

matographiert. Die *N*_α-Methyltryptophan-Zone wurde eluiert, mit 4 mg Trägermaterial versetzt und auf Dünnschichtplatten (Kieselgel G, Merck) in n-Butanol/Eisessig/Wasser 80:15:5¹ rechromatographiert. Die Radioaktivitäts-Messung des von den Platten eluierten *N*_α-Methyltryptophans ergab insgesamt 5,12 · 10³ dpm ¹⁴C und 5,63 · 10³ dpm ³H. Das Verhältnis Tritium:¹⁴C ist also gegenüber der eingesetzten Verbindung von 1,59 auf 1,10 abgesunken. Man muß daher annehmen, daß tatsächlich in einem gewissen Maße auch eine Remethylierung stattfinden kann. Da aber das in der Zelle vorliegende *N*_α-Methyltryptophan trotzdem noch einen großen Teil der

Tritiumaktivität in der Methylgruppe enthält, die Alkaloide jedoch nur noch außerordentlich wenig Tritium aufweisen, ist die Entmethylierung anscheinend doch eine notwendige Voraussetzung für den Einbau, d. h. die Biosynthese der Mutterkornalkaloide verläuft wahrscheinlich nicht über das *N*_α-Methyltryptophan.

Herrn Professor Dr. F. WEYGAND und Herrn Professor Dr. K. MOTHES danken wir herzlich für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Unser Dank gilt ferner Fräulein W. EISELE für ihre Mithilfe bei der Durchführung der radioaktiven Synthesen und Fräulein H. PFLAUMER für die Ausführung der Radioaktivitäts-Bestimmungen.

Synthese von Glucose-3.4-¹⁴C hoher spezifischer Aktivität

Von FRANZ FIEDLER* und ACHIM TREBST*

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforschg. **19** b, 395—397 [1964]; eingegangen am 21. Januar 1964)

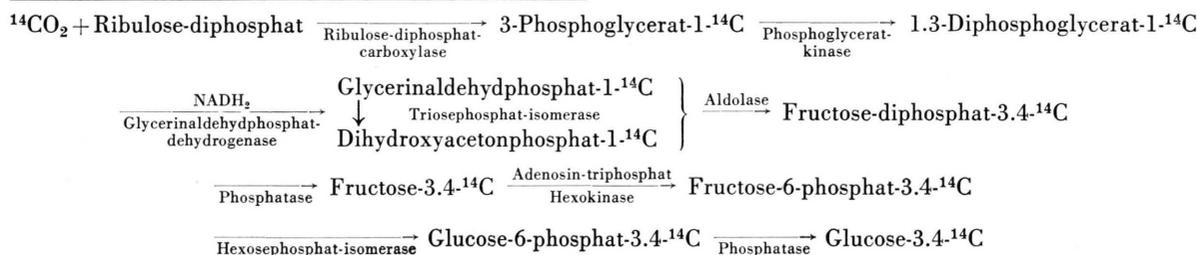
The enzymic synthesis of glucose-3,4-¹⁴C of high specific activity from ¹⁴CO₂ and ribulose-diphosphate and via phosphoglyceric acid and fructose-diphosphate is described.

Die bisher gebräuchlichste Methode zur Synthese von Glucose-3.4-¹⁴C besteht in der Verfütterung von ¹⁴CO₂ an Ratten und Aufarbeitung des Leberglykogens¹. Die spezifische Aktivität dieser Präparate ist aber für viele Zwecke nicht ausreichend.

Zur Darstellung streng nur in C-3 und C-4 mit ¹⁴C markierter Glucose hoher spezifischer Aktivität erschien uns ein Weg, ausgehend von 3-Phosphoglycerinsäure-1-¹⁴C, erfolgversprechend. Diese ist durch die Umsetzung von Ribulose-diphosphat mit ¹⁴CO₂ mit Hilfe des Enzyms Ribulose-diphosphat-carboxylase, dem im Calvincyclus ersten Enzym der

photosynthetischen CO₂-Fixierung, bequem zugänglich. Enzymatische Reduktion mit NADH₂, Isomerisierung der Triosephosphate und Aldolasekondensation sollte zu Fructose-diphosphat-3.4-¹⁴C führen. Die Umwandlung von positionsmarkiertem Fructose-diphosphat in Glucose mit Hilfe von Enzymen ist von uns bereits beschrieben worden². Die für diese Schritte erforderlichen Reagenzien und Enzyme sind käuflich, und die Lage der Gleichgewichte ließ annehmbare Ausbeuten erwarten.

Der eingeschlagene Reaktionsweg ist in folgendem Schema dargestellt:



Durch Verwendung von ¹⁴CO₂ sehr hoher spezifischer Aktivität lieferte eine im μMol-Maßstab durchgeführte Synthese, die enzymatische Umsetzungen

mit geringen Reagenzienmengen und bequeme papierchromatographische Aufarbeitung erlaubte, dennoch ausreichende Mengen an radioaktivem Produkt.

* Neue Adresse: Pflanzenphysiolog. Institut der Universität Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanzen.

¹ S. ARONOFF, Techniques of Radiobiochemistry, S. 115, The Iowa State College Press, Iowa 1958, USA.

² A. TREBST u. F. FIEDLER, Z. Naturforschg. **17** b, 553 [1962].

Viele der Reaktionsschritte ließen sich in einem Ansatz durchführen, so daß die neunstufige Synthese nur vier verschiedene Ansätze erforderte. Die umgesetzten Mengen und die erzielten Ausbeuten sowie die spezifischen Aktivitäten sind in Tab. 1 angegeben.

Die Abnahme der spezifischen Radioaktivität bei der Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ in Phosphoglycerinsäure-1- ^{14}C dürfte von einem CO_2 -Gehalt der verwendeten Reagenzien herrühren.

Derivat	C-Atome der Glucose	Spezif. Radioaktivität [ipm/mMol]	% der Glucoseaktivität
Kaliumgluconat	C-1 bis C-6	268 400	100
Glucosazon	C-1 bis C-6	268 600	100
Mesoxalaldehyd-bis-phenylhydrazon	C-1 bis C-3	137 300	51,1
Formaldimedon	C-6	490	0,2
Glucosazon	C-1 bis C-6	1603000	100
Glyoxalosazon	C-1 + C-2	2620	0,16

Tab. 2. Abbau der Glucose-3,4- ^{14}C .

Zur Kontrolle der Radioaktivitätsverteilung wurde ein chemischer Abbau der erhaltenen Glucose-3,4- ^{14}C durchgeführt (nach Verdünnung einer Probe mit einigen mMolen inaktiver Glucose). Zur Radioaktivitäts-Messung wurden die Proben im Bombenrohr verbrannt und die Radioaktivität im Gaszählrohr nach SIMON³ bestimmt*. Zwei verschiedene Derivate (Kaliumgluconat⁴ und Glucosazon⁵) er-

gaben nach einmaliger Umkristallisation übereinstimmende Werte der spezifischen Radioaktivität. Das Glucosazon wurde einer Perjodatspaltung⁶ unterworfen. Das entstehende Mesoxalaldehyd-bis-phenylhydrazon enthält C-1 bis C-3 der Glucose. Der Formaldehyd (C-6 der Glucose) wurde als Dimedonderivat isoliert. Ferner wurde ein (nach geringerer Verdünnung mit inaktiver Glucose) erhaltenes Glucosazon nach der Methode von DIELS⁷ abgebaut. Diese liefert C-1 und C-2 der Glucose als Glyoxalosazon.

Die Abbauergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Innerhalb der Fehlergrenzen der Messung ($\pm 1\%$) enthält die obere Hälfte des Glucosemoleküls die gleiche Radioaktivität wie die untere. In C-6 wurden nur 0,2% der Radioaktivität der Glucose gefunden, und in C-1 + C-2 nur 0,16 Prozent. Die Spezifität der radioaktiven Markierung und die Gleichverteilung in C-3 und C-4 ist also sehr gut.

Experimenteller Teil

3-Phosphoglycerinsäure-1- ^{14}C

Die Reaktion wurde in 2 W a r b u r g - Gefäßen von etwa 20 ml Inhalt mit Doppel-Ansatzbirne bei 25 °C durchgeführt. Jedes Gefäß enthielt in einem Volumen von 4 ml in μMolen : Tris-HCl-Puffer $p_{\text{H}} = 8,0$ 300; MgCl_2 60; Äthylendiamin-tetraacetat 6; reduziertes Glutathion 12, 0,5 mg Kohlensäure-anhydratase (Cartase der Fa. Schering AG; 260 Einheiten/mg) und 25 mg

Substanz	Menge [μMol]	Radioaktivität [μC]	Spezif. Aktivität [$\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$]	Ausbeute	
				der einzelnen Schritte [%]	bezogen auf eingesetztes $^{14}\text{CO}_2$ [%]
Eingesetztes $^{14}\text{CO}_2$	36	1440	40		
Phosphoglycerinsäure-1- ^{14}C : nach $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung: isoliert	40	425 320	8	55 (bezogen auf Ribulose-diphosphat)	30 22
NADH ₂ -Verbrauch bei der Reduktion:	27			67 (bezogen auf Phosphoglycerinsäure)	15
Fructose-3,4- ^{14}C	11	170	15,5	55 (bezogen auf Phosphoglycerinsäure)	12
Glucose-3,4- ^{14}C		110		65 (bezogen auf Fructose-3,4- ^{14}C)	8

Tab. 1. Ausbeute der einzelnen Schritte der Darstellung von Glucose-3,4- ^{14}C .

* Wir danken Herrn Dozent Dr. H. SIMON für die Durchführung der Radioaktivitätsanalysen.

³ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, *Angew. Chem.* **71**, 303 [1959].

⁴ S. MOORE u. K. P. LINK, *J. biol. Chemistry* **133**, 293 [1940].

⁵ H. SIMON u. J. STEFFENS, *Chem. Ber.* **95**, 358 [1962].

⁶ S. ARONOFF, *l. c.*¹, S. 110.

⁷ O. DIELS, R. MEYER u. O. ONNEN, *Liebigs Ann. Chem.* **525**, 94 [1936].

(etwa 25 Einheiten) Ribulosediphosphat-Carboxylase, nach RACKER⁸ aus Spinat isoliert. In dem einen Schenkel der Doppellansatzbirne befanden sich je 0,2 ml halbkonzentrierte HCl, im anderen 3,5 mg (18 μ Mole) Ba¹⁴CO₃ (0,7 mC). Nach Temperatenausgleich wurde die Säure in der Ansatzbirne zum Ba¹⁴CO₃ gekippt. Die Aufnahme des entstehenden ¹⁴CO₂ wurde manometrisch verfolgt. Nach 30 min war die Hauptmenge absorbiert. In jedes Gefäß wurde nun unter möglichst kurzzeitigem Öffnen eine auf $p_H=8$ gebrachte Lösung von 18 μ Molen Ribulose-diphosphat (dargestellt nach HORECKER⁹) in 1,5 ml einpipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stdn. wurde die BaCl₂-haltige Salzsäure aus der Doppellansatzbirne zum Unterbrechen der Reaktion eingekippt. Das ausgetriebene, nicht umgesetzte ¹⁴CO₂ wurde manometrisch gemessen (etwa 50% des eingesetzten). Es wurde durch einen N₂-Strom in eine Falle mit NaOH übergeführt.

Der Inhalt der beiden Warburg-Gefäße wurde nach Behandlung mit Dowex 50 (H⁺-Form) papierchromatographisch aufgearbeitet (n-Butanol-Essigsäure-Wasser 50 : 14 : 35). Eine enzymatische Gehaltsbestimmung ergab in den Eluaten der Papierchromatogramme 40 μ Mole 3-Phosphoglycerinsäure, entsprechend einer Ausbeute von 55% (bezogen auf eingesetztes Ribulose-diphosphat). Zur Reinigung wurde das Eluat mit Dowex 50 (H⁺-Form) und Norit A behandelt und dann bis zur Trockene lyophilisiert. Der Rückstand wurde wie folgt weiterverarbeitet.

Fructose-1.6-diphosphat-(3.4-¹⁴C)

Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 6,0 ml in μ Molen: 3-Phosphoglycerinsäure-1-¹⁴C 40; Tris-HCl-Puffer $p_H=8.400$; MgCl₂ 20; reduziertes Glutathion 10; Äthylendiamin-tetraacetat 10; Adenosin-triphosphat 70; NADH₂ 50; und folgende Enzyme (Fa. Boehringer) (in μ g): Phosphoglyceratkinase 20 (3,5 Einheiten); Triosephosphatdehydrogenase 200 (5 Einheiten); Triosephosphatisomerase 20 (55 Einheiten) und Aldolase 200 (3,5 Einheiten). Es wurde bei Zimmertemperatur inkubiert und der NADH₂-Verbrauch in Proben durch die Extinktion bei 340 $m\mu$ bestimmt. Nach 3 Stdn. ergab sich eine Abnahme um 27 μ Mole (67% der eingesetzten 3-Phosphoglycerinsäure). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,4 ml Eisessig gestoppt und die Lösung zunächst mit 1 g Dowex 50 (H⁺-Form), dann zur Entfernung der Nucleotide (Kontrolle durch Messung der Lichtabsorption einer Probe bei 260 und 280 $m\mu$) mit 0,8 g Norit A (mit 10-proz. Essigsäure gewaschen, dann mit $3 \cdot 10^{-3}$ -m. Fructosediphosphat in 10-proz. Essigsäure behandelt und gründlich mit Wasser nachgewaschen) behandelt. Dowex 50 und Norit A wurden mit einigen ml Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate durch Lyophilisieren eingengt. Die Chromatographie erfolgte wie unter „3-Phosphoglycerinsäure-1-¹⁴C“ angegeben.

Fructose-3.4-¹⁴C

Die Zonen mit der hauptsächlichlichen Radioaktivität (ca. 90%), die dem R_f -Wert und einem enzymatischen Test nach (neben Phosphoglycerinsäure und Triosephosphat) das Fructose-diphosphat enthielten, wurden eluiert und zur Trockene lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit 50 μ Molen MgCl₂ und 0,2 ml 10-proz. Essigsäure versetzt und mit Methylrot als Indikator auf $p_H 5,5$ eingestellt. Die Lösung (5 ml) wurde mit 0,5 ml einer Polidase-lösung (saure Phosphatase) versetzt, die folgendermaßen erhalten wurde: 1 g des handelsüblichen Polidase-Trockenpulvers wurde in 100 ml Wasser gelöst und bei 0° mit Ammonsulfat gefällt. Die Fraktion von 0,75 bis 1,0 Sättigung wurde in 3 ml Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung setzte in einem analogen Ansatz ($5 \cdot 10^{-3}$ -m. an Fructose-diphosphat) in der Stde. etwa 20 μ Mole Orthophosphat frei.

Die Lösung der radioaktiven Zuckerphosphate wurde mit der Polidase bei Zimmertemperatur über Nacht inkubiert und nach Behandeln mit Dowex 50 (H⁺-Form) auf Papier (Laufmittel Phenol-Wasser 80 : 20) chromatographiert. Es wurden drei Zonen erhalten mit den R_f -Werten 0,35 (Glycerinsäure), 0,55 (Fructose, etwa 50% der Radioaktivität) und 0,85 (Triosen).

Glucose-3.4-¹⁴C

Die Zonen der Fructose wurden mit Wasser in etwa 7 ml eluiert, die Lösung mit einer Mischung von Dowex 50 (H⁺-Form) und Dowex 2 (CO₃²⁻-Form) be-

handelt und zur Trockene lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2,0 ml behandelt mit (in μ Molen): Tris-HCl-Puffer $p_H = 8,0$ 100; MgCl₂ 10; Äthylendiamin-tetraacetat 10; Adenosin-triphosphat 5; 0,5 mg Hexokinase (Sigma, Typ IV, crude, from yeast) und 10 μ g Phosphoglucose-Isomerase (4 Einheiten; Fa. Boehringer). Nach 1 Stde. bei Zimmertemperatur wurde eine Probe zum optischen Test nach Warburg entnommen. Danach enthielt die Lösung 11 μ Mole Hexosephosphate (Glucose- und Fructose-6-phosphate). Das ergibt eine Ausbeute von 55%, bezogen auf die beim zweiten Schritt eingesetzten 40 μ Mole Phosphoglycerinsäure.

Nach 1 $\frac{1}{2}$ Stdn. wurde der Reaktionsansatz mit 0,2 ml 10-proz. Essigsäure angesäuert und 1 $\frac{1}{2}$ Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde mit 2-n. Natronlauge gegen Methylrot ein p_H von 5,5 eingestellt und 0,5 ml 2-m. Acetatpuffer $p_H = 5,5$, 5 μ Mole MgCl₂ und 0,5 ml der obigen Polidase-lösung zugesetzt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Fructose-3.4-¹⁴C beschrieben. Die papierchromatographische Trennung lieferte zwei Zonen mit den ungefähren R_f -Werten 0,38 (Glucose; 65% der Radioaktivität) und 0,57 (Fructose; 35% der Radioaktivität).

Wir sind der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung dankbar.

⁸ E. RACKER, in: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. V, S. 226, Academic Press, New York and London 1962.

⁹ L. HORECKER, J. HURWITZ u. P. K. STUMPF, in: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, l. c. ⁸, Bd. III, S. 193.