

Table IV. Purification of nucleoside analogues by column chromatography on ion-exchange resins

Compound	Resin type	Column dimensions	Elution with water at flow rate (ml/h)	Major fraction emerged between (ml)
III	DE 52	32 × 2.0	12	63–85
IX (picrate) <sup>a</sup>	DE 52	15 × 1.0	15	70–91
V	AG 1 × 8 (Formate) 200–400 mesh	58 × 3.5	33	116–164
VI	„	19 × 1.5	48	246–317 <sup>b</sup>
VIII	„	45 × 3.5	45	324–404
X	„	16.5 × 3.0	33	146–252
XI	„	32 × 3.5	33	175–294

<sup>a</sup> a crystalline picrate was formed by adding aqueous picric acid, this was collected, washed, dissolved in water and applied to the column;

<sup>b</sup> washed initially with water (112 ml) then eluted with M-formic acid.

TENER<sup>8</sup>. Despite the fact that the 2'- and 4'-hydroxyl groups were not protected during the phosphorylation reaction the 6'-monophosphate (VI) was the only major product, after purification by ion-exchange chromatography it had a similar electrophoretic mobility to AMP and GMP, contained 1 mole equivalent of phosphate, consumed 1 mole equivalent of periodate<sup>9</sup>, gave a purple colour in the BRATTON-MARSHALL test and showed the characteristic ultraviolet spectrum of an aminoimidazole.

A number of other 2'-substituted analogues were synthesized from the appropriate amino sugar. Both the mannose derivative (VII) and arabinose derivative (VIII) have a similar stereochemistry to (II). The galactose compound (IX) which is related to the  $\alpha$ -anomer<sup>10</sup> of (II) was also prepared. All these compounds mutarotate in water and are unstable in acid although they decompose at a slower rate than compound (III).

The method was also applied to the synthesis of 3'-(amino-imidazole carboxamide) derivatives from the methyl glycosides of 3-amino-3-deoxy-D-glucose and 3-amino-3-deoxy-D-altrose<sup>11</sup>; as expected, the products (X and XI) did not consume periodate but were otherwise similar to the isomeric 2'-examples (Tables II and III).

**Experimental procedures.** The 2-amino-2-deoxy-D-mono-saccharide hydrochloride (270 mg) (or methyl glycoside, etc.) dissolved in a minimum volume of water was adjusted to pH 8.0 with solid potassium bicarbonate and then diluted to 8 ml with methanol. Ethyl N-[carbamoyl-(cyano)methyl] formimidate (350 mg) was added and the mixture kept at room temperature for 24 to 48 h. The mixture was evaporated to dryness in a rotary evaporator at 38°C. The residue was dissolved in methanol and again evaporated then redissolved in water and purified by

column chromatography (Table IV). In one case (compound VII) the product crystallized out when the reaction mixture was concentrated and chromatographic purification was unnecessary. Most of the methods used in characterising the products we have described elsewhere<sup>4,10</sup>. Electrophoresis was carried out on a Shandon flat bed apparatus at 10°C using Whatman 3 mm paper at 2 volts per cm at pH 1.85 [acetic acid (15)-formic acid (10)-water (255) (v/v)], pH 9.4 [in NaHCO<sub>3</sub> (56.8) (N · Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14.4)-water (929) (v/v)], and pH 9.1 (1% sodium tetraborate in water); products were detected using a) the BRATTON-MARSHALL spray reagents<sup>12</sup> and b) ammonium molybdate spray reagents for phosphate<sup>13</sup>.

**Zusammenfassung.** Es wird eine Reihe von Imidazolykosiden und deren Synthese beschrieben. Diese eignen sich als Analoga der natürlichen Nukleoside für biologische Versuche.

D. V. WILSON and C. G. BEDDOWS

*Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, Polytechnic of the South Bank, London S.E. 1 (Great Britain), 6 August 1973.*

<sup>8</sup> G. M. TENER, J. Am. Chem. Soc. 83, 159 (1961).

<sup>9</sup> J. DIXON and C. LIPKIN, Analyt. Chem. 26, 1092 (1954).

<sup>10</sup> D. V. WILSON and C. G. BEDDOWS, J. Chem. Soc., p. 1773 (1972).

<sup>11</sup> C. G. BEDDOWS, Ph. D. Thesis (University of Bradford, 1970).

<sup>12</sup> J. BADDILEY, J. G. BUCHANAN, F. E. HARDY and J. STEWART, J. Chem. Soc. p. 2893 (1959).

<sup>13</sup> S. BURROWS, F. ST. R. GRYLLS and J. S. HARRISON, Nature 170, 800 (1952).

## Über das Vorkommen von Carboanhydratase in der Eischale des Huhnes

Die kalkige Eischale des Huhnes besteht zu 97% aus Calciumcarbonat und einer organischen Matrix. An der Eischalenbildung ist Carboanhydratase (E. C. 4.2.1.1.) beteiligt, da dieses Enzym durch die Katalyse der Reaktion  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$  die Bildungsrate des Anions des Calciumcarbonates beschleunigt<sup>1</sup>. Dieses Enzym ist mit Sicherheit im Uterus von Hühnern nachgewiesen worden,<sup>2–4</sup> wo es nicht strukturgebunden in den Mucosazellen vorliegt. In der Mammillenschicht der Eischalen von Hühnern wiesen ROBINSON und KING<sup>6</sup> Carboanhydratase mittels histochemischer Methoden nach. DIAMANTSTEIN<sup>5</sup> und SCHLÜNS<sup>3</sup> konnten diese Beobachtungen

jedoch nicht bestätigen. Wir haben diese Fragestellung erneut aufgegriffen und im Zusammenhang mit der Fraktionierung von Eischalenproteinen bearbeitet<sup>7</sup>.

**Methodik.** Für die Extraktion von Carboanhydratase aus Eischalen wurden Eier (1–2 Tage alt) von HNL-Hybriden verwendet und nach dem von KRAMPITZ und ENGELS<sup>7</sup> beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Besondere Beachtung verdient die Beobachtung, dass allen Pufferlösungen, die zur Extraktion und zur Chromatographie verwendet wurden, 2-Mercaptoäthanol zugesetzt werden musste, um die Aktivität der Carboanhydratase zu erhalten.

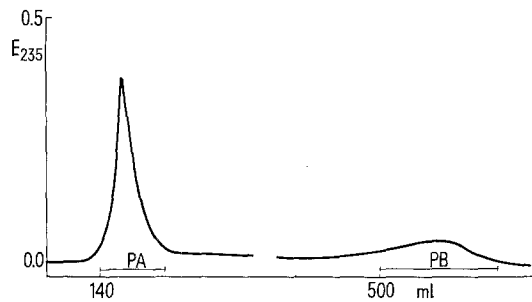


Fig. 1. Trennung löslicher Eischalenproteine (Fraktion M-1) durch Gelpermeation (Bio-Gel P 30, 50–100 mesh; 1×45 cm) Eluant: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2, 10<sup>-3</sup> M EDTA, 10<sup>-3</sup> M 2-Mercaptoethanol. Vo = 140 ml.

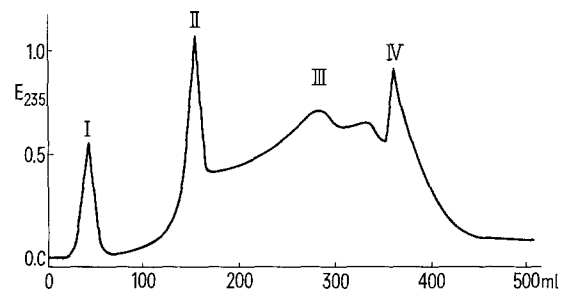


Fig. 2. Trennung von Komponenten der hochmolekularen Fraktion (PA) löslicher Eischalenproteine durch Ionenaustauscherchromatographie (DEAE-SS; 2,5×18 cm) Eluant: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3, mit linearem NaCl-Gradienten (0,5 M NaCl). Durchflussrate: 35 ml/h.

Die lyophilisierten Eischalenextrakte (M-1), die keine Carboanhydratase-Aktivität zeigten, ließen sich an Biogel P-30-Säulen in eine hochmolekulare (PA) und in eine niedermolekulare Fraktion (PB) trennen (Figur 1). Während PB weder Proteine noch Carboanhydratase-Aktivität enthielt, fand sich in der Fraktion PA, die von diesem Gel ausgeschlossen wurde, Carboanhydratase-Aktivität. Die Fraktion PA wurde nach Dialyse und Gefriertrocknung an DEAE-Cellulose (linearer NaCl-Gradient) chromatographiert. Die enzymhaltigen Fraktionen (Figur 2) haben wir durch weitere chromatographische Schritte zu reinigen versucht.

Die Aktivitätsbestimmung der Carboanhydratase erfolgte manometrisch nach KREBS und ROUGHTON<sup>8</sup> in einem Warburggerät bei 0°C, spektrophotometrisch (Hydratation von Acetaldehyd bzw. Pyridinaldehyd) nach POCKER und MEANY<sup>9,10</sup> und durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat nach POCKER und STONE<sup>11</sup>.

**Ergebnisse und Diskussion.** Eischalenextrakte – ohne weitere Anreicherung der organischen Substanz – zeigten keinerlei Carboanhydratase-Aktivität. Dies bestätigt die negativen Befunde von DIAMANTSTEIN<sup>5</sup>. Wenn jedoch eine Abtrennung der niedermolekularen Verbindungen aus den Extrakten vorgenommen wird, lässt sich dieses Enzym nachweisen.

Durch die beschriebenen chromatographischen Reinigungsschritte ließ sich das Enzym anreichern. Über die Reindarstellung des Enzyms (Mol-Gew. ca. 30.000) werden wir an anderer Stelle berichten. Andere Enzympräparationen, z. B. aus Rindererythrozyten, verhielten sich chromatographisch anders als Carboanhydratase aus Eischalen. Die Hauptanteile der Enzymaktivität konnten in Fraktion I gefunden werden, während in Fraktion V (wird durch Nachwaschen der DEAE-Säulen mit 2 M NaCl nach Abschluss der Gradienten-Elution erhalten) eine geringe Restaktivität vorlag. Es ist denkbar, dass es sich bei der Fraktion V um ein wenig aktives Isoenzym handelt.

Carboanhydratase aus Eischalen katalysiert die reversible Hydratation von CO<sub>2</sub>. Dies ist wahrscheinlich auch die primäre Aufgabe des Enzyms in der Eischale. Ferner ist das Enzym in der Lage, die Hydratation von Aldehyden (Acetaldehyd und Pyridinaldehyd) und die Hydrolyse von Estern (*p*-Nitrophenylacetat) zu katalysieren. Diese enzymatischen Aktivitäten der Enzympräparation konnten durch Reaktion mit *p*-Mercuribenzoat gehemmt werden. Da in den Mammillen neben Carboanhydratase Mucopolysaccharide vorkommen und diese in der Lage sind, die Konzentration von Calcium-Ionen zu erhöhen, ist dort die Anwesenheit des Enzyms für das Verständnis der Calcifikation von ausserordentlicher Bedeutung<sup>12</sup>. Durch die Funktion dieses Enzyms wird die Menge der

verfügbaren Carbonat-Ionen am Ort der Calcifikation vergrößert. Das Ansetzen von Calcit-Kristallen erfolgt an der Aussenfläche der Primärsphärite, dem Bildungsort der Calcit-Kristallite in den Mammillen<sup>13</sup>. Die Auflösung der Loculi (Primärsphäriten) bei länger bebrüteten Eiern ist durch die Resorption des Mammillenkalkes durch den Embryo bedingt. Es ist nicht auszuschließen, dass Carboanhydratase durch lokale Ansäuerung<sup>14</sup> im Bereich der Primärsphärite die Bereitstellung von Ca<sup>2+</sup> für den Aufbau des embryonalen Skeletts unterstützt.

**Summary.** The isolation of carbonic anhydrase from hen's egg shells is reported. The enzyme has been purified by gel filtration and ion-exchange chromatography. The elution pattern of carbonic anhydrase from egg shells differs remarkably from that of enzyme preparations of erythrocytes. The purified enzyme catalyzed the reversible hydration of CO<sub>2</sub> and aldehydes as well as the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. Deletion of 2-mercaptoethanol from extraction and elution buffer solutions caused a complete loss of carbonic anhydrase activity, as did the addition of *p*-mercuribenzoate. The biological significance of the occurrence of carbonic anhydrase in the hen's egg shell is discussed.

G. KRAMPITZ<sup>15</sup>, J. ENGELS and I. HELFGEN

*Forschungs- und Lehrbereich Biochemie, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Universität Bonn, Katzenburgweg 7, D-53 Bonn (Deutschland, 23 August 1973.*

<sup>1</sup> R. V. MELDRUS und F. J. W. ROUGHTON, J. Physiol., Lond. 80, 113 (1934).

<sup>2</sup> R. V. COMMON, J. Agric. Sci. 31, 412 (1941).

<sup>3</sup> T. DIAMANTSTEIN und J. SCHLÜNS, Acta histochem. 19, 296 (1964).

<sup>4</sup> R. S. BERNSTEIN, T. NEVALAINEN, R. SCHRAER und H. SCHRAER, Biochim. biophys. Acta 159, 367 (1968).

<sup>5</sup> T. DIAMANTSTEIN, Arch. Geflügelkde. 30, 308 (1966).

<sup>6</sup> D. S. ROBINSON und N. R. KIND, Nature, Lond. 199, 497 (1963).

<sup>7</sup> G. KRAMPITZ und J. ENGELS, Biomineralisation, im Druck.

<sup>8</sup> H. A. KREBS und F. J. W. ROUGHTON, Biochem. J. 49, 550 (1948).

<sup>9</sup> Y. POCKER und J. E. MEANY, Biochemistry 44, 2535 (1965).

<sup>10</sup> Y. POCKER und J. E. MEANY, Biochemistry 6, 239 (1967).

<sup>11</sup> Y. POCKER und J. T. STONE, Biochemistry 6, 668 (1967).

<sup>12</sup> T. DIAMANTSTEIN, K. BRONCH und J. SCHLÜNS, Nature, Lond. 203, 88 (1964).

<sup>13</sup> H. K. ERBEN, Biomineralisation 1, 1 (1970).

<sup>14</sup> B. COURVOISIER, J. A. FISCHER und M. WERNLY, Klinik der inneren Sekretion, 2. Auflage (Ed. A. LABHART; Springer-Verlag, Berlin 1971), p. 906.

<sup>15</sup> Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Untersuchungen.