

SYNTHESE VON [ $^{32}\text{P}$ ]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  $^{32}\text{P}$ -markiertem Phosphoenolpyruvat ( $^{32}\text{PEP}$ ).

Die gebräuchlichen Darstellungsverfahren von PEP erfordern flüchtige Phosphorylierungsmittel wie  $\text{POCl}_3$  [2, 3] oder Trimethylphosphit [4], die als  $^{32}\text{P}$ -markierte Verbindungen unangenehm zu handhaben und wesentlich teurer als  $^{32}\text{P}$ -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  $^{32}\text{PEP}$  von geringer spezifischer Aktivität.

Im folgenden beschreiben wir eine einfache chemische Synthese von  $^{32}\text{PEP}$  unter Verwendung von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ .

$\beta$ -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  $\beta$ -Chlormilchsäure unter Bildung von  $^{32}\text{PEP}$ . 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 Pyruvatkinase, und ist Phosphatdonor im PEP-abhängigen Phosphotransferasesystem von *S. aureus*. Die beiden enzymatischen Reaktionen identifizieren das Phosphorylierungsprodukt als PEP.

*Allgemeine Arbeitsvorschrift*

1  $\mu\text{Mol}$  Orthophosphorsäure, die gewünschte Menge trägerfreie  $^{32}\text{P}$ -markierte Phosphorsäure (Buchler, Braunschweig) und 50  $\mu\text{Mol}$   $\beta$ -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  $\mu\text{Mol}$  trockenem Triäthylamin und 40  $\mu\text{M}$  Trichloracetonitril versetzt und 2 hr bei  $37^\circ$  inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zufügen von 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde papier-elektrophoretisch ausgetrennt. (Papier: Macherey und Nagel, 827 35  $\times$  40 cm; Puffer: 0.05 M Triäthylammoniumacetat pH 4.5; Pherograph nach Wieland und Pfeleiderer). 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. Preps.* 2 (1952) 25.
- [4] V.M. Clark und A.J. Kirby, *Biochem. Preps.* 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.