

Formation of glucuronic acid from uridinediphosphate glucuronic acid

The biosynthesis of ascorbic acid from glucose by the rat, which involves glucuronic acid as an intermediate, has recently been outlined by a number of workers^{1,2,3}. The formation of a glucuronic acid derivative from UDPG* has been described by STROMINGER, *et al.*⁴, as shown in equation (1).



This oxidation produces a nucleotide-bound glucuronic acid, UDPGA. The conversion of UDPGA to free glucuronic acid, a reaction which has not yet been described, would be necessary in the overall conversion of glucose to ascorbic acid by known pathways.

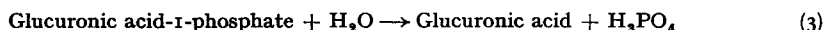
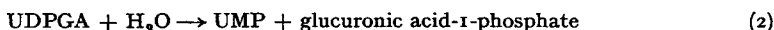
The formation of free glucuronic acid, uridine, and inorganic phosphate can be shown to occur when UDPGA is incubated with a particulate fraction from rat kidney. The observed stoichiometry of the reaction is given in Table I. With shorter incubation times, the transient formation of small amounts of glucuronic acid-1-phosphate and UMP is observed. These two compounds are readily dephosphorylated by the particulate preparation (Table I). It is probable,

TABLE I
HYDROLYSIS OF UDPGA BY RAT-KIDNEY PARTICLES

The incubation mixtures containing 25 μ moles TEA, pH 8.2, 1.0 μ mole substrate, and 0.02 ml kidney particles (12 mg dry weight/ml) in a total volume of 1.0 ml were incubated at 37° for 30 min. The products were estimated by methods described in the text.

Substrate	Product formed (μ moles)		
	Uridine	Glucuronic acid	Inorganic phosphate
UDPGA	1.0	0.8	2.2
Glucuronic acid-1-phosphate	—	0.9	1.1
UMP	1.0	—	1.1

therefore, that the formation of free glucuronic acid from UDPGA in this system occurs in two steps according to equations (2) and (3).



In this pathway the pyrophosphate bond of UDPGA is hydrolyzed by a nucleotide pyrophosphatase⁶ to form UMP and glucuronic acid-1-phosphate. This type of reaction was first demonstrated by KORNBERG AND LINDBERG⁶ using rabbit-kidney particles with DPN as a substrate. The glucuronic acid-1-phosphate formed is then dephosphorylated to yield free glucuronic acid.

UDPG is also broken down by the kidney particles to glucose, inorganic phosphate and uridine. UMP and glucose-1-phosphate can be observed as transient products in this reaction.

Liberation of glucuronic acid from UDPGA was not catalyzed by the supernatant fraction obtained during the preparation of the kidney particles.

Experimental

UDPG was purchased from the Sigma Chemical Co. UDPGA was prepared by enzymic oxidation of UDPG⁴. Glucuronic acid-1-phosphate was prepared by the catalytic oxidation of glucose-1-phosphate⁷.

The particulate fraction was prepared as follows: Two 200-g white, male rats of the Sprague-Dawley strain were decapitated. The kidneys were immediately removed and homogenized with 7 times their weight of 0.1 M Tris, pH 7.5, in a Potter-Elvehjem apparatus at 0° for 3 min. The suspension was centrifuged at 600 $\times g$ in an International refrigerated centrifuge. The supernatant solution was then centrifuged at 60,000 $\times g$ in a Spinco Model L ultracentrifuge. The pellet so obtained was washed twice with 0.9 % NaCl and suspended in 10 ml 0.1 M Tris, pH 7.5 (particulate fraction).

* Abbreviations used: UDPG for uridinediphosphate glucose; DPN for diphosphopyridine nucleotide; UDPGA for uridinediphosphate glucuronic acid; UMP for uridine monophosphate; Tris for tris(hydroxymethyl)aminomethane; and TEA for triethanolamine.

After incubation of the substrates with the particles, the reactions were stopped by heating to 100° for 1 min. The particles were removed by centrifugation and aliquots of the supernatant solution were analyzed for inorganic phosphate by the method of FISKE AND SUBBAROW⁸, for glucuronic acid by its reducing value⁹, and for uridine by the u.v. absorption of samples isolated by paper chromatography¹⁰. The products were identified by a comparison of their electrophoretic¹¹ or chromatographic¹⁰ properties with known compounds. They were located on paper by visual observation under an u.v. lamp or by the use of spray reagents^{12,13}.

National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (U.S.A.)

V. GINSBURG
A. WEISSBACH
E. S. MAXWELL

- ¹ H. H. HOROWITZ AND C. G. KING, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 815.
- ² J. J. BURNS AND C. EVANS, *J. Biol. Chem.*, 223 (1956) 897.
- ³ J. J. BURNS, C. EVANS AND N. TROUSOF, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 785.
- ⁴ J. L. STROMINGER, E. S. MAXWELL, J. AXELROD AND H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 79.
- ⁵ A. KORNBERG, in S. P. COLOWICK AND B. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 665.
- ⁶ A. KORNBERG AND O. LINDBERG, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 665.
- ⁷ C. A. MARSH, *J. Chem. Soc.*, (1952) 1578.
- ⁸ C. H. FISKE AND Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ⁹ J. T. PARK AND M. J. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 149.
- ¹⁰ A. C. PALADINI AND L. F. LEOIR, *Biochem. J.*, 51 (1952) 426.
- ¹¹ E. F. NEUFELD, V. GINSBURG, E. W. PUTMAN, D. FANSHIER AND W. Z. HASSID, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 602.
- ¹² R. S. BANDURSKI AND B. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 405.
- ¹³ E. F. L. J. ANET AND T. M. REYNOLDS, *Nature*, 174 (1954) 930.

Received February 25th, 1958

Gestalt und Längenvermessung des Streifenmosaik-Virus der Gerste*

Im mitteldeutschen Raum kommt an verschiedenen Gerstensorten eine Viruskrankheit vor, die auf den Blättern hellgrüne bis gelbgrüne Streifen verursacht. Symptomausbildung und Wirtspflanzenkreis führten zum Nachweis, dass es sich hierbei um das Streifenmosaikvirus der Gerste handelt¹. Dieses Virus ist in der Neuen Welt seit 1950 bekannt, im europäischen Raum wurde es bisher lediglich in England 1956 nachgewiesen.

Die vorliegende elektronenmikroskopische Arbeit sollte diese ermittelten Untersuchungsbefunde ergänzen bzw. bestätigen. Aus den Blättern erkrankter Pflanzen wurde nach der von JOHNSON² angegebenen Exsudatmethode etwa 0.1 ml Pflanzensaft gewonnen und mit 0.9 ml aqua bidest. verdünnt. Um für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen die gewünschte Reinheit der Objekte zu erhalten, erfolgte das Aufbringen auf die Objektträgerhaut aus Kollodium auf die vom Verfasser schon früher³ beschriebene Weise, die einen Dialysiereffekt durch die Kollodiummembran bewirkt. Zur Kontrasterhöhung wurden die Objekte unter einem Winkel von 45° mit Palladium bedampft. Fig. 1 zeigt das so erhaltene elektronenmikroskopische Bild des Streifenmosaikvirus.

Zur Festlegung der Normallänge wurden ca. 600 verschiedene Virusteilchen vermessen und die Ergebnisse in der üblichen Weise in einem Treppenvolygon mit einer Stufenbreite von 10 m μ dargestellt (Fig. 2). Hiernach ergibt sich ein Hauptmaximum bei etwa 125 m μ und je ein Nebenmaximum bei etwa dem doppelten und dem halben Wert der Normallänge. Die aus den 5 Klassen des Hauptmaximums berechnete mittlere Länge ist 125.2 m μ . Da es nach den Erfahrungen von BRANDES UND PAUL⁴ kaum möglich ist, Normallängendifferenzen von weniger als 10 m μ deutlich zu unterscheiden, so dürfte die Angabe der Normallänge für das Streifenmosaikvirus von 130.7 m μ durch GOLD, SUNESON, HOUSTON UND OSWALD⁵ in Übereinstimmung hiermit sein. Die Dicke beträgt etwa 28 bis 30 m μ bei einzelnen und 25 bis 27 m μ bei zwei nebeneinanderliegenden Teilchen. Der Unterschied dürfte durch die Bedampfung verursacht worden sein.

Fig. 3 zeigt die prozentuale Verteilung des gesamten Virusproteins auf die einzelnen Längen, da in der sonst üblichen Form der Darstellung die Bruchstücke über- und die Längsaggregationen unterbewertet werden.

* Synonyme: Barley stripe mosaic, barley mosaic, barley false stripe, barley mild-stripe mosaic, barley very-mild-stripe mosaic, oat stripe mosaic, falsche Streifenkrankheit der Gerste.