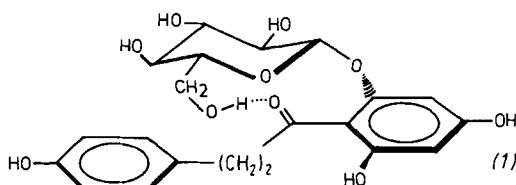


Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vordringliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

Ein Polymer aus Phlorrhizin als Affinitätsgel für zuckerbindende Proteine^[***]

Von Jiann-Trzuo Lin und Rolf Kinne^[*]

Phlorrhizin (1), ein in den Wurzeln von Apfelbäumen vorkommendes β -Glykosid, wurde 1835 isoliert^[1] und 1942 synthetisch hergestellt^[2]. (1) wirkt als Hemmstoff des renalen und intestinalen Zuckertransports und ist deshalb für Untersuchungen der Eigenschaften des Zuckertransportsystems geeignet^[3]. Aufgrund der vielen phenolischen Hydroxygruppen von (1) gelang es, den Aglykonteil zu vernetzen, ohne



den Zuckerteil zu verändern. Das so erhaltene Polymer kann als Affinitätsgel für zuckerbindende Proteine verwendet werden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Affinitätsgelen auf Agarosebasis stammen Gelmatrix und Ligand beim Phlorrhizinpolymer demnach vom gleichen Molekül.

Phlorrhizin wird mit Formaldehyd und Harnstoff in Gegenwart von Essigsäure zu einem weißen Polymer vernetzt. Aus dem Glucosegehalt des Polymers^[4] kann man einen Phlorrhizingehalt von 3.05% abschätzen; aus dem Stickstoff-

gehalt (32.53%) ergibt sich für Phlorrhizin : Harnstoff : Formaldehyd das Molverhältnis 1:4:16. Nach Modellvorstellungen für andere Harze^[5] können die Phlorrhizinmoleküle im Polymer durch $-\text{CH}_2-\text{O}-$ und/oder $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ Ketten miteinander verknüpft sein. Der Abstand der Phlorrhizinmoleküle, der vom Anteil an Harnstoff und Formaldehyd abhängt, muß groß genug sein, um freie Rotation der Glucosegruppen und möglichst ungehinderten Zutritt von Proteinen zu ermöglichen.

Um zu prüfen, ob das Polymer für die Affinitätschromatographie von zuckerbindenden Proteinen verwendet werden kann, wurde einerseits die Bindungskapazität des Polymers für Lectine (Concanavalin A und Linsenlectin) bestimmt. Aus der Auflösung der Werte nach Scatchard ergab sich, daß bei 22 °C etwa 2×10^{-7} mol Concanavalin A und 8×10^{-8} mol Linsenlectin pro Gramm trockenes Polymer gebunden werden. Andererseits wurde gereinigtes Concanavalin A auf eine Phlorrhizinpolymer-Säule aufgetragen. Im Gegensatz zu Rinderserumalbumin wurde Concanavalin A am Polymer adsorbiert und konnte erst durch D-Glucose eluiert werden (Abb. 1a). Außerdem wurde das Polymer zur Isolierung von Concanavalin A aus einem Schwerbohnenrohextrakt benutzt. Wie Abbildung 1b zeigt, passieren die meisten Proteine des Rohextrakts die Säule; mit D-Glucose wird eine Fraktion eluiert, deren Proteinmuster in der SDS-Gelelektrophorese mit dem von Concanavalin A praktisch übereinstimmt (Abb. 2).

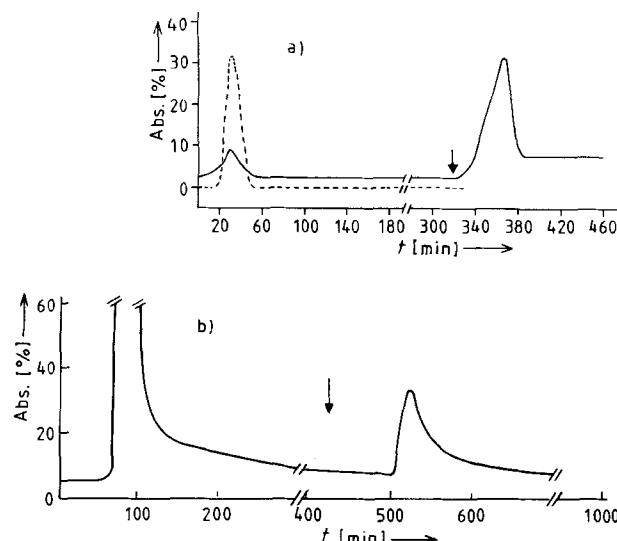


Abb. 1. Affinitätschromatographie am Phlorrhizinpolymer. a) 500 µl (1.7 mg/ml) Concanavalin A (—) und 500 µl (4.7 mg/ml) Rinderserumalbumin (---) wurden in wässriger Lösung auf die Affinitätsäule (30 × 0.9 cm) aufgetragen. Bei der Elution mit entionisiertem Wasser (Elutionsgeschwindigkeit 9 ml/h, Volumen der Fraktionen 3 ml) wurde der Proteingehalt des Eluats durch Extinktion bei 279 nm registriert. Concanavalin A heft sich erst mit 0.2 mol/l D-Glucose (Pfeil) eluiert. b) 400 µl Schwerbohnenrohextrakt in 0.1 mol/l Ammoniumacetat, pH = 7.0, wurden auf die Säule aufgetragen. Die adsorbierten Proteine wurden mit 0.5 mol/l D-Glucose (Pfeil) eluiert.

[*] Prof. Dr. R. Kinne [**], Dr. J.-T. Lin

Max-Planck-Institut für Biophysik
Heinrich-Hoffmann-Straße 7, D-6000 Frankfurt 71

[**] Derzeitige Adresse: Yeshiva University, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, N. Y. 10461 (USA).

[***] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. – Nach einem Vortrag auf dem XIth International Congress of Biochemistry in Toronto am 10. 7. 1979.

Erste Versuche zur Isolierung des D-Glucosetransportproteins aus Extrakten von Bürstensaummembranen aus Schweinenieren ergaben, daß die vom Polymer adsorbierte und durch D-Glucose eluierbare Proteinfraktion eine fünfmal höhere Transportaktivität gegenüber D-Glucose zeigt als die Ausgangsmembran. Die Transportaktivität wurde nach

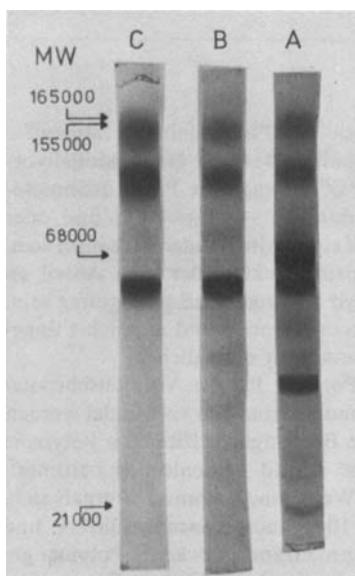


Abb. 2. Proteinmuster der aus dem Schwertbohnenrohextrakt gewonnenen Fraktionen (Abb. 1b). A: Schwertbohnenrohextrakt, B: durch D-Glucose aus dem Phlorrhizinpolymer eluierte Fraktion, C: kommerziell erhältliches Concanavalin A (Pharmacia, Tübingen). Die Proteinmuster wurden durch Elektrophorese in 8proz. Polyacrylamid in Anwesenheit von Natrium-dodecylsulfat ermittelt (SDS-Gelektrophorese).

Inkorporierung der Proteine in Liposomen bestimmt. Damit scheint das Phlorrhizinpolymer für die Isolierung von Proteinen geeignet zu sein, die eine Affinität zu β -glykosidisch verknüpfter D-Glucose haben.

Arbeitsvorschrift

Herstellung des Phlorrhizinpolymers: Eine Mischung von 2 g Phlorrhizin (1), 30 g Harnstoff und 65 ml 37proz. Formalin wurde mit einem Tropfen Essigsäure versetzt und unter starkem Rühren auf 120–140 °C erhitzt. Nach 20–30 min erhält man eine weiße, undurchsichtige Masse, die nach dem Abkühlen grob zerkleinert und mit Wasser/Ethanol solange gewaschen wurde, bis sie frei von niedermolekularen Bestandteilen war. Nach Waschen mit Ethanol und Trocknen bei 60 °C verblieben 46.2 g trockenes Polymer, das gemahlen und mit Wasser oder der entsprechenden Pufferlösung equilibriert wurde. Das in eine Chromatographiesäule eingesetzte Polymer wurde solange mit Wasser oder Pufferlösung gewaschen, bis im Eluat keine Absorption bei 256 nm mehr auftrat. Anschließend wurde das Proteingemisch aufgetragen.

Bindung von Lectinen: Die Bindung wurde durch 2 h Inkubation von 10 mg Phlorrhizinpolymer mit verschiedenen konzentrierten Lectinlösungen (0.13 bis 2.6 mg/ml) in Ammoniumacetat (0.1 mol/l, pH=6.5) bei 22 °C bestimmt. Nach Inkubation und Sedimentation des Polymers wurde das freie Protein im Überstand gemessen. Als Kontrolle diente Albumin, das nur unwesentlich gebunden wurde.

Eingegangen am 22. Mai 1979,
ergänzt am 27. Juli 1979 und 8. April 1980 [Z 492]

Stoßinduzierte Fragmentierungen von Alkyldenammonium-Ionen^[**]

Von Hans J. Veith^[*]

Alkyldenammonium-Ionen spielen in der organisch-chemischen Synthese und als Naturstoffe eine besondere Rolle (vgl. ^[1a]). Im folgenden wird über eine massenspektrometrische Methode (FD-CA) berichtet, mit der zusätzlich zum Molekulargewicht strukturelle Details von Alkyldenammoniumsalzen bestimmt werden können.

Bisher konnten solche Salze massenspektrometrisch nicht untersucht werden, da bei der Überführung in die Gasphase die ionische Struktur nicht erhalten bleibt (vgl. ^[1b]). Mit der Felddesorptions-(FD-)Methode gelingt jedoch die Erzeugung intakter Alkyldenammonium-Ionen in der Gasphase aus den entsprechenden Salzen. Während somit die Masse der Kationen direkt bestimmt werden kann und zusätzlich auftretende Clusterionen es ermöglichen, das Molekulargewicht der Salze zu ermitteln, erhält man aus dem FD-Massenspektrum keine strukturell relevanten Details, da die felddesorbierten Alkyldenammonium-Ionen wegen der zu geringen Anregungsenergie innerhalb der massenspektrometrischen Zeitskala nicht zerfallen^[2].

Eine Möglichkeit zur Fragmentionen-Erzeugung bietet die Stoßaktivierungs-(„Collisional Activation“, CA)-Methode. Dabei erfahren die hochbeschleunigten Ionen durch einen inelastischen Stoß mit einem Neutralgas eine vom eigentlichen Ionisationsprozeß räumlich und zeitlich getrennte Anregung, die zu Bruchstücken der zu untersuchenden Ionen führt (vgl. ^[3]). Diese Fragmentionen werden in der ersten feldfreien Region eines doppelfokussierenden Massenspektrometers erzeugt und mit einer „Linked-Scan“-Einrichtung registriert^[4].

Die FD-CA-Massenspektren der drei isomeren Alkyldenammonium-Ionen (1)-(3) (Abb. 1), durch Felddesorption aus den Tetrafluoroboraten erzeugt^[5], unterscheiden sich vor allem durch die Intensitätsverhältnisse der Hauptfragmentionen. Das Ion (1) zerfällt überwiegend durch Heterolyse der N—C_{Benzyl}-Bindung in ein C₇H₇⁺-Ion ($m/e=91$). Dieser Ladungstransfer vom N-Atom zum aromatischen Ring wird auch beim Ion (2) beobachtet, doch ist die Bildung der C₇H₇⁺-Ionen aus (2) und auch aus (3) mit einer Wasserstoffwanderung verbunden. Für die Eliminierung von N-Methylmethylenamin aus (1) wird offenbar weniger Energie benötigt als bei den Ionen (2) und (3), da der Anteil an konkurrierenden Zerfällen bei (2) und (3) beträchtlich zunimmt. Das [M⁺—CH₄]-Ion ($m/e=118$) erreicht im CA-Spektrum von (2) ca. 60% der Intensität des C₇H₇⁺-Ions und erscheint im Spektrum vom Ion (3) als Basispeak.

Die N,N-Dimethylaminotropylium-Struktur sowohl beim Ion (3) als auch partiell nach Isomerisierung von (2) wird durch das Auftreten der im Vergleich zum CA-Spektrum von (1) intensiveren Signale bei $m/e=90$ und 89 belegt. Die Bildung dieser Ionen lässt sich durch Homolyse der C—N-Bindung bzw. durch N,N-Dimethylamin-Eliminierung erklären. Wie bei Phenylalkyl-substituierten Ammonium-Ionen^[4] wird bei den Ionen (1) und (2) die Eliminierung von 52 Masseneinheiten ($m/e=82$), bei (3) von 26 Masseneinheiten ($m/e=108$) beobachtet. Trotz der geringen Signalintensität

[1] de Koninck, Justus Liebigs Ann. Chem. 15, 258 (1835).

[2] G. Zemplén, R. Bognar, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 75, 1040 (1942).

[3] R. Kinne, Curr. Top. Membr. Transp. 8, 209 (1976); R. Kinne, H. Murer, E. Kinne-Saffran, M. Thees, G. Sachs, J. Membr. Biol. 21, 375 (1975); A. Klip, S. Grinstein, G. Semenza, ibid. 51, 47 (1979).

[4] M. Dubois, K. A. Giles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem. 28, 350 (1956).

[5] H.-G. Elias: Makromoleküle. Hüthig & Wepf, Basel 1972, S. 714 ff., 733 ff.

[*] Dr. H. J. Veith

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule
Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt

[**] 4. Mitteilung über stoßinduzierte Fragmentierungen von felddesorbierten Kationen. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt; Herrn M. Fischer danke ich für die experimentelle Mitarbeit. – 3. Mitteilung: H. J. Veith, Adv. Mass Spectrom. 8, im Druck.