinigter *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus Stierhoden und Vergleich mit dem entsprechenden Enzym aus Rattenhoden

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclitol, 33. Mitt.<sup>1</sup>

Von

Fritz Pittner und Otto Hoffmann-Ostenhof

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

(Eingegangen am 8. März 1976)

*Studies on the Biosynthesis of Cyclitols, XXXIII: Preparation of Highly Purified myo-Inositol-1-phosphate Synthase from Bull Testicles; Comparison with the Corresponding Enzyme from Rat Testicles*

Using the method of affinity chromatography on NAD-Sepharose, the *myo*-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) from testicles of the bull could be purified to homogeneity. Although its specificity, its activity and its molecular weight are all very similar to the corresponding properties of the enzyme from rat testicles, there are also some considerable differences between the two enzyme proteins. Whereas the rat enzyme consists of two different pairs of subunits with the molecular weights of  $3.5 \times 10^4$  and  $7.2 \times 10^4$ , respectively, the bull enzyme consists of four subunits, all of them apparently having the same molecular weight of  $5.45 \times 10^4$ . The isoelectric points of the two enzyme proteins are also different; with the help of the method of isoelectric focussing they were determined as 3.95 for the rat enzyme and 4.59 for the enzyme from the bull.

In vorhergehenden Mitteilungen dieser Serie<sup>1, 2</sup> wurde über Konzentrierung und Reinigung von *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase (EC 5.5.1.4) mit Hilfe der Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose nach Mosbach<sup>3</sup> berichtet. Nachdem wir bereits seinerzeit<sup>2</sup> die Herstellung einer homogenen Präparation eines solchen Enzyms aus Rattenhoden beschrieben hatten, stellten wir nunmehr das Enzym gleicher Spezifität auch aus Stierhoden in homogener Form her. Im vorliegenden Bericht werden die Herstellung dieser Präparation sowie ihre Eigenschaften im Vergleich zu denjenigen des Enzyms aus Rattenhoden beschrieben.

## Materialien und Methoden

*Substanzen und kommerziell erhältliche Enzympräparationen*

NAD<sup>+</sup>, D-Glucose-6-phosphat, Serumalbumin (Rind, monomer) und Coomassie Brilliant Blue B wurden von Sigma, St. Louis, bezogen; N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid war ein Produkt von British Drug House, London; Lactatdehydrogenase (Muskel), Alkoholdehydrogenase (Leber), Aldolase (Muskel), Pyruvatkinase (Muskel), Cytochrom c (Muskel), Katalase (Leber), Lysozym (Eier), Phosphorylase  $\alpha$  (Muskel) und Ovalbumin stammen von Boehringer GmbH, Mannheim. Alle Puffersubstanzen wurden von Merck, Darmstadt, bezogen; N,N'-Methylbisacrylamid stammte von EGA, Steinheim-Albuch, Acrylamid und Tetramethyläthylendiamin von Serva, Heidelberg. Für die Elektrofokussierung wurden eine LKB 8101-Ampholine-Säule (110 ml) und — zur Erzeugung eines pH-Gradienten — „LKB Ampholine Carrier Ampholyte“ verwendet.

NAD-Sepharose. Das Gel NAD-Sepharose wurde nach *Mosbach*<sup>3</sup> in der gleichen Weise, wie in der vorhergehenden Mitteilung<sup>1</sup> beschrieben, hergestellt.

*Bestimmung der Aktivität der myo-Inosit-1-phosphat-Synthase*

Auch hier wurde im allgemeinen in gleicher Weise wie in der vorhergehenden Mitt.<sup>1</sup> vorgegangen; in manchen Fällen von Inhibitorversuchen war es allerdings notwendig, mit Hilfe von radioaktivem Substrat ([U-<sup>14</sup>C]-D-Glucose-6-phosphat, The Radiochemical Centre, Amersham, England) zu arbeiten, wobei je nach den Versuchsbedingungen Aktivitäten von 3 bis  $10 \times 10^6$  dpm eingesetzt wurden. Nach Inkubation bei 37 °C unter den bereits beschriebenen Bedingungen<sup>1</sup> wurde die Reaktion durch Erhitzen im kochenden Wasserbad abgebrochen und darauf alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1), inaktiver *myo*-Inosit sowie MgCl<sub>2</sub> zugegeben und weitere 2 Stdn. bei 37 °C inkubiert, wonach die Reaktion abermals durch Kochen gestoppt wurde. Nach Entfernen des denaturierten Proteins durch Zentrifugieren wurden die Reaktionsprodukte papierchromatographisch (Aceton—Wasser, 4:1) aufgetrennt und die Aktivität in dem dem *myo*-Inosit entsprechenden Fleck mit Hilfe eines 4- $\pi$ -Chromatogramm-scanners (Tracerlab, Waltham, Mass.) gemessen.

*Bestimmung bzw. Abschätzung physikalischer Daten der Enzymproteine*

Hier wurden allgemein die bereits in der vorhergehenden Mitt.<sup>1</sup> beschriebenen Methoden verwendet; zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit Hilfe der Elektrofokussierung folgten wir den Angaben der Herstellerfirma von Ampholine<sup>4</sup>. Die Elektrophorese auf Polyacrylamidgel, die zur Prüfung des Reinheitsgrades verwendet wurde, wurde nach *Maurer*<sup>5</sup> durchgeführt; dabei wurden Gele eingesetzt, die in bezug auf monomeres Acrylamid 7,5proz., 6proz. oder 5proz. waren. Zur Molekulargewichtsbestimmung von Untereinheiten der Enzymproteine wurde die Elektrophorese auf Polyacrylamidgel (7,5proz. in bezug auf das Monomere) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat nach *Weber, Pringle* und *Osborn*<sup>6</sup> verwendet.

Die Proteinbestimmung in den einzelnen Lösungen wurde nach *Lowry* und *Mitarb.*<sup>7</sup> durchgeführt.

## Ergebnisse

Wie bereits in früheren Mitteilungen<sup>1, 2</sup> berichtet wurde, wird *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase, die  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor enthält, nach Entfernung dieses Cofaktors mit Hilfe von Aktivkohle sehr fest an NAD-Sepharose gebunden; sie läßt sich aber mit einer Lösung von  $\text{NAD}^+$  aus der Säule undenaturiert eluieren und wird auf diese Weise in hochgereinigter Form erhalten. Das Enzym aus den Stierhoden konnte auf die gleiche Weise gereinigt und in homogener Form erhalten werden.

*Herstellung des Enzyms aus Stierhoden.* Die Hoden wurden sofort nach der Tötung des geschlechtsreifen Tieres aus dem Körper entnommen, von anhaftendem Fett und Gewebe befreit und in flüss. Stickstoff tiefgefroren. In diesem Zustand ist das Material zumindest einige Monate ohne wesentliche Aktivitätsverluste haltbar.

Eine Vorreinigung des Enzyms erfolgte nach *Barnett, Brice* und *Corina*<sup>8</sup>; man kann allerdings auch aus nicht vorgereinigten Rohextrakten, die durch Auflösen einer Totalfällung aller Proteine mit Hilfe von gesätt. Ammoniumsulfatlösung erhalten werden, gel-elektrophoretisch homogene Enzympräparationen erhalten, doch ist die Ausbeute nach Vorreinigung wesentlich besser. Die Vorreinigung mußte etwas modifiziert werden; während beim Enzym aus Rattenhoden nach vorhergehenden Reinigungsschritten die Aktivität zwischen den Fällungen mit Ammoniumsulfatkonzentrationen von 165 und 59 g/l zu finden ist, liegt sie bei demjenigen aus Stierhoden zwischen 144 und 30 g/l Konzentration des Ammoniumsulfats.

Im allgemeinen wurden somit die Enzyme nach *Barnett, Brice* und *Corina*<sup>8</sup> mit Aktivkohle behandelt, um das ziemlich fest gebundene  $\text{NAD}^+$  zu entfernen, darauf auf Säulchen mit NAD-Sepharose aufgebracht, mit Tris-Acetat-Pufferlösung, pH 7,4, gründlich gewaschen und dann mit 10 mM  $\text{NAD}^+$ -Lösung im selben Puffer, die in bezug auf *ÄDTA* 0,1 mM und in bezug auf Ammoniumacetat 1 mM war, eluiert. Das Eluat wurde in 2,5 ml Fraktionen aufgefangen und jede Fraktion nach Dialyse auf Enzymaktivität geprüft. Während die ersten Fraktionen — insbesondere wenn ohne Vorreinigung gearbeitet wurde — noch Fremdproteine enthielten, erweisen sich die Fraktionen, welche die Hauptmenge an Enzymprotein enthielten, als gel-elektrophoretisch homogen. Bei Verwendung eines vorgereinigten Rohenzym aus Stierhoden wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie an NAD-Sepharose eine Anreicherung auf das 60fache erreicht; bei nicht vorgereinigtem Rohextrakt war die Anreicherung etwa 600fach.

Die Schätzung des Molekulargewichts des Enzyms aus Stierhoden mit Hilfe der Sephadex-Säule ergab einen Wert von  $2,18 \times 10^5$ ; dieser Wert ist dem Molekulargewicht des Enzyms aus Rattenhoden ( $2,15 \times 10^5$ ) sehr ähnlich. Bei der Auftrennung des Enzyms aus Stierhoden in Untereinheiten mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde nur eine einzige Bande mit dem Molekulargewicht  $5,45 \times 10^4$  gefunden, woraus sich berechnen läßt, daß das Enzymprotein aus vier anscheinend gleich schweren Untereinheiten besteht. Bei dem Enzym aus Rattenhoden wurden ebenfalls vier Untereinheiten nachgewiesen; diese haben aber nicht alle das gleiche Molekulargewicht, da es sich um zwei gleich große Paare mit den Molekulargewichten  $3,5 \times 10^4$  bzw.  $7,2 \times 10^4$  handelt<sup>2</sup>.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms aus Stierhoden beträgt 4,59; beim Enzym aus Rattenhoden liegt der isoelektrische Punkt bei pH 3,95.

Die spezif. Aktivität des Enzyms aus Stierhoden beträgt 1,39 mkat/kg Protein; der entsprechende Wert für das Enzym von Rattenhoden ist 1,62 mkat/kg Protein. Die *Michaelis*konstante für D-Glucose-6-phosphat wurde mit  $1,8 \pm 0,7$  mM und diejenige für NAD<sup>+</sup> mit  $1,2 \times 10^{-2}$  mM ermittelt; beim Enzym aus Rattenhoden sind die entsprechenden Werte für D-Glucose-6-phosphat  $K_m = 0,75 \pm 0,25$  mM und für NAD<sup>+</sup>  $K_m = 5 \times 10^{-2}$  mM.

### Diskussion

Die seinerzeit für die Herstellung der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus Rattenhoden ausgearbeitete Methode<sup>2</sup> ergab auch mit geringen Modifikationen denselben Erfolg beim Enzym aus Stierhoden, nämlich ein elektrophoretisch homogenes Enzymprotein.

Ein Vergleich der beiden Enzymproteine aus Rattenhoden und Stierhoden ergibt nun einige weitgehende Ähnlichkeiten, wie z. B. die Molekulargewichte, die spezifischen Aktivitäten und die *Michaelis*konstanten für das Substrat und für das Coenzym NAD<sup>+</sup>. Allerdings konnte man bereits bei der Vorreinigung vermuten, daß die beiden Proteine doch nicht allzu ähnlich sind, weil sie sich bei der Ammoniumsulfat-Fraktionierung stark unterschiedlich verhalten. Auch die isoelektrischen Punkte sind deutlich verschieden. Der eindrucksvollste Unterschied liegt aber im Aufbau der beiden Enzymproteine aus Untereinheiten. Wohl bestehen beide aus vier Untereinheiten; in dem Fall des Rattenenzym finden wir aber zwei verschiedene Typen von Untereinheiten, und zwar zwei Paare, die sich in ihren Molekulargewichten sehr deutlich unterscheiden. Im Enzym aus Stierhoden weisen alle vier Untereinheiten das gleiche Molekulargewicht auf.

Wir haben somit zwei Proteine vor uns, die sich in einigen wesentlichen Eigenschaften unterscheiden. Die hier berichteten Übereinstimmungen sowie das Verhalten der beiden Enzymproteine gegenüber Inhibitoren<sup>9</sup>, worüber in einer späteren Publikation ausführlich berichtet werden soll, lassen aber darauf schließen, daß beide Enzyme ihre Wirkung mit Hilfe des gleichen Mechanismus katalysieren. Auf Grund verschiedener Befunde — Nicht-Hemmbarkeit durch *ADTA*, <sup>18</sup>O im Produkt, wenn die Reaktion in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O verläuft, Hemmbarkeit durch verschiedene Inhibitoren der Bildung von *Schiffschen* Basen — halten wir es für wahrscheinlich, daß es sich bei der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase aus Säugetierhoden um ein Enzym handelt, dessen Wirkungsweise eine gewisse Analogie zu der *Schiffschen* Basen bildenden Fructosebisdiphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.13) aus Säugetiergeweben<sup>10</sup> aufweist.

Im Gegensatz dazu sind, wie schon von verschiedenen Autoren beobachtet wurde, die *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthasen aus grünen Pflanzen durch *ADTA* in ihrer Wirkung hemmbar, was auf die Be-

teilung von Metallionen schließen läßt<sup>11, 12</sup>. Diese Art der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase würde somit völlig dem Typus der sogenannten Metallo-Aldolase<sup>10</sup> entsprechen, wie sie z. B. durch Fructosebisphosphat-Aldolase von Hefe repräsentiert wird.

Wir werden über diese Verhältnisse in einer folgenden Veröffentlichung eingehend berichten.

Wir danken dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Wien (Projekt Nr. 2639) sowie dem Jubiläumsfonds der Oesterreichischen Nationalbank (Projekt Nr. 730) für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

### Literatur

- <sup>1</sup> R. Schwarcz, W. Fried, F. Pittner und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **105**, 445 (1974).
- <sup>2</sup> F. Pittner, W. Fried und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **355**, 222 (1974).
- <sup>3</sup> K. Mosbach, H. Guilford, R. Ohlsson und M. Scott, Biochem. J. **127**, 625 (1972).
- <sup>4</sup> LKB, Stockholm, Ampholine Carrier Ampholyte. Firmenschrift, Stockholm, 1972.
- <sup>5</sup> R. H. Maurer, Diskelektrophorese. Berlin: Walter de Gruyter. 1968.
- <sup>6</sup> K. Weber, J. R. Pringle und M. Osborn, Methods in Enzymology (S. Colowick und N. Kaplan, Hrsg.), Bd. 26/1, S. 3. New York: Academic Press. 1973.
- <sup>7</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- <sup>8</sup> J. E. G. Barnett, R. E. Brice und D. L. Corina, Biochem. J. **119**, 183 (1970).
- <sup>9</sup> F. Pittner, Dissertation, Universität Wien, 1974.
- <sup>10</sup> B. L. Horecker, O. Tsolas und C. Y. Lai, The Enzymes, 3. Aufl. (P. D. Boyer, Hrsg.), Bd. 7, S. 213. New York: Academic Press. 1972.
- <sup>11</sup> M. Mogyoros, A. Brunner und E. Piña, Biochim. Biophys. Acta **289**, 420 (1972).
- <sup>12</sup> M. W. Loewus und F. Loewus, Plant Physiol. **51**, 263 (1973).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

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