

CHROM. 8142

## Note

### Säulenchromatographische Trennung von $N^G, N^G$ -Dimethylarginin, $N^G, N'^G$ -Dimethylarginin, $N^G$ -Monomethylarginin, $N^\epsilon$ -Monomethyllysine, $N^\epsilon$ -Dimethyllysine und $N^\epsilon$ -Trimethyllysine

H. W. LANGE und K. HEMPEL

Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg, Versbacher Landstr. 5, 87 Würzburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1974)

Lysin und Arginin werden in einigen Proteinen (Histone, Myosin, basischem Myelinprotein) in geringem Umfang N-methyliert. Die in der Literatur angegebenen säulenchromatographischen Trennverfahren sind bei Anwesenheit grosser Lysin- und Argininmengen zur quantitativen Bestimmung  $N^\epsilon$ -methylierter Lysine und methylierter Arginine nicht ausreichend. Entweder erscheint  $N^\epsilon$ -Monomethyllysine nur als Schulter des Lysins<sup>1–3</sup> oder bei Gegenwart grosser Argininmengen liegt  $N^G$ -Monomethylarginin unter dem Arginin<sup>4</sup>. Man ist daher gelegentlich dazu übergegangen, vor der Analyse der methylierten Aminosäuren Lysin durch Lysindecaboxylase<sup>5</sup> und Arginin durch Arginindesimidase<sup>6,7</sup> zu zerstören. Die vorliegende Arbeit beschreibt säulenchromatographische Verfahren, die es gestatten,  $N^\epsilon$ -methylierte Lysine, methylierte Histidine und methylierte Arginine auch in Gegenwart eines grossen Überschusses der entsprechenden unmethylierten Aminosäuren quantitativ zu bestimmen.

## MATERIAL UND METHODEN

### Materialien

Lysin, Ornithin, Hydroxylysine (*allo* + *threo*), Histidin und Arginin wurden von Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.),  $N^\epsilon$ -Monomethyllysine (MML),  $N^\epsilon$ -Dimethyllysine (DML), 1-Methylhistidin und 3-Methylhistidin von Calbiochem (Los Angeles, Calif., U.S.A.) bezogen.  $N^\epsilon$ -Trimethyllysine (TML) wurde nach Hempel *et al.*<sup>8</sup> synthetisiert. N-Methylharnstoffe lieferte Merck (Darmstadt, B.R.D.), Dowex 50W-X8 (200–400 mesh) Serva (Heidelberg, B.R.D.) und sphärisches Kationenaustauscherharz Typ M82 Beckman (München, B.R.D.).

### Synthese methylierter Arginine

Monomethylarginin ( $N^G$ -MMA),  $N^G, N^G$ -Dimethylarginin ( $N^G, N^G$ -DMA), und  $N^G, N'^G$ -Dimethylarginin ( $N^G, N'^G$ -DMA) wurden aus Ornithin und den entsprechenden O-Methylisoharnstoffderivaten hergestellt<sup>1,9</sup>. Radioaktive Methylarginine wurden auf demselben Wege aus DL-[<sup>3</sup>H]Ornithin<sup>10</sup> synthetisiert. Die Reinigung erfolgte über Dowex 50W-X8.

### Abbaureaktionen mit $Ba(OH)_2$

Die Reinheit der synthetisierten Methylarginine wurde durch alkalische Spaltung mit  $Ba(OH)_2$  überprüft<sup>1</sup>. Die säulenchromatographische Auftrennung der Hydrolyseprodukte ergab bei  $N^G, N'^G$ -DMA und bei  $N^G$ -MMA Ornithin, Methylamin und Ammoniak, während bei der Hydrolyse von  $N^G, N^G$ -DMA anstelle von Methylamin Dimethylamin gefunden wurde.

### Herstellung von Plasmaproben

Plasma wurde mit Trichloressigsäure (TCA) enteiweisst. Die freien Aminosäuren des säurelöslichen Überstandes wurden anschliessend an Dowex 50W-X8 ( $H^+$ ) ( $4.5 \times 6.0$  cm) gebunden, durch Waschen mit Wasser (1000 ml) von störenden Begleitstoffen befreit und schliesslich mit 3 *N*  $NH_4OH$  wieder eluiert. Nach Entfernen des Ammoniaks durch wiederholtes Einengen bis zur Trockne wurde der Rückstand hydrolysiert (6 *N*  $HCl$ ,  $110^\circ$ , 24 h). Die Kontrolle der Wiederfindungsrate durch Zugabe von  $[^{14}C]$ Arginin vor der TCA-Fällung ergab, dass durch die beschriebenen Operationen, einschliesslich der Hydrolyse weniger als 5% des ursprünglich im Plasma vorhandenen Arginins verlorengehen. Der Verlust an Methylargininen dürfte sich in der gleichen Grössenordnung bewegen.

### Vorbereitung der Urinproben

10 ml Urin wurden mit dem gleichen Volumen 25%iger  $HCl$  verdünnt und 1 h im offenen Kolben auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Anschliessend wurde

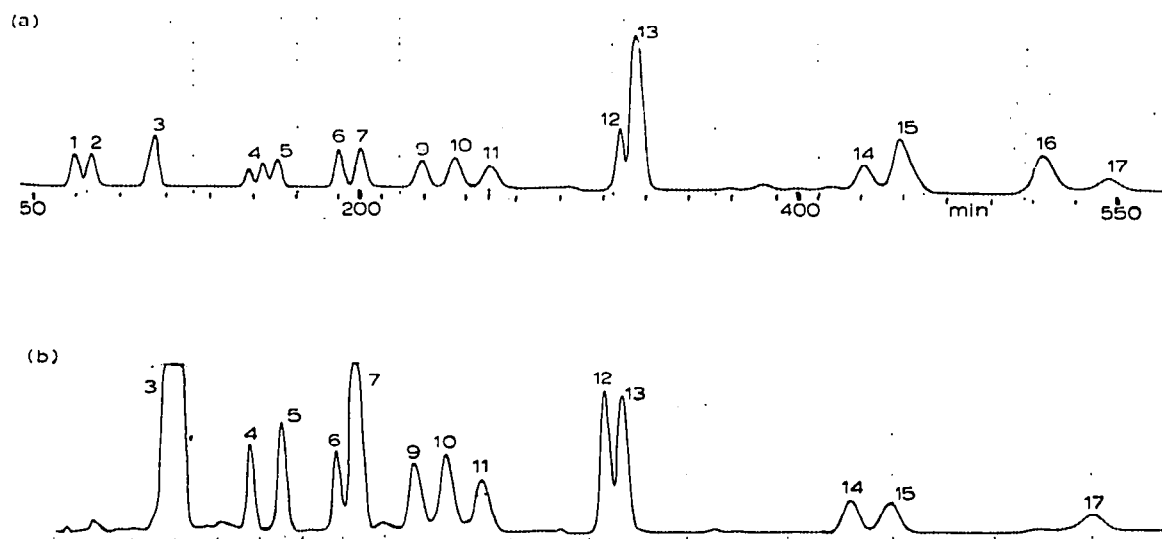


Fig. 1. Auftrennung eines synthetischen Aminosäuregemisches (a) und 200  $\mu$ l Urinhydrolysat (b). Bedingungen: Ionenaustauscherharz M 82 (Beckman, München, B.R.D.),  $0.9 \times 57$  cm; Puffer 1, 0.35 *N* Na-Citrat pH 6.92 (0 bis 250 min bei  $30^\circ$ ); Puffer 2, 0.47 *N* Na-Citrat pH 4.44 (250 bis 570 min bei  $55^\circ$ ); Pufferfluss 60 ml/h, Ninhydrinfluss 30 ml/h; Druck 12–14 atm. 1 = Tyrosin; 2 = Phenylalanin; 3 = Histidin; 4 = Hydroxylysin (*allo, threo*); 5 = 1-Methylhistidin; 6 = Ornithin; 7 = Lysin; 8 = 3-Methylhistidin; 9 = MML; 10 = DML; 11 = TML; 12 = Äthanolamin; 13 = Ammoniak; 14 =  $N^G, N^G$ -DMA; 15 =  $N^G, N'^G$ -DMA; 16 =  $N^G$ -MMA; 17 = Arginin.

der Urin filtriert, mehrmals im Vakuum zur Trockne eingengt und dann mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

## ERGEBNISSE

Fig. 1a zeigt die Trennung eines synthetischen Aminosäuregemisches, das ausser den methylierten Lysinen ( $N^{\epsilon}$ -MML,  $N^{\epsilon}$ -DML und  $N^{\epsilon}$ -TML) noch Histidin, Hydroxylysin (*allo*, *threo*), 1-Methylhistidin, Ornithin, Lysin, Äthanolamin, Ammoniak,  $N^G, N^G$ -DMA,  $N^G, N'^G$ -DMA,  $N^G$ -MMA und Arginin enthielt.

Grössere Mengen an Äthanolamin und Ammoniak stören nicht, da der Äthanolamin- bzw. Ammoniakpeak erst 30 min bzw. 40 min nach dem  $N^{\epsilon}$ -TML eluiert werden.

Fig. 1b gibt die Auftrennung von 200  $\mu$ l Urinhydrolysat wieder. Ausser den methylierten Lysinen ( $N^{\epsilon}$ -MML,  $N^{\epsilon}$ -DML und  $N^{\epsilon}$ -TML) wurden nur  $N^G, N^G$ -DMA und  $N^G, N'^G$ -DMA im Urin gefunden. Selbst bei Anwendung von 5 ml Urinhydrolysat war  $N^G$ -MMA nicht nachweisbar.

Auch basisches Myelinproteinhydrolysat wurde aufgetrennt. Bei einer Anwendung von 3.35 mg Proteinhydrolysat ist unter den gewählten Analysenbedingungen noch eine sehr gute Auftrennung zwischen  $N^G$ -MMA und Arginin möglich, obwohl hier extreme Mengenverhältnisse vorliegen. Neben  $N^G$ -MMA trat als weiteres Argininderivat nur  $N^G, N'^G$ -DMA auf. Methylierte Lysinderivate waren nicht vorhanden.

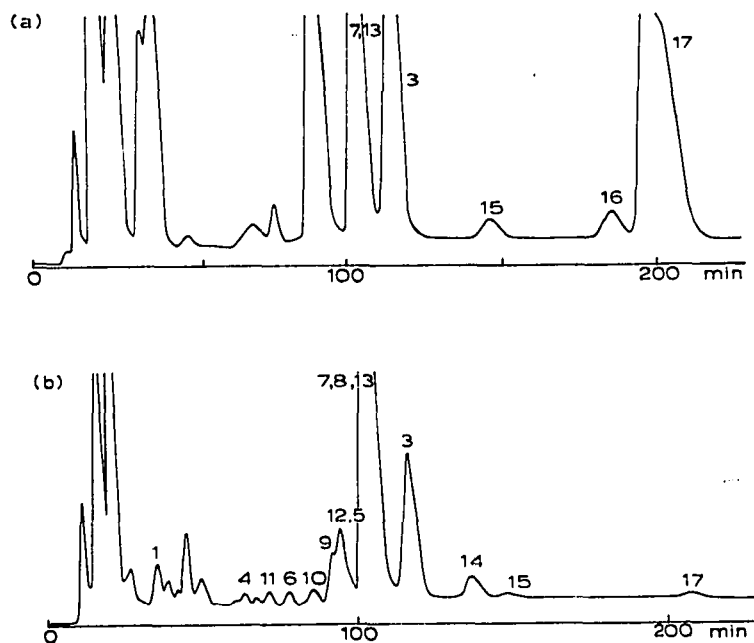


Fig. 2. Auftrennung von 2.4 mg basischem Myelinprotein (a) und 100  $\mu$ l Urin (b). Bedingungen: Ionenaustauscherharz M 82 (Beckman, München, B.R.D.),  $0.9 \times 23$  cm; Puffer, 0.49 N Na-Citrat pH 4.44; Pufferfluss 60 ml/h; Ninhydrinfluss 30 ml/h; Druck, 4–5 atm; Temperatur, 55°. Bezeichnung der Verbindungen, siehe Fig. 1.

Ein weiteres Testobjekt für die Güte der Trennung und die Anwendung grösserer Hydrolysatmengen war Humanplasma. Bis zu 40 ml Plasmahydrolysat wurden angewandt. Auch hier wurde die Trennung durch grosse Lysinmengen und den unterschiedlichen Mengenverhältnissen zwischen N<sup>ε</sup>-MML, N<sup>ε</sup>-DML und N<sup>ε</sup>-TML nicht beeinträchtigt. Neben N<sup>ε</sup>-MML, N<sup>ε</sup>-DML und N<sup>ε</sup>-TML war noch N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-DMA und N<sup>α</sup>,N<sup>α</sup>-DMA nachweisbar.

Die beschriebene Methode hat den Nachteil, dass zur Auftrennung methylierter basischer Aminosäuren eine Analysenzeit von 9 h erforderlich ist. Sofern nur die Auftrennung methylierter Arginine interessiert, lässt sich die Analysenzeit durch Änderung der Bedingungen auf die Hälfte verkürzen.

Fig. 2 zeigt zwei Anwendungsbeispiele unter den geänderten Analysenbedingungen. Die Beispiele zeigen, dass diese Schnellmethode wohl zur Trennung methylierter Arginine, nicht aber zur Bestimmung von methylierten Lysinderivaten ausreicht.

#### LITERATUR

- 1 Y. Kakimoto und S. Akazawa, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5751.
- 2 M. Reporter und I. L. Corbin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43 (1971) 644.
- 3 H. Tabor, C. White Tabor und F. Irreverre, *Anal. Biochem.*, 55 (1973) 457.
- 4 W. K. Paik und S. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40 (1970) 224.
- 5 G. E. Deibler und R. E. Martenson, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 2387.
- 6 Y. Kakimoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 243 (1971) 31.
- 7 T. Nakajima, Y. Matsuoka und Y. Kakimoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 230 (1971) 212.
- 8 K. Hempel, H. W. Lange und L. Birkofer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350 (1969) 867.
- 9 E. A. Werner, *J. Chem. Soc.*, 105 (1914) 923.
- 10 L. Birkofer, K. Hempel und W. Nouvertné, *Chem. Ber.*, 98 (1965) 3200.