

SYNTHESE VON [³²P]PHOSPHOENOLPYRUVAT

Hans-Frieder LAUPPE, Gisela RAU
und Wolfgang HENGSTENBERG

*Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Abteilung Molekulare Biologie,
69 Heidelberg, Jahnstrasse 29, W. Germany*

Received 12 July 1972

Bei unseren Untersuchungen über das PEP-abhängige Phosphotransferasesystem von *Staphylococcus aureus* [1] bemühten wir uns um eine einfache Synthese von ³²P-markiertem Phosphoenolpyruvat (³²PEP).

Die gebräuchlichen Darstellungsverfahren von PEP erfordern flüchtige Phosphorylierungsmittel wie POCl_3 [2, 3] oder Trimethylphosmit [4], die als ³²P-markierte Verbindungen unangenehm zu handhaben und wesentlich teurer als ³²P-Orthophosphat sind.

Das biologische Darstellungsverfahren [5], das die Isolierung von Mitochondrien mit intakter oxydativer Phosphorylierung erfordert, benutzt als Phosphatdonor zwar $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$, ist jedoch umständlich und liefert ³²PEP von geringer spezifischer Aktivität.

Im folgenden beschreiben wir eine einfache chemische Synthese von ³²PEP unter Verwendung von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$. β -Chlormilchsäure wird mit Orthophosphat in Gegenwart von Trichloracetonitril und überschüssigem Diäthylamin in DMSO phosphoryliert analog dem Phosphorylierungsverfahren für Nukleoside [6]. Unter diesen Bedingungen erfolgt offenbar die Eliminierung von HCl aus phosphorylierter β -Chlormilchsäure unter Bildung von ³²PEP. Das gebildete Produkt (Ausbeute 70% bezogen auf eingesetztes $^{32}\text{PO}_4^{3-}$) hat dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie PEP, phosphoryliert ADP zu ATP in Gegenwart von Pyruvatkinaise, und ist Phosphatdonor im PEP-abhängigen Phosphotransferasesystem von *S. aureus*. Die beiden enzymatischen Reaktionen identifizieren das Phosphorylierungsprodukt als PEP.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

1 μMol Orthophosphorsäure, die gewünschte Menge trägerfreie ³²P-markierte Phosphorsäure (Buchler, Braunschweig) und 50 μMol β -Chlormilchsäure (Sigma Chemical Company) wurden dreimal unter Feuchtigkeitsausschluss mit absolutem Acetonitril zur Trockene eingedampft. Dann wurde das Gemisch in 0.5 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst, mit 300 μMol trockenem Triäthylamin und 40 μM Trichloracetonitril versetzt und 2 hr bei 37° inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zufügen von 1 ml H_2O gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde papier-elektrophoretisch ausgetrennt. (Papier: Macherey und Nagel, 827 35 X 40 cm; Puffer: 0.05 M Triäthylammoniumacetat pH 4.5; Pherograph nach Wieland und Pfleiderer). Die radioaktiven Zonen wurden durch Autoradiographie lokalisiert, die PEP-haltige Bande mit Wasser eluiert und neutralisiert. Ausbeute bezogen auf $^{32}\text{PO}_4^{3-}$: 70%. Zur Erhöhung der spez. Aktivität kann die Menge an Orthophosphorsäure verringert werden.

Literatur

- [1] T. Korte und W. Hengstenberg, European J. Biochem. 23 (1971) 295.
- [2] W. Kiessling, Berichte d.D.Chem. Gesellschaft 68 (1935) 597.
- [3] E. Baer, Biochem. Preprns. 2 (1952) 25.
- [4] V.M. Clark und A.J. Kirby, Biochem. Preprns. 11 (1966) 101.
- [5] W. Kundig und S. Roseman, J. Biol. Chem. 246 (1971) 1393.
- [6] R.H. Symons, Biochim. Biophys. Acta. 155 (1968) 609.