

92. Identifizierung von 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat in Kuhmilch als Wachstumsfaktor für *Treponema vincentii*

von Bruno Bernet*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich

und Christoph Wyss

Zahnärztliches Institut der Universität Zürich, Plattenstr. 11, CH-8028 Zürich

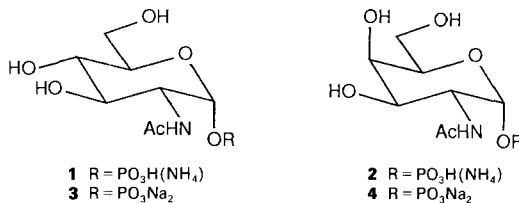
(15.III.88)

Identification of 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl 1-Phosphate in Cow-Milk as Growth Factor for *Treponema vincentii*

A 7:3 mixture of 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl and - α -D-galactopyranosyl 1-phosphate (1 and 2, resp.) was isolated from cow-milk and identified by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. The 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl 1-phosphate is a growth factor for *Treponema vincentii*.

Verschiedene Spirochäten bilden einen Teil der normalen, sehr artenreichen, oralen Flora. Starke Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Mischpopulationen scheinen kausal am Auftreten von Erkrankungen des Paradonts beteiligt zu sein. Die Bedeutung der Spirochäten ist dabei im einzelnen nicht klar, doch wird ihr gehäuftes Auftreten als Krankheitsindikator angesehen. Für ein besseres Verständnis solcher Populationsentwicklungen sind *in-vitro*-Kulturen unter möglichst wohldefinierten Bedingungen wünschenswert [1].

Treponema vincentii, eine der mittelgrossen, obligat anaeroben, oralen Spirochäten, kann bisher trotz Zusatz von Serum nur in komplexen Nährmedien gezüchtet werden. Erste Versuche zur besseren Charakterisierung der Wachstumsbedingungen zeigten, dass *T. vincentii* auch in einem definierten Zellkulturmedium wachsen kann, wenn neben fötalem Kälberserum (FCS) auch noch Ultrafiltrat (Permeat) von Kuhmilch zugesetzt wird [2]. Um die wachstumsfördernde(n) Komponente(n) zu isolieren, wurde Milchpermeat der im *Exper. Teil* beschriebenen Fraktionierung unterworfen. Dabei wurde schliesslich ein amorphes Lyophilisat erhalten, welches das Wachstum von *T. vincentii* ermöglichte, wenn es dem Kulturmedium in einer Konzentration von 1 mg/l zugesetzt wurde.



Das Lyophilisat wurde spektroskopisch untersucht. Sowohl das $^1\text{H-NMR}$ - wie auch das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigt, dass es sich um ein (7:3)-Gemisch aus den zwei monoacetylierten Aldohexosen **1** und **2** handelt.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum des Lyophilisats weisen die Signale bei 54.00 und 50.11 ppm auf N-Acetate hin. Diese Signale und die Signale von C(1) erscheinen im ^1H -breitband-entkoppelten Spektrum als d ($J = 8.1$ resp. 5.8 Hz), was das Vorliegen von 2-Acetamido-2-desoxy-hexopyranosyl-phosphaten oder -hexofuranosyl-phosphaten nahelegt. Tatsächlich koppelt das P-Atom in Glycopyranosyl-phosphaten mit C(2) ($J = 5-9$ Hz) und C(1) ($J = 2.9-7.1$ Hz) [3]. Die Konfiguration von Glycosyl-phosphaten am anomeren Zentrum lässt sich aus der chemischen Verschiebung von H-C(1) ableiten. Die Abschirmung von H-C(1), das mit dem P-Atom koppelt ($J = 7-9$ Hz) nimmt von β -D-Pyranosyl- (4.8-5.2 ppm [3]) über α -D-Pyranosyl- (5.4-5.55 ppm [3]) zu Furanosyl-Phosphaten (ca. 6.0 ppm [4]) ab. Somit dürfte es sich bei beiden Verbindungen um 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-hexopyranosyl-phosphate handeln. Diese Annahme wird durch die vicinale Kopplungskonstante $^3J(1,2) = 3.55$ resp. 3.3 Hz bestätigt, die charakteristisch für 1,2-*cis*-substituierte Glycopyranosyl-Derivate ist¹⁾. Somit können α -D-ManpNAc1P²⁾ und weitere 1,2-*trans*-substituierte α -D-Pyranosyl-phosphate ausgeschlossen werden. Beide Komponenten des Isolates können folglich nur *gluco*-, *galacto*-, *allo*- oder *gulo*-konfiguriert sein.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Isolates erscheint bei 3.49 ppm ein t der Hauptkomponente **1** (H-C(4)). Die grosse Kopplungskonstante ($J = 9.5$ Hz) ist nur mit einer *gluco*-Konfiguration von **1** vereinbar. Die Signale von **1** im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind mit den spärlich interpretierten $^1\text{H-NMR}$ -Daten von α -D-GlcpNAc1P [6] vereinbar. Ein besserer Vergleich ist bei den $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren möglich (s. Tab. 1). Berücksichtigt man einen systematischen Fehler von ca. 1 ppm (herrührend von der Verwendung verschiedener Referenzen) und unterschiedliche pH-Werte der Probenlösungen, so weichen die Daten von **1** und diejenigen von **3** [7] kaum voneinander ab.

Tab. 1. Vergleich der $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von **1** und **2** mit denjenigen von **3** und **4**

	1	2	3 ^{a)} [7]	4 ^{b)}
Chemische Verschiebungen [ppm]				
C(1)	93.39	93.58	93.9	93.61
C(2)	54.00	50.11	55.3	50.50
C(3)	70.90	67.61	72.6	68.18
C(4)	69.84	68.59	71.2	68.97
C(5)	72.65	71.72	73.6	71.79
C(6)	60.56	61.34	61.9	61.70
NHAc	174.80	174.99	175.8	175.26
	22.10	22.18	23.2	22.56
Kopplungskonstanten [Hz]				
$^2J(\text{P},\text{C}(1))$	5.8	5.8	5.0	5.6
$^3J(\text{P},\text{C}(2))$	8.1	7.5	6.9	7.5

^{a)} Mit TMS als externer Referenz.

^{b)} Zusätzliche Signale einer Verunreinigung: 179.34 (*s*), 75.41 (*d*), 45.87 (*t*).

Der Nebenkomponente **2** können im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum neben dem Signal des anomeren Protons bei 5.42 ppm folgende leicht verbreiterte Signale zugeordnet werden: 1 dt ($J \approx 11.0$, 2.8 und 2.8 Hz) bei 4.16 ppm, 1 dd ($J \approx 7.4$ und 6.1 Hz) bei 4.13 ppm und 1 d ($J \approx 3.2$ Hz) bei 4.00 ppm. Das dt ergibt beim Einstrahlen bei der Resonanzfrequenz von H-C(1) 1 dd ($J \approx 11.0$ und 2.8 Hz). Somit handelt es sich um das Signal von H-C(2), das eine kleine H,P-Kopplungskonstante von 2.8 Hz aufweist, wie sie für 1,2-*cis*-substituierte α -D-Pyranosyl-phosphate charakteristisch ist [3]. Die dritte Kopplung ($J \approx 11.0$ Hz) ist die vicinale Kopplung mit H-C(3). Die Signale bei 4.00 und 4.16 ppm sind H-C(4) und H-C(5) zuzuordnen. Die vicinalen Kopplungskonstanten ($J(2,3) \approx 11$ Hz,

¹⁾ $J(1,2)$ beträgt bei 1,2-*cis*-substituierten Furanosen 4-7 Hz und bei *trans*-substituierten Furanosen 0-2 Hz [4].

²⁾ $J(1,2) < 1$ Hz [5].

³⁾ Im folgenden werden 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-hexopyranosyl-phosphate auf diese Weise abgekürzt (P:PO₃Na₂).

$J(3,4) \approx 3.2$ Hz und $J(4,5) < 1$ Hz) sind nur mit einer *galacto*-Konfiguration von **2** vereinbar. Tatsächlich sind die $^1\text{H-NMR}$ - (s. *Exper. Teil*) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (s. *Tab. 1*) von **2** und **4** (*Sigma*) einander jeweils sehr ähnlich.

Aufgrund der pK_s -Werte von α -D-GlcpNAc1P (< 1.4 und 6.0 [8]) dürfte **1** im Lyophilisat als Monoammonium-phosphat vorliegen. Die bei der Elution mit AcONH_4 von einer *Sephadex*-Säule (vgl. *Exper. Teil*) erhaltenen Diammoniumsalze der Glycosyl-Phosphate wurden während der anschliessenden Chromatographie auf Kieselgel durch AcOH protoniert, so dass es sich beim spektroskopisch untersuchten Isolat um ein Gemisch der Monoammonium-phosphate **1** und **2** handelt. Es reagierte denn auch im Gegensatz zu **4** positiv mit Ninhydrin.

Es ist bekannt, dass α -D-GlcpNAc1P in Konzentrationen von 0.5 – 0.8 mmol/l in Milchserum enthalten ist [9]. Dagegen ist α -D-GalpNAc1P so erstmals als Milchbestandteil identifiziert worden.

Aufgrund der analytischen Daten wurden Wachstumstests mit kommerziellen Präparaten (*Sigma* und *Serva*) in Konzentrationen von 0.1 mg/l bis zu 100 mg/l durchgeführt (*Tab. 2*). Bis zu 100 mg/l α -D-GalpNAc1P (**4**) ermöglichen das Wachstum von *T. vincentii* nicht (s. *Tab. 2*). Im Gegensatz dazu reichen 0.3 mg/l (nicht aber 0.1 mg/l) α -D-GlcpNAc1P (**3**) aus, um *T. vincentii* zur Vermehrung zu bringen. Maximale Wirkung von **3** wurde bei Konzentrationen ab 10 mg/l erreicht. Weder mit **3** noch einer der anderen in *Tab. 2* aufgeführten wachstumsstimulierenden Substanzen erreichte *T. vincentii* das gleiche maximale Wachstum wie mit unfraktioniertem Milchpermeat. Die Natur weiterer im Permeat enthaltener wachstumsstimulierender Komponenten ist unbekannt. Die Resultate zeigen jedenfalls, dass α -D-GlcpNAc1P kaum eine spezifische Funktion zugeordnet werden kann. Angesichts einer hohen Phosphatase-Aktivität in der bakteriellen Plaque erscheint zudem die Annahme einer physiologischen Funktion *in vivo* von Chitobiose oder von MuramylNAc plausibler als von α -D-GlcpNAc1P (vgl. *Tab. 2*). Wie weit diese Ergebnisse auch für andere Isolate oraler Treponemen eine Bedeutung haben, bleibt abzuklären.

Tab. 2. *Wachstumsstimulierende Faktoren für T. vincentii und kleinste Wirkkonzentrationen*

Wachstumstimulierender Faktor	kleinste Wirkkonzentration [mg/l]	Wachstumstimulierender Faktor	kleinste Wirkkonzentration [mg/l]
α -D-GlcpNAc1P (3)	0.3	Chitotetrose	10.0
α -D-GalpNAc1P (4)	> 100	MuramylNAc	3.0
GlcpNAc6P	1.0	NeuNAc	> 100
UDP- α -D-GlcpNAc	1.0	GlcNAc	100
Chitobiose	1.0		

Wir danken den Herren Prof. Dr. A. Vasella und Prof. Dr. B. Guggenheim für wertvolle Diskussionen und Unterstützung, den *Toni-Molkereien* für die Überlassung von Milchpermeat und Herrn U. Piantini für die Aufnahme von NMR-Spektren.

Experimenteller Teil

1. *Bakterienwachstum*. Der Stamm *LA* von *T. vincentii* [10] (erhalten von P. Bähni, Genf) wurde im TYGVS-Medium [11] mit 5 mg/l Spermin $\cdot 4$ HCl und 5% hitze-inaktiviertem FCS (*Flow Labs*) bei 35° in Anaerobierkammern (*BBL-Gaspac*-System) gezüchtet. Als Testmedium für den Nachweis wachstumsfördernder Aktivitäten diente das Zellkulturmedium ZW [12] mit 5% FCS und folgenden Zusätzen (mg/l): NaHCO_3 (300), Guanin (10), Adenin (10), Uracil (10), Cytosin (10), Thiamin-pyrophosphat (5), Hämין (0.5), Menadion (0.25), Ascorbinsäure

(100), Hydrocortison (10), NAD (1), ACES-Puffer (3644), 4-Aminobenzoesäure (10), Spermin·4 HCl (5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (500), Insulin (1), Transferrin (5) und ein Gemisch flüchtiger Fettsäuren in gleichen Konzentrationen wie im TYGVS-Medium. Zur teilweisen Korrektur der osmotischen Folgen dieser Zusätze wurde die Konzentration von KCl auf 1255 mg/l reduziert. Für Tests wurden die Zellen einmal in diesem Medium gewaschen und in einer Konzentration von $ca. 10^5$ Zellen/ml eingesetzt. Testsubstanzen wurden lyophilisiert, in dest. H_2O gelöst und nach Sterilisation durch Behandlung im Autoklaven oder Membran-Filtration mit bis zu maximal 10% des Kulturvolumens versetzt. Tests wurden im Doppel in 1-ml-Kulturen durchgeführt. Nach 4 und nach 6 Tagen Inkubation wurde die biologische Aktivität durch mikroskopische Kontrolle von Zellzahl, Zellmorphologie und Beweglichkeit semiquantitativ beurteilt.

2. *Fraktionierung von Milchpermeat*. Milchpermeat-Trockenpulver (500 g, *Toni-Molkereien*) wurde mit 80% MeOH extrahiert. Nach Lyophilisation wurde das Extrakt (87 g) mit 100% MeOH extrahiert, wobei nur die MeOH-lösliche, biologisch aktive Fraktion (24 g) weiter untersucht wurde. Nach Chromatographie an *Sephadex G 15* (Pharmacia) mit 0.05M AcONH_4 wurden die aktiven Fraktionen direkt auf *DEAE-Sephadex A 25* aufgetragen. Die nichtgebundene Fraktion mit biologischer Aktivität wurde nicht weiter untersucht. Gradientenelution ergab mit $ca. 0.5\text{M AcONH}_4$ eine aktive Fraktion, die nach Lyophilisation nochmals an *Sephadex G 15* mit H_2O chromatographiert wurde. Die aktiven Fraktionen wurden lyophilisiert (1.5 g) und dann durch DC auf Kieselgelplatten (*Schleicher & Schüll*) weiter gereinigt. Aktive Substanz (18 mg nach Lyophilisation): $R_f ca. 0.35$ (EtOH-AcOH 8:2).

3. *Spektroskopische Analysen*. NMR-Spektren wurden auf einem *Bruker-AM-400* ($^1\text{H-NMR}$) und einem *Varian-XL-200* (^{13}C - und $^{31}\text{P-NMR}$) aufgenommen. Die Proben wurden 3mal in D_2O gelöst und lyophilisiert und als Lsg. in D_2O gemessen. Als externe Referenzen dienten Natrium-3-(trimethylsilyl)-1-propan sulfonat ($^1\text{H-NMR}$), CH_3CN ($^{13}\text{C-NMR}$, $\delta(\text{CH}_3) = 1.3$ ppm) und 85% H_3PO_4 ($^{31}\text{P-NMR}$).

Ammonium-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-Phosphat (1): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz a): 5.42 (*dd*, $J = 7.4, 3.55, 0.3$ H, Einstrahlen bei 4.15 \rightarrow *d*, $J = 7.4$, H-C(1)); 5.38 (*dd*, $J = 7.4, 3.3, 0.7$ H, H-C(1)); 4.16 (*dt*, $J \approx 11.0, 2.8, 0.3$ H, Einstrahlen bei 5.4 \rightarrow *br. dd*, $d, J \approx 11.0, 2.8$, H-C(2)); 4.13 (*br. dd*, $J \approx 7.4, 6.1, 0.3$ H, H-C(5)); 4.00 (*br. d*, $J \approx 3.2, 0.3$ H, Einstrahlen bei 4.15 \rightarrow *d*, H-C(4)); 3.97–3.82 (*m*, 2.4 H, Einstrahlen bei 5.4, 4.15, 4.0 oder 3.15 \rightarrow Veränderung des Signals); 3.81–3.72 (*m*, 2.0 H, Einstrahlen bei 4.15 oder 3.15 \rightarrow Veränderung des Signals); 3.49 (*t*, $J = 9.5, 0.7$ H, H-C(4)); 2.04 (*s*, Ac). $^{13}\text{C-NMR}$: s. *Tab. 1*. $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz): 0.18 (Halbwertsbreite 37 Hz); Daten für 3: –1.50 bei pH = 3 [7b], 1.98 bei pH = 8 [7b] und 2.93 bei pH \approx 9.2 [9].

4 (*Sigma*): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 5.42 (*dd*, $J = 7.5, 3.5$, Einstrahlen bei 4.19 \rightarrow *d*, $J = 7.5$, H-C(1)); 4.19 (*ddd*, $J = 10.9, 3.5, 2.1$, Einstrahlen bei 5.42 \rightarrow *dd*, $J = 10.9, 2.1$, Einstrahlen bei 3.95 \rightarrow starke Veränderung des Signals, H-C(2)); 4.18 (*br. dd*, $J \approx 7.4, 4.9$, H-C(5)); 4.02 (*br. d*, $J \approx 3.2$, Einstrahlen bei 5.42 \rightarrow *dd*, $J = 3.2, 0.8$, H-C(4)); 3.95 (*dd*, $J = 10.9, 3.2$, Einstrahlen bei 4.19 \rightarrow starke Veränderung des Signals, H-C(3)); 3.78 (*dd*, $J = 11.7, 7.4$, Einstrahlen bei 4.19 \rightarrow *d*, $J = 11.7$, H-C(6)); 3.73 (*dd*, $J = 11.7, 4.9$, Einstrahlen bei 4.19 \rightarrow *d*, $J = 11.7$, H-C(6)); 2.06 (*s*, Ac); 2.67, 2.55 (*AB*, $J = 15.2, 1$ H, unbekannte Verunreinigung). $^{13}\text{C-NMR}$: s. *Tab. 1*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. S. Socransky, A. D. Haffajee, G. L. F. Smith, J. L. Dzink, *J. Clin. Periodont.* **1987**, *53*, 213.
- [2] C. Wyss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [3] J. V. O'Connor, H. A. Nunez, R. Barker, *Biochemistry* **1979**, *18*, 500.
- [4] J. Mendicino, R. Hanna, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6113.
- [5] T. Yamazaki, C. D. Warren, A. Herscovics, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1980**, *79*, C9.
- [6] a) N. K. Kochetkov, E. I. Budovsky, T. N. Druzhinina, N. D. Gabrieljan, I. V. Komlev, Yu. Yu. Kusov, V. N. Shibaev, *Carbohydr. Res.* **1969**, *10*, 152; b) A. Ya. Khorlin, S. E. Zurabyan, T. S. Anonenko, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 4803; c) S. J. Perkins, L. N. Johnson, D. C. Philips, R. A. Dwek, *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 19.
- [7] a) D. R. Bundle, H. J. Jennings, I. P. C. Smith, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3812; b) V. I. Gorbach, V. V. Isakov, Yu. G. Kulesh, P. A. Luk'yanov, T. F. Solov'eva, Yu. S. Ovodov, *Soviet J. Bioorg. Chem.* **1980**, *6*, 43.
- [8] P. J. O'Brien, *Biochem. Biophys. Acta* **1964**, *86*, 628.
- [9] M. Wahlgren, T. Drakenberg, H. J. Vogel, P. Dejmek, *J. Dairy Res.* **1986**, *53*, 539.
- [10] D. F. Mangan, B. E. Laughon, B. Bower, D. E. Lopatin, *Infect. Immun.* **1982**, *37*, 445.
- [11] K. Ohta, K. K. Makinen, W. J. Loesche, *Infect. Immun.* **1986**, *53*, 213.
- [12] C. Wyss, *Expl. Cell Res.* **1982**, *139*, 297.

⁴⁾ Signale von *Ammonium-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat (2)* sind in Kursivdruck angegeben.