

PRÄPARATIVE DARSTELLUNG VON URIDIN-DIPHOSPHO-GLUCOSE AUS GEWEBE

Erika KÖHLER und H. G. LIPPMANN

*Institut für Diabetes "Gerhardt Katsch",**Bereich experimentelle Diabetesforschung, Karlsburg/Greifswald, DDR*

Eingegangen den 11. September 1968.

A method for the preparation of UDP-glucose from HClO_4 -extract of diaphragm using paper-chromatography is described. It allows the quantitative determination of UDP-Glc by optical test and the measurement of its specific (14-C) activity simultaneously.

Für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus des Insulin an der Muskelzelle ist die Ermittlung der Umsatzraten für Glucose im Glykogenzyklus durch Bestimmung der spezifischen Aktivität von UDP-Glucose erforderlich, die eine präparative Darstellung aus dem Gewebe, die quantitative Erfassung und die Messung ihrer 14-C-Aktivität beinhaltet.

Die Bestimmung von UDP-Glucose in tierischem Gewebe ist mittels fluorometrischer Methode [1] möglich; dazu sind Präparation und Bestimmung von UDP-Glucuronat mit Überführung von UDP-Glucose in UDP-Glucuronat nötig, so dass UDP-Glucose in einer Differenzbestimmung erfasst wird. Diese Methode eignet sich nicht für die Ermittlung der spezifischen Aktivität. Andere Verfahren [2-5] zur Trennung von säure- und alkohollöslichen Nukleotiden benutzen die Fraktionierung von wässrigen, alkoholischen, TCE- oder HClO_4 -Extrakten an Ionenaustauschersäulen entweder in der Chloridform mit schrittweiser NaCl-Elution sowie folgender Entsalzung und Konzentrierung, oder aber in der Formiatform mit Elution durch Ameisensäure, Entfernung dieser durch Liophilisierung und weiterer Behandlung des Eluats mit stark sauren Kationenaustauschern bei sich anschließenden papierchromatografischen und elektrophoretischen Trennungsschritten. Diese langwierigen Arbeitsgänge sind allerdings für Serienuntersuchungen nicht brauchbar und führen zu erheblichen Substratverlusten.

Wir versuchten deshalb, eine Präparationstechnik

zu entwickeln, die unter Umgehung der Fraktionierung an Säulen die Gewinnung eines HClO_4 -sauren Extrakts [2, 4, 6] ohne UDP-Glucose-Verlust und dessen Aufbereitung so ermöglicht, dass eine unmittelbare papierchromatografische Abtrennung der

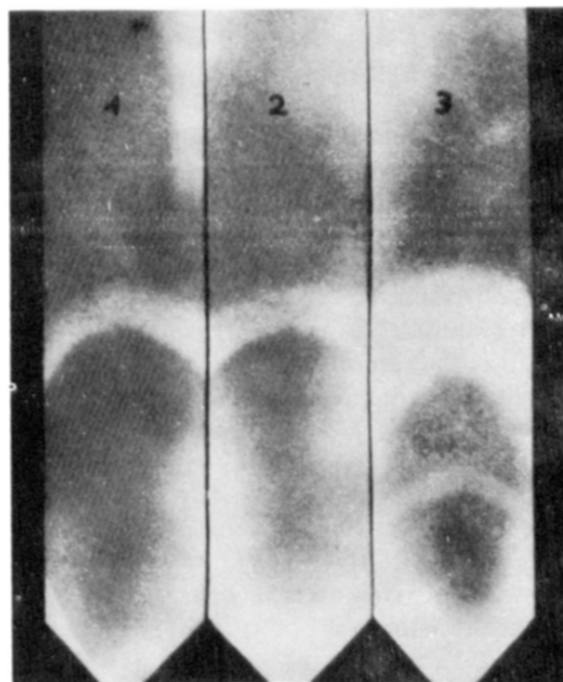


Fig. 1. Papierchromatografische Auftrennung von UDP-Glucose. 1 = 0.01 mg, 2 = 0.05 mg, 3 = Gewebeertrakt aus 20 g Diaphragma (Ratte).

UDP-Glucose gelingt. Dazu war die Auffindung einer Laufmittelkombination erforderlich, die eine Abtrennung von UDP-Glucose in einem Gang ermöglicht, ohne deren biologische Aktivität zu stören.

Zur Präparation der UDP-Glucose erfolgt eine Zerreißung des Gewebes (wir verwendeten Ratten-Diaphragma) unter flüssigem Stickstoff, Extraktion mit HClO_4 0.5 n und scharfer Zentrifugation. Der Überstand wird sofort mit KOH neutralisiert und zur quantitativen Fällung mit KClO_4 30 min um den Gefrierpunkt gehalten. Nach Zentrifugation Schütteln des Überstandes mit NaOH-vorbehandeltem Dowex (100–200 mesh), Abtrennung des Harzes und Einengung unter kalter Luftdusche. Alle Arbeitsgänge laufen bei 0°C ab; die Wiederfindungsrate für UDP-Glucose beträgt nach dieser Präparation 98–100%. Die papierchromatografische Abtrennung der UDP-Glucose erfolgt auf Schleicher-Schüll-Papier 20 4313 Mgl (Vorbehandlung: 60 min Kochen in Essigsäure 0.1 n unter Zusatz von EDTA, 3 maliges gründliches Waschen und anschließendes Kochen mit Aqua bidest.) in aufsteigender Technik [9]. Nach Auftragung des Extraktes unter kaltem Luftstrom wird die UDP-Glucose-Abtrennung in einer Laufmittelkombination *n*-Butanol : Pyridin : Wasser 2 : 8 : 3, pH 6.5 bei 0°C und einer Laufzeit von 36 h vorgenommen. Die Anfärbung gelingt mit FeCl_3 0.1% und Sulfosalicylsäure 1% (der optische Test wird dadurch nicht gestört). Nach Elution der Banden mit Wasser 12 h bei 0°C wird das Eluat in der Mikrozentrifuge abgetrennt und der Rückstand unter Zuhilfenahme des Mikromix (Mikrolitersystem EPPENDORF) wiederholt nachgewaschen. Die vereinigten Eluate werden in der Kälte unter

kaltem Luftstrom eingengt, der Rückstand in 0.5 ml aufgenommen und aliquote Teile zur Bestimmung der UDP-Glucose im optischen Test und zur Ermittlung ihrer ^{14}C -Aktivität eingesetzt.

Der optische Test wurde unter Verwendung von UDP-Glucose-Dehydrogenase [7, 8] bei 334 nm durchgeführt; in dem uns interessierenden Konzentrationsbereich 0.01–1.0 mg/ml verläuft die Reaktion linear. Die Wiederfindungsquote beträgt 90–98%; für das Diaphragma der Ratte (Wistar Jena/Karlsburg F₁₆) wurde ein Gehalt an UDP-Glucose von 0.08 $\mu\text{M/g}$ Frischgewicht ermittelt.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln eines Forschungsauftrages des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR durchgeführt.

Literatur

- [1] Kim Ping Wong und T. L. Sourkes: *Analyt. Biochem.* 21 (1967) 444.
- [2] W. Koransky, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 234 (1958) 41.
- [3] C. E. Cardine und L. F. Leloir, *Methods in Enzymology* 3 (1957) 837.
- [4] R. B. Hulbert, H. Schmitz, A. F. Brumm und R. v. Potter, *J. Biol. Chem.* 209 (1959) 23.
- [5] Y. Nakanishi, S. Shimizu, N. Takahashi, M. Sugiyama und S. Suzuki, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 967.
- [6] H. Coper, H. Herken und W. Koransky, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 234 (1958) 455.
- [7] G. T. Mills und E. E. B. Smith, in: *Methoden der enzymatischen Analyse*, ed. H. U. Bergmeyer (Verlag Chemie Weinheim, 1962) S. 581.
- [8] J. L. Strominger, E. S. Maxwell, J. Axelrod und H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.* 224 (1957) 79.
- [9] W. Mathias, *Der Züchter* 24 (1954) 313.