

für den Beitrag der Freiheitsgrade Nr. 2, 5 und 6 erhält man dann:

$$(Q_{H^+}/Q_{D^+})_{\min} = 0,96 / (6,73 \cdot 1,03) = 0,138.$$

Das Zustandssummen-Verhältnis des Katalysators HA läßt sich durch Anwendung der Gln. (3), (5) und (6) leicht ermitteln, sofern der experimentelle Wert des Lösungsmittel-Isotopeneffektes auf die Aciditätskonstante der betreffenden schwachen Säure bekannt ist. Im Fall der Essigsäure ergibt sich: $Q_{DA}/Q_{HA} = 37,6$. Daraus berechnet man für den Minimalwert des kinetischen Isotopeneffektes auf die allgemeine Säurekatalyse mit langsamer H^{\oplus} -Übertragung auf das Substrat *:

$$(k_{HA}/k_{DA})_{\min} = (Q_{H^+} \cdot Q_{DA}/Q_{D^+} \cdot Q_{HA}) (\lambda_{t,H}/\lambda_{t,D}) = 37,6 \cdot 0,138 \cdot 1,1 = 5,7 \quad (\text{für } 25^{\circ}\text{C}).$$

Hierzu existieren bis heute nur 2 experimentelle Beispiele²⁴, nämlich die Essigsäure-katalysierte Keton-Bildung aus dem Enolat-Ion des 3-Methylacetylacetons ($k_{HA}/k_{DA} = 6,9$) und aus dem Enolat-Ion des 2-Acetylcyclohexanons ($k_{HA}/k_{DA} = 5,9$). In beiden Fällen liegen die Werte oberhalb der theoretisch abgeleiteten unteren Grenze.

Der Schreibende möchte hiermit für wertvolle Diskussionen, die die Gegenstände dieser Arbeit betreffen, folgenden Herren seinen Dank aussprechen: Professor M. KILPATRICK (Argonne National Laboratory), Professor V. J. SHINER (Indiana University) und Professor C. G. SWAIN (Massachusetts Institute of Technology).

* Siehe hierzu die Anmerkung bei der Korrektur zum Abschnitt IV.

²⁴ T. RILEY u. F. A. LONG, J. Amer. chem. Soc. **84**, 522 [1962].

Darstellung und Eigenschaften von Nikotinamid-*N*¹- β -D-gluco-pyranosyl-phosphat und Nikotinamidglucosid-Adenin-Dinucleotid *

Von C. WOENCKHAUS, M. VOLZ und G. PFLEIDERER

Aus dem Institut für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Z. Naturforschg. **19 b**, 467—470 [1964]; eingegangen am 14. Januar 1964)

1-(2',3',4'-O-Triacetyl-1- β -D-gluco-pyranosyl)-3-carboxamido-pyridiniumchlorid wird aus α -1-Chlor-2,3,4-O-triacetyl-gluco-pyranose und Nikotinamid hergestellt. Die freie Hydroxylgruppe in 6-Stellung der Glucose wird mit Phosphoroxchlorid verestert. Durch Acylwanderung entsteht außerdem ein isomeres Produkt. Die Acetylgruppen lassen sich sauer verseifen. Durch Kondensation mit Adenosinmonophosphat erhält man ein Gemisch beider Nikotinamidglucosid-Adenin-Dinucleotid-Isomere. Die Verbindungen sind trotz hoher Affinität zu nucleophilen Agentien auf Grund der sterischen Konfiguration enzymatisch inaktiv.

Bisher ist kein Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid bekannt, bei dem die Zuckerkomponente im Nikotinamidmononucleotid-Teil variiert ist. Dagegen kennt man schon seit längerer Zeit^{1, 5} die nicht phosphorylierten Nikotinamid-*N*¹-glycoside verschiedener Zucker, die vornehmlich als Modelle zur Aufklärung der Coenzymstruktur und Wasserstoffübertragung gedient haben. Die Synthese geht meist von den Acetobromzuckern aus, die mit Nikotinamid zum Glykosid kondensiert werden. In neuerer Zeit sind andere Herstellungsmöglichkeiten beschrieben worden². Für eine anschließende selektive Phosphory-

lierung sind diese Methoden wenig geeignet. Auch bei nicht säure- oder alkali-labilen *N*-Glucosiden geht die Synthese der 6'-Phosphate über eine Reihe von Zwischenstufen³. Wir haben nach einer Möglichkeit gesucht, die Synthese mit einem Halogenzucker durchzuführen, dessen Hydroxylgruppen bis auf die in 6-Stellung geschützt sind. Die Darstellung von α -1-Chlor-2,3,4-O-triacetylgluco-pyranose gelang nach einer Vorschrift von ZEMPLEN und GERECs⁴ aus Triacetylävoglucosan mit Titan-tetrachlorid. Analog der Darstellung von 1-(O-Tetraacetyl-1- β -D-gluco-pyranosyl)-3-carboxamido-pyridiniumchlorid wurde

* NAD-Analogenes, in dem die Ribose des Nikotinamidmononucleotidteils durch Glucose ersetzt ist.

¹ P. KARRER, B. RINGIER, J. BÜCHI, H. FRITZSCHE u. U. SOLMSEN, Helv. chim. Acta **20**, 55 [1937].

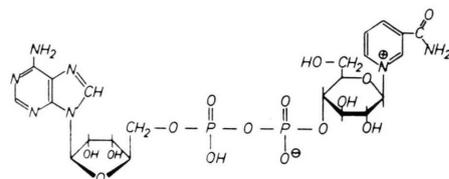
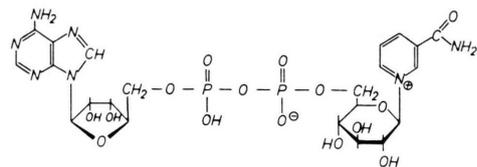
² A. KLEMER u. I. RIDDER, Chem. Ber. **96**, 1976 [1963].

³ B. ZMUDZKA, W. SZER u. D. SHUGAR, Acta biochim. polon. **9**, 321 [1963].

die α -1-Chlor-*O*-triacetyl-glucopyranose mit Nikotinamid in Acetonitril umgesetzt⁵. Die Ausbeute an teilacetyliertem Nikotinamid-glucosid betrug 35% des eingesetzten Halogenzuckers. Das Glucosid zeichnete sich durch eine 46-mal schnellere Addition von Cyanidionen am C-Atom 4 des Pyridinringes gegenüber dem natürlichen β -Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid aus. Die Phosphorylierung ließ sich in Pyridin mit Phosphoroxchlorid durchführen. Das Nikotinamid-*N*¹-glucopyranosylphosphat wurde durch Säulenchromatographie an Dowex-50-H⁺ von nicht umgesetztem Ausgangsprodukt und Pyridinresten befreit. Die Acetylgruppen ließen sich durch saure Hydrolyse entfernen. Die Reinigung des Phosphats von überschüssiger Phosphorsäure und höher phosphorylierten Verbindungen wurde an Dowex-1-formiat durchgeführt. Aus der Lösung wurde der Ester durch Fällen mit Aceton in fester Form erhalten. Die Ausbeute betrug 25% des eingesetzten Glucosids. Im Pherogramm erwies sich die Substanz als nicht einheitlich und wurde nach längerer Laufzeit in zwei dicht hintereinander gelegene Banden aufgespalten. Beide Komponenten lagen etwa im Verhältnis 1 : 1 vor. Eine Auftrennung des Substanzgemisches erreichten wir an Dowex-1-Phosphat. Durch Gefriertrocknung konnten wir die beiden isomeren Verbindungen in festem Zustand isolieren. Zur Identifizierung wurden sie mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert und das Hydrolysat auf Glucose-6-phosphat mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat getestet. Nur bei der zuerst eluierten Verbindung, die als Fraktion I aufgefangen wurde, und bei dem ursprünglichen Gemisch zeigte sich nach der Hydrolyse eine positive Reaktion. Wir vermuten, daß neben dem Nikotinamid-*N*¹- β -D-glucopyranosyl-6'-phosphat auch das 4'-Phosphat gebildet werden konnte, das anschließend als Fraktion II von der Säule eluiert wurde. ZMUDZKA fand, daß bei der Synthese des 1-(β -D-Glucopyranosyl)-uracil-6'-phosphats³ auch das 4'-Isomere auf Grund einer Acetylwanderung gebildet wurde. Das Nikotinamid-*N*¹- β -D-glucopyranosylphosphat-Gemisch ist biochemisch – im Gegensatz zum Nikotinamid-*N*¹- β -D-ribofuranosyl-5'-phosphat – im Test mit Leber-Alkoholdehydrogenase nicht aktiv. Die Entstehung eines Maximum bei

329 m μ ist enzymunabhängig und dürfte auf einer langsamen Addition von OH-Ionen beruhen.

Die Synthese des Nikotinamidglucosid-Adenin-Dinucleotids haben wir analog einer Vorschrift von TODD⁶ durchgeführt. Adenosinmonophosphat und Nikotinamid-*N*¹- β -D-glucopyranosylphosphat-Gemisch wurden in wäßrigem Pyridin mit *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid zum Pyrophosphorsäureester kondensiert. Das Coenzymanalogue wurde von Ausgangs- und Nebenprodukten durch Gradientenelution an Dowex-1-formiat mit Ameisensäure steigender Konzentration gereinigt. Die Ausbeute betrug 7 Prozent. Auf Grund der starken Positivierung des



C-Atoms 4 im Pyridinring beim Glucosid und Glucosidphosphat hatten wir gehofft, daß das gesamte Coenzymanalogue enzymatisch zu reagieren vermag, denn die Bindungsseite – der Adenosindiphosphatteil – des Coenzym war nicht verändert. Der Nikotinamidteil sollte auf Grund der sterischen Verhältnisse nicht reagieren, aber wegen der hohen Affinität zu nucleophilen Agentien Hydridionen schon durch geringe enzymatisch aktivierende Einflüsse addieren. Die Cyanid-Dissoziationskonstante liegt bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ und damit eine Zehnerpotenz niedriger als die des Nikotinamid-Adenin-Dinucleotids ($0,6 \cdot 10^{-2}$). Im enzymatischen Test mit Leber-Alkoholdehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase wurde jedoch keine Reaktion beobachtet. Ein langsamer Extinktionsanstieg bei 339 m μ ($> p_H$ 8,2) war enzymunabhängig. Das Ergebnis wirft die Frage nach der Streospezifität der Nikotinamidseite im Coenzym auf. Wir sind damit beschäftigt, dieses Problem durch Einführen verschiedener Zuckerreste weiter aufzuklären.

⁴ G. ZEMPLEN u. A. GERECs, Chem. Ber. **64**, 1545 [1931].

⁵ L. J. HAYNES u. A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1950**, 306.

⁶ N. A. HUGHES, G. W. KENNER u. A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1957**, 3733.

Experimenteller Teil

1-(2'.3'.4'-O-Triacetyl-1- β -D-glucopyranosyl)-3-carboxamido-pyridiniumchlorid (I)

25 g (0,077 Mol) α -1-Chlor-2.3.4-O-triacetylglucopyranose werden unter Feuchtigkeitsausschluß in 200 cm³ absolutem Acetonitril mit 10 g (0,082 Mol) Nikotinamid 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Schon nach kurzer Zeit scheidet sich ein kristallines Produkt ab. Die Lösung verfärbt sich gelbbraun. Der Niederschlag, Nikotinamid-Hydrochlorid, wird nach dem Erkalten abgesaugt und mit Acetonitril gewaschen. Filtrat und Waschlösung werden vereinigt und unter vermindertem Druck bei 30 °C zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der Rückstand wird mit Isopropanol verdünnt und das Glucosid mit Essigester gefällt. Durch mehrmaliges vorsichtiges Umfällen erhält man das 1-(2'.3'.4'-O-Triacetyl-1- β -D-glucopyranosyl)-3-carboxamido-pyridiniumchlorid als schwach gelb gefärbte kristalline Substanz. Das Rohprodukt nach der ersten Fällung ist noch mit wenig Nikotinamid und Zersetzungsprodukten verunreinigt. Ausbeute 14 g, Schmp.: Zersetzung ab 100 °C.

R_f-Werte: 0,16 (n-Butanol/Wasser gesättigt),
0,54 (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5),
0,35 (n-Butanol/Äthanol/Wasser 4:1:5).

Die Substanz absorbiert UV-Licht der Wellenlänge 254 m μ . Nach Entwickeln der Chromatogramme in Butanon/Ammoniak-Atmosphäre fluoreszieren alle *N*-substituierten Nikotinamid-Derivate bei Einstrahlung einer Wellenlänge von 310 m μ .

Die Cyanidaddition wird in einer Quarzküvette *D* = 1 cm gemessen. Damit ein exakter Vergleich zwischen dem Nikotinamidtriacetylglucosid und natürlichem Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid möglich ist, werden die Konzentrationen so eingestellt, daß die Extinktionen der Cyanid-Additionsverbindungen beider Substanzen gleich groß sind. Der *p_H*-Wert der Lösungen beträgt 8,2. Als Puffer wird 10⁻¹-*m*. Pyrophosphat verwendet, das mit konzentrierter Salzsäure auf *p_H* 8,2 eingestellt wird. In der Meßküvette befinden sich:

0,3 cm³ der zu untersuchenden Lösung,
1,5 cm³ 0,1-*m*. Pyrophosphatpuffer,
0,2 cm³ 0,1-*m*. Kaliumcyanid.

In die Vergleichsküvette werden statt Glucosid- oder Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Lösung 0,3 cm³ Wasser gegeben. Die Geschwindigkeit des Extinktionsanstieges wird bei einer Wellenlänge λ = 322 m μ im Zeiss PMQ II gemessen.

Nikotinamid-*N*¹- β -D-glucopyranosyl-6'-phosphat (II)

3,07 g (0,02 Mol) Phosphoroxychlorid werden in 150 cm³ absolutem Pyridin gelöst. Die Lösung wird auf -15 °C gekühlt, und 2 g I, in 100 cm³ absolutem Pyridin gelöst, im Verlauf einer halben Stde. unter Rühren zugegeben. Anschließend wird das Eisbad entfernt, und die Mischung auf Zimmertemperatur erwärmt. Den Kolbeninhalt gießt man dann auf 300 g

Eis. Nach einstündigem Stehen wird die Lösung unter vermindertem Druck bei 25–30 °C auf etwa 30 bis 50 cm³ eingedampft. Zur Reinigung gibt man das Konzentrat auf eine Dowex-50-H⁺-Säule (200–400 mesh) (Größe 1,5·70 cm) und eluiert mit Wasser. Man erhält zwei Fraktionen, von denen nur die zweite das organisch gebundene Phosphat enthält. Diese Fraktion wird im Vakuum auf 30 cm³ eingengt. Zur Verseifung der Acetylreste wird mit Salzsäure auf *p_H* 1 eingestellt und das Gemisch 48 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Zur weiteren Reinigung wird die Lösung auf eine Dowex-1-formiatsäule (100–200 mesh) gegeben. Die Säule wird zunächst mit Wasser, dann mit Ameisensäure steigender Konzentration als Gradient eluiert. Im wäßrigen Eluat wird das Monophosphat wiedergefunden. Saurere Verbindungen erscheinen erst nach Aufgabe der Ameisensäure. Sie wurden nicht näher identifiziert. Das wäßrige Eluat wurde mit 2-*n*. Salpetersäure auf *p_H* 3 eingestellt, und durch Gefriertrocknung der Phosphorsäureester in fester Form erhalten. Das Monophosphat wurde in wenig Wasser gelöst und mit dem 20-fachen Volumen eiskalten Acetons gefällt. Diese Fällung wurde noch zweimal wiederholt. Das so erhaltene acetonunlösliche Nikotinamid-*N*¹- β -D-glucopyranosylphosphat wird über Schwefelsäure und Phosphorperoxyd im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 500 mg. Mol.-Gew. 364,25 C₁₂H₁₇N₂O₉P.

Die Verbindung ist fast farblos und zersetzt sich allmählich oberhalb 120 °C. $[\alpha]_{25}^D = +32,1^\circ$ gemessen in Wasser. $\lambda_{\max} = 264 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 4,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, nach Cyanidzugabe $\lambda_{\max} = 322 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 5,8 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Analyse:

Gef. N 6,28 P 6,95 (N:P wie 2:1),
Ber. N 6,42 P 7,11 für Monophosphat + 4 H₂O.

Elektrophoretisch erwies sich die Substanz als nicht einheitlich. Sie bestand aus zwei zu gleichen Teilen gebildeten Verbindungen, die sich nur im Pherogramm unterschieden. Zur Trennung wurde eine Dowex-1-phosphatsäule verwandt. Der Austauscher wurde mit 1-*m*. Phosphatpuffer *p_H* 6 vorbehandelt, mehrere Male mit Phosphatpuffer stehen gelassen und mit Wasser phosphatfrei gewaschen. Die Säule besaß eine Größe von 1,5·80 Zentimeter. Sie wurde nach dem Auftragen des Isomerengemisches zunächst mit Wasser gewaschen. Die wäßrige Phase wies zwei getrennte Fraktionen auf, die pherographisch einheitlich waren und sich als die beiden Komponenten erwiesen. Fraktion I und Fraktion II wurden durch Gefriertrocknen in fester Form erhalten.

Hydrolyse: 0,4 cm³ Lösung einer jeden Fraktion, die etwa 2 mg Festsubstanz enthielt, wurden mit 0,2 cm³ 2-*n*. Salzsäure 30 Min. im Wasserbad bei 100 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend mit 0,2 cm³ 2-*n*. Natronlauge neutralisiert. Zum Nachweis von Glucose-6-phosphat wurden in eine 3-cm³-Küvette (*d* = 1 cm) 0,4 cm³ des Hydrolysats, 2,1 cm³ eines 0,4-*m*. Triäthanolaminpuffers *p_H* 7,6, 0,02 cm³ einer 0,5-*m*. Magnesiumchlorid-Lösung und 0,02 cm³ einer Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Lösung (20 mg/

cm³) einpipettiert; gestartet wurde die Reaktion mit 0,01 cm³ = 0,2 mg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Sie war außer bei Verwendung des Hydrolysats der Fraktion I auch beim Hydrolysat des Gemisches positiv, nicht aber mit dem Hydrolysat der Fraktion II.

Nikotinamidglucosid-Adenin-Dinucleotid

200 mg Adenosinmonophosphat wurden mit 100 mg Nikotinamid-*N*- β -D-glucopyranosyl-phosphat in 3,5 cm³ Wasser gelöst und mit 36 cm³ Pyridin versetzt. Zu der Mischung wurden 3 g *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Nach 24 Stdn. wurde der gebildete Harnstoff abgesaugt und mit 0,8 cm³ heißem Wasser gewaschen. Waschwasser und Filtrat wurden vereinigt und erneut mit 2 g *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Dieser Vorgang wurde 6-mal wiederholt. Nach 6 Tagen wird das Reaktionsgemisch in 200 cm³ Wasser gegeben und 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Vom Unlöslichen wurde dann filtriert. Das Filtrat wurde mit Chloroform 3-mal 200 cm³ zur Entfernung überschüssigen Pyridins ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde im Vakuum bei 30 °C auf 3 cm³ eingengt. Zur Abtrennung der Ausgangs- und Nebenprodukte wurde die Lösung auf eine Dowex-1-formiatsäule 2·30 cm (100–200 mesh) gegeben. Nach dem Eluieren mit Wasser wurde als Gradient 0,5-m. Ameisensäure aufgegeben. Das Coenzymanalogue erschien dann nach 100 cm³ Elutionslösung. Die Lösung wurde bei 30 °C im Vakuum auf 2 cm³ konzentriert, und das Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Analogue mit der 50-fachen Menge Aceton gefällt. Ausbeute: 14 mg oder 7% der Theorie.

Analyse: 7,12% P gefunden und 8,98% P berechnet für wasserfreie Substanz. Cyanidkonstante: $0,5 \cdot 10^{-3}$ Mol; $\lambda_{\max} = 258 \text{ m}\mu$ und $\epsilon = 18,5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, nach Cyanidzugabe $\lambda_{\max} = 258 \text{ m}\mu$ mit $\epsilon = 14,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ und $\lambda_{\max} = 322 \text{ m}\mu$ mit $\epsilon = 5,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Die Stöchiometrie der Photosynthese in isolierten Chloroplasten

II. Der Einfluß von Ascorbat auf die Photosynthese-Phosphorylierung im Meßsystem mit NADP*

VON GÜNTER JACOBI **

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
(Z. Naturforschg. 19 b, 470–480 [1964]; eingegangen am 8. November 1963)

As reported previously there is no stoichiometry between the amounts of ATP and NADPH₂ formed in light by isolated chloroplasts of spinach. The amount of esterified inorganic phosphate is always too low. However, addition of ascorbate leads to an increase of ATP- but not of NADPH₂-formation, independent of the gas phase present. Further experiments indicated that for the formation of "extra"-ATP with limiting amounts of NADP in long term experiments aerobic conditions are required. This additional ATP-formation occurs only in presence of ascorbate and starts when all NADP has been photoreduced. Ascorbate alone leads to photophosphorylation different from those systems, in which ascorbate is used as electron donor. The ascorbate induced photophosphorylation is strongly inhibited by *o*-phenanthroline and partly by cyanide. It is assumed that this ATP-formation is coupled with an oxygen exchange via a redox compound such as indophenol at the level of the second light reaction.

Nach der klassischen Photosynthese-Literatur würde man die Stöchiometrie der Photosynthese mit dem Assimilations-Quotienten gleichsetzen. Insbesondere durch die Arbeiten von ARNON und Mitarbb. wurde aber gezeigt, daß es durch präparativen Eingriff möglich ist, die eigentlichen Lichtreaktionen von den Dunkelreaktionen der CO₂-Assimilation in isolierten Chloroplasten zu trennen und unabhängig

von diesen ablaufen zu lassen¹⁻³. Aus diesen primären photochemischen Reaktionen, die nach den heutigen Vorstellungen als Elektronentransport-System interpretiert werden, resultieren drei photochemische Primärprodukte: der entwickelte Sauerstoff, das in Form von ATP* veresterte anorganische Phosphat (P_a) und das reduzierte NADP*. Diese drei Komponenten werden entsprechend der folgenden Gleichung

* Es werden folgende Abkürzungen verwendet: NADP (= TPN) = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NADPH₂ = reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; P_a = anorganisches Orthophosphat; DPIP = 2,6-Dichlorphenol-indophenol; TRIS = Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan.

** Auszug aus einer an der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover vorgelegten Habilitationsschrift.

¹ A. V. TRESBT, H. Y. TSUJIMOTO u. D. I. ARNON, Nature [London] 182, 351 [1958].

² D. I. ARNON, in: „The Photochemical Apparatus“, Brookhaven Symposium in Biology, Number 11, S. 189 [1959].

³ D. I. ARNON, in: „Light and Life“, The Johns Hopkins Press, Baltimore, ed. W. D. McELROY and B. GLASS, S. 489 [1961].