

HRM. 4256

Säulen- und papierchromatographischer Nachweis einer Säure- und Phosphatase-stabilen Phosphorverbindung in Pflanzen

Phosphonoverbindungen wurden erstmalig 1959 in biologischem Material entdeckt¹. Die danach beschriebenen Vorkommen beschränkten sich ebenfalls auf das Tierreich, wo sie inzwischen bei Vertretern von vier verschiedenen Tierstämmen nachgewiesen werden konnten. Die weitaus meisten Arbeiten wurden jedoch an *Tetrahymena pyriformis*, einem holotrichen Ciliaten, durchgeführt²⁻⁴, der bis zu 13% des aufgenommenen Phosphats in Phosphonosäuren einbauen kann².

Bisher sind von dieser völlig neuen Substanzklasse Aminoäthylphosphonsäure (AEP)¹⁻⁴ und 2-Amino-3-Phosphonopropionsäure (APP)⁴ sowie die N-Methylderivate von AEP⁵ aus biologischem Material bekannt geworden. Charakteristikum der Phosphonosäuren ist ihre stabile kovalente P-C-Bindung, die sich—im Gegensatz zu allen anderen im Organismus vorkommenden organischen Phosphorverbindungen wie Phosphatestern, Säureanhydriden etc.—weder durch herkömmliche Phosphatasen noch durch mehrtägiges Kochen in 6 N HCl spalten lässt.

Die bisherigen Informationen liessen vermuten, dass Phosphonoverbindungen nur bei Tieren vorkommen. Vorliegende Arbeit weist jedoch das Vorkommen einer Ninhydrin-positiven, Säure- und Phosphatase-stabilen Phosphorverbindung säulen- und papierchromatographisch in zwei einzelligen Algen nach, so dass das Ausmass der Verbreitung dieser Substanzklasse damit noch nicht zu übersehen ist.

Die Grünalge *Pseudochlorella aquatica*—aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen—wurde mit ³²Phosphat in 300 ml-Kulturröhren bei 16–18° und Dauerschwachlicht im Chlorella-Nährmedium⁶ inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen 15 min bei 4000 × g zentrifugiert, in etwa 250 ml 6 N HCl suspendiert und 48 h bei 110° am Rückfluss gekocht. Zur Entfernung der Salzsäure wurde das Rohhydrolysat mehrfach am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlpumpenvakuum bei etwa 40° bis nahe zur Trockne eingedampft und jeweils mit Wasser aufgenommen. Vor dem letzten Eindampfen wurde das Hydrolysat zur Entfernung verkohlter Reste filtriert und der Rückstand gut mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde schliesslich zur Trockne eingedampft und in 10 ml 1 N Ameisensäure aufgenommen und nach Auszählen eines Aliquots am Endfensterzählrohr auf eine neutralgewaschene Dowex 50-H-Säule (1 × 25 cm) gebracht und mit zweimal 5 ml 1 N Ameisensäure eingewaschen. Dann wird mit Wasser weitereluiert und Fraktionen von 5 ml gesammelt. Ab Fraktion 21 wird mit 0.6 N, ab Fraktion 51 mit 2 N HCl weitereluiert.

In dem Bereich, in dem bei *Tetrahymena* 2-Amino-3-Phosphonopropionsäure und 2-Aminoäthylphosphonsäure⁷ sowie bisher nichtidentifizierte andere Phosphonosäuren⁸ von der Säule eluiert werden, erscheint die neue Verbindung nicht. Erst bei Elution mit 2 N HCl kommt sie mit der Front zusammen mit Cystein-Cystin und einigen anderen Aminosäuren von der Dowex 50-H-Säule. Die unbekannte Substanz ist, wie Papierchromatogramme in fünf Laufmitteln zeigten, in ihrer Radioaktivität homogen. Sie bleibt in basischen Laufmitteln am Start zurück, läuft dagegen, wie aus Tabelle I hervorgeht, in sauren Laufmitteln gut ab. Dieses Verhalten wurde auch

TABELLE I

R_F -WERTE DER ISOLIERTEN PHOSPHORVERBINDUNG SOWIE AEP, N-TRIMETHYL-AEP (nach Lit. 5) UND Pi ALS VERGLEICH IN VERSCHIEDENEN LAUFMITTELN BEI ABSTEIGENDER CHROMATOGRAPHIE AUF S & S 2040 B

1 = *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (52:14:35); 2 = Methanol-Ammoniak-Wasser (7:1:2); 3 = Äthanol-Ammonium-Acetat pH 3.8 (5:2); 4 = *tert.*-Butanol-Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (10:5:1:10); 5 = *tert.*-Butanol-Methyläthylketon-Ameisensäure (90.8%)–Wasser (10:5:1:10).

Substanz	Laufmittel				
	1	2	3	4	5
X	24	0	83	0	83s
AEP	31	64	78	69	75
TM-AEP	—	—	—	32	—
Pi	59	—	—	—	—

zur Abtrennung der nach der Säulenchromatographie in der Fraktion noch enthaltenen Aminosäuren ausgenutzt. Schon nach Chromatographie in den beiden ersten Systemen aus Tabelle I sind keine Verunreinigungen mehr nachzuweisen. Radioaktivität und Ninhydrinanfärbung stimmen völlig überein.

Nach Passieren aller fünf Systeme wurde nochmals im System I chromatographiert, mit 0.01 *N* HCl eluiert und nach mehrfachem Eindampfen am Rotationsverdampfer in 0.2 *M* Na-Acetat–0.1 *M* MgCl₂ pH 4.8 aufgenommen, die Probe geteilt und ein Teil mit saurer Phosphatase (Boehringer), der andere ohne Phosphatase als Kontrolle 2 h bei 37° inkubiert und dann beide Proben im System I erneut chromatographiert. Kontrolle und Phosphatase-Ansatz stimmten in Radioaktivität und Ninhydrinanfärbung völlig überein, ein Freisetzen von Phosphat war nicht festzustellen, so dass die ³²P-markierte Substanz nicht nur gegen Säure sondern auch gegen Phosphatase beständig ist und damit ein weiteres Kriterium der Phosphonosäuren erfüllt.

Die Identität dieser neuen Verbindung ist noch ungeklärt. Dem Verhalten an der Dowex 50-Säule nach könnte es sich um N-Trimethyl-AEP (TM-AEP)⁵ handeln, das ebenfalls sehr spät von der Säule kommt, doch sind damit weder die Anfärbbarkeit mit Ninhydrin noch der R_F -Wert (Tabelle I) vereinbar.

TABELLE II

AUFNAHME VON ³²PHOSPHAT UND EINBAU IN SÄURE- UND PHOSPHATASE-STABILE BINDUNG DURCH PSEUDOCHLORELLA

	Radioaktivität (in i.p.m.)	nM
Angebotene Menge ³² Phosphat	2.2 · 10 ⁹	1.5 · 10 ⁶
Aufgenommene Menge ³² Phosphat (= Säurehydrolysat)	5.4 · 10 ⁶	3.7 · 10 ³
Einbau in Säure-stabile Bindung (Dowex 50-Fractionen)	1.03 · 10 ⁵	70.0

Die Papierchromatographie hatte gezeigt, dass die in Frage kommenden Fraktionen in ihrer Radioaktivität homogen sind, so dass die Radioaktivität nach der Säulenchromatographischen Reinigung der Einbaurate an Phosphat in die Säure-stabile Phosphorverbindung gleichgesetzt werden darf. Wie aus Tabelle II hervorgeht, werden 2% des aufgenommenen Phosphats in die neue Substanz eingebaut, wobei zu berücksichtigen ist, dass das Chlorella-Nährmedium für Pseudochlorella nicht optimal ist und daher nur ein mittelmässiges Wachstum der Kultur erfolgte. Wesentlich geringere Einbauraten werden jedoch für die seltenen Phosphonosäuren von Tetrahymena⁸ beobachtet, und auch AEP wird unter weniger günstigen Wachstumsbedingungen von Tetrahymena in nicht viel grösserem Umfange synthetisiert⁷. Für die zweite untersuchte Alge, *Astasia longa* (1204-17a), liegen die Einbauraten in der gleichen Grössenordnung wie bei Pseudochlorella. Die hier gefundene Verbindung stimmt mit der aus Pseudochlorella säulen- und papierchromatographisch völlig überein. Ob diese neue Verbindung mit jener nichtidentifizierten Säure-stabilen, von Horiguchi in einem zusammenfassenden Referat⁹ erwähnten Phosphorverbindung aus Euglena identisch ist, bleibt abzuwarten.

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen,
Abteilung Biochemie der Pflanzen,
Göttingen (B.R.D.)*

F. GEIKE*

- 1 M. Horiguchi und M. Kandatsu, *Nature*, 184 (1959) 901.
- 2 M. Kandatsu und M. Horiguchi, *Agr. Biol. Chem., Tokyo*, 26 (1962) 721.
- 3 H. Rosenberg, *Nature*, 203 (1964) 299.
- 4 J. S. Kittredge und R. R. Hughes, *Biochemistry*, 3 (1964) 991.
- 5 J. S. Kittredge, A. F. Isbell und R. R. Hughes, *Biochemistry*, 6 (1967) 289.
- 6 A. Kuhl, *Vorträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik, Deutsche Bot. Ges.*, Neue Folge Nr. 1 (1962) 157.
- 7 A. Trebst und F. Geike, *Z. Naturforsch.*, 22B (1967) 989.
- 8 F. Geike, unveröffentlicht.
- 9 M. Horiguchi, *J. Agr. Chem. Soc., Japan*, 40 (1966) R 25.

Eingegangen am 25. Juni 1969

* Neue Adresse: Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D 1 Berlin-Dahlem, B.R.D.

J. Chromatog., 44 (1969) 181-183