

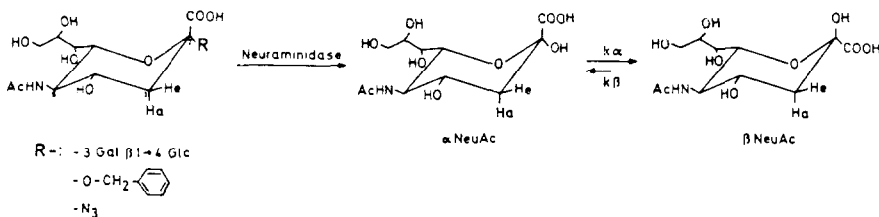
¹H-NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAROTATION DER N-ACETYL-D-NEURAMINSÄURE -
pH-ABHÄNGIGKEIT DER MUTAROTATIONSGESCHWINDIGKEIT

H. Friebolin[†], P. Kunzelmann, Organisch-Chemisches Institut der Universität
Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg

M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler, Institut für Biochemie II (Med.Fak.)
der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 328,
D-6900 Heidelberg

Abstract : The pD-dependence of the mutarotation of N-acetyl-D-neuraminic acid was studied by ¹H-nmr spectroscopy. The rate constant has a minimum at pD 5.4. At pD 1.3 and pD 11.7 the establishment of the equilibrium of mutarotation was found to be so fast, that it cannot be measured.

Mit ¹H-NMR-Spektroskopie konnte in Übereinstimmung gezeigt werden, daß N-Acetyl-D-neuraminsäure (NeuAc) in Wasser im Mutarotationsgleichgewicht zu 92% in der stabileren β-Form und zu 8% als α-Anomeres vorliegt (1,2,3). Die offenkettige Ketoform sowie Lactone sind bisher nicht nachgewiesen. Furanosen können aufgrund der N-Acetylgruppe nicht gebildet werden.



Kürzlich gelang uns der Nachweis, daß im schwach sauren Bereich (pD 5.4) die Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes überraschend langsam erfolgt ($t_{0,5} = 80$ min.) (4). Diesem Ergebnis lag die Beobachtung zugrunde, daß aus α-Ketosiden der NeuAc mittels bakteriellen Neuraminidasen als primäres Spaltprodukt α-NeuAc freigesetzt wird (5), die dann erst durch Mutarotation in das β-Anomere übergeht (4). In dieser Arbeit beschreiben wir die pH-Abhängigkeit der Mutarotationsgeschwindigkeit.

Der bisher einzige Weg, die für diese Experimente erforderlichen hohen Konzentrationen an α-NeuAc zu erhalten, ist die enzymatische Hydrolyse von α-Ketosiden der NeuAc. Damit die Spaltung der Substrate schneller abläuft als die Einstellung des Gleichgewichtes, sind Enzymaktivitäten von 0.5 - 2.0 Einheiten* notwendig. Als Substrate eignen sich neben dem früher verwendeten Trisaccharid NeuAca2-3Galβ1-4Glc (4) die

* 1 Einheit (E) ist die Enzymmenge, die mit NeuAca2-3Galβ1-4Glc als Substrat (2.5 mM) unter optimalen Bedingungen 1 μMol NeuAc/min. freisetzt.

[†]Korrespondenzautor

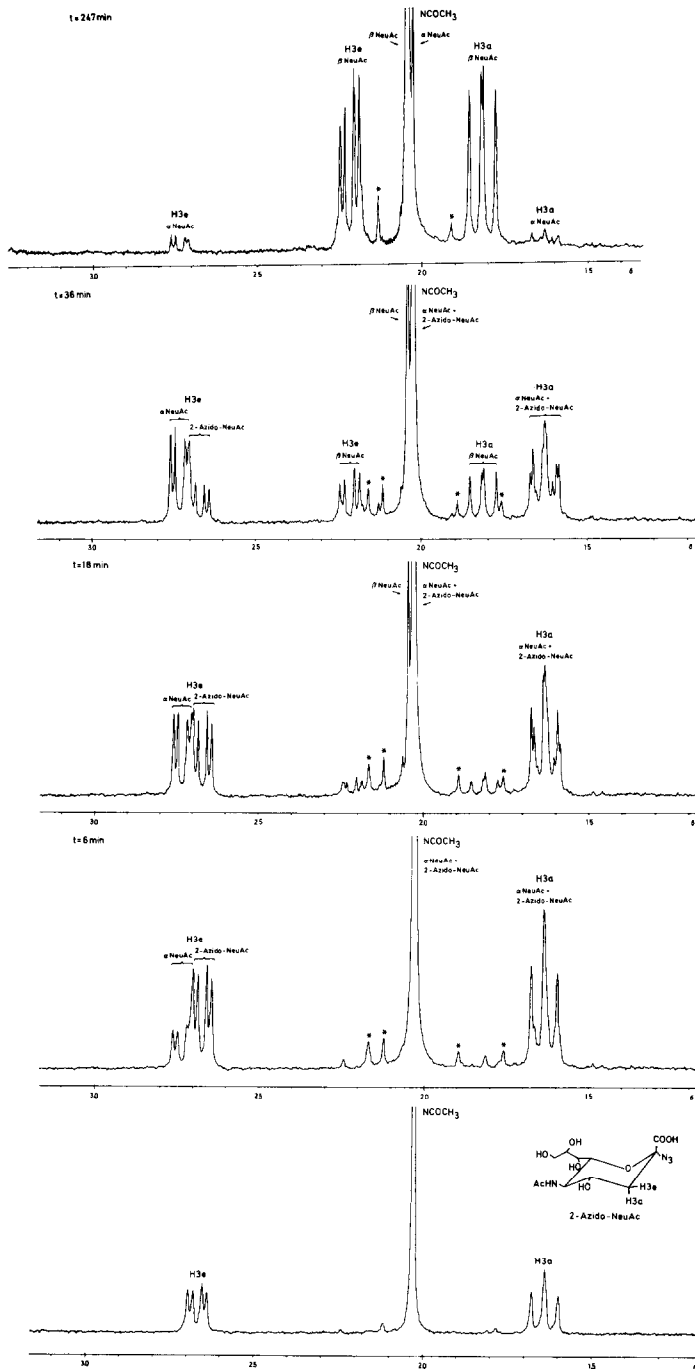


Abb. 1 Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (300 MHz) von 2-Azido-NeuAc und dem Spaltansatz: 10 μmol 2-Azido-NeuAc, 0,5 ml 100 mM Na/K-Phosphatpuffer pD 5.4 und 1E Neuraminidase; T = 25°C, 200 Pulse, 8K Datenpunkte; Spektrometer : WH 300 der Firma Bruker Physik; die mit einem Stern (*) bezeichneten Signale stammen von Rotationsseitenbändern und Verunreinigungen.

synthetischen Ketoside N-Acetyl-2-O-benzyl- α -D-neuraminsäure und N-Acetyl-2-azido- α -D-neuraminsäure (2-Azido-NeuAc) (6), da sie unter optimalen Bedingungen bereits innerhalb von 50-70 min. vollständig gespalten werden* (7). Von diesen erweist sich 2-Azido-NeuAc als besonders vorteilhaft, da nach seiner enzymatischen Hydrolyse im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur die Signale der NeuAc zu beobachten sind.

Für die Untersuchungen verwendeten wir zur Freisetzung von α NeuAc die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens*** (1E) und 2-Azido-NeuAc als Substrat (20 mM) in 100 mM Na/K-Phosphatpuffer pD 5.4. Abbildung 1 gibt eine Reihe von Spektrenausschnitten wieder, die während der enzymatischen Hydrolyse aufgenommen wurden. Aus diesen Spektren erhielten wir durch Integration der Signale der Acetylreste ($\delta = 2.0-2.1$) die Konzentrationen der drei Komponenten des Gemisches 2-Azido-NeuAc, α NeuAc und β NeuAc (Abb.2). Die angegebenen Zeiten stellen Mittelwerte über die für die Aufnahmen erforderlichen Meßzeiten von ca. 5 min. dar. Diese waren nicht unterschreitbar, da ein gesichertes Auswerten der Integrale gewährleistet sein mußte. Der Anwendung einer höheren Substratkonzentration stand die begrenzte Zugänglichkeit des Substrates entgegen.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_α und k_β für pD-Werte <5 sowie solchen von $pD >7$ mußte das Substrat wegen des engen optimalen Bereiches der Neuraminidaseaktivität zunächst im pD-Optimum (pD 5.0-5.4) dieses Enzymes hydrolysiert werden. Diese Hydrolyse beobachteten wir direkt im Spektrometer bis kein Substrat mehr nachweisbar war (50-70 min.). Außerhalb des Gerätes wurde dann mit DCl bzw. NaOD der pD-Wert auf 1.3, 3.9, 6.7 und 11.7 eingestellt, worauf, wiederum im Spektrometer, die Mutarotation durch Integration der N-Acetylsignale quantitativ verfolgt wurde. Aus den Meßdaten errechneten wir die in der Tabelle angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für die Mutarotation sowie die Halbwertszeiten für die Abnahme der α NeuAc (8).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei pD 5.4 die Mutarotation ein Minimum ihrer Geschwindigkeit aufweist. Bereits bei pD 6.7 erfolgt die Einstellung des Gleichgewichtes mehr als doppelt so schnell. Bei pD 1.3 sowie pD 11.7 wird schließlich die Mutarotation unmeßbar schnell. Dieser Befund erklärt vielleicht, warum bisher für NeuAc keine Mutarotation beobachtet wurde. Über den Mechanismus der Mutarotation ist noch keine Aussage möglich. Ihre pD-Abhängigkeit deutet jedoch auf eine Katalyse durch H^+ und OH^- hin, was in Einklang mit Beobachtungen bei anderen Monosacchariden steht (9).

* Für die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Messungen der Mutarotation müssen in den Substraten alle austauschbaren OH- und NH-Protonen durch D ersetzt und deuterierte Puffer verwendet werden.

**Die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* wurde von der Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, bezogen.

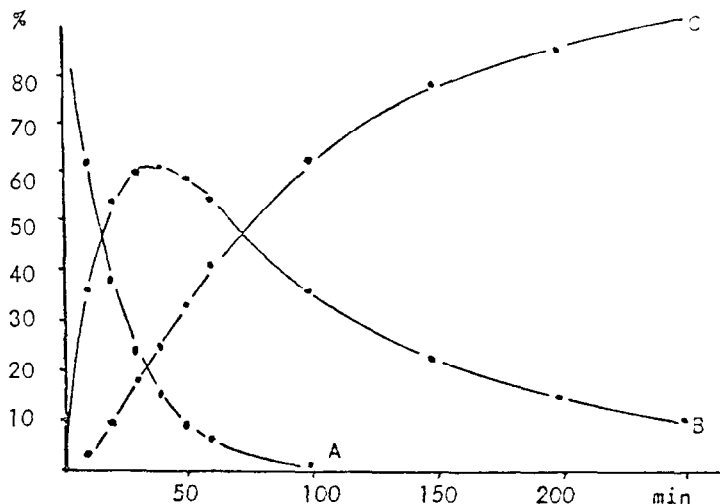


Abb. 2 Zeitliche Änderung der Konzentrationen von : 2-Azido-NeuAc (A); α -NeuAc (B); β -NeuAc (C); Versuchsbedingungen siehe Abb. 1

pD	$k_{\alpha} [s^{-1}]$	$k_{\beta} [s^{-1}]$	$t_{0.5} [min]$
1.3	-	-	<1
3.9	$2.3 \cdot 10^{-4}$	$0.2 \cdot 10^{-4}$	60
5.4	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$0.1 \cdot 10^{-4}$	80
6.7	$4.2 \cdot 10^{-4}$	$0.4 \cdot 10^{-4}$	25
11.7	-	-	<1

Tabelle Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten für die Mutarotation

Dank: Wir danken Frau U.Rose für ausgezeichnete Arbeit bei der Synthese der 2-Azido-NeuAc sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe.

Literatur :

- 1) U.Dabrowski, H.Friebolin, R.Brossmer, M.Supp, Tetrahedron Lett. 4637 (1979)
- 2) J.M.Beau, R.Schauer, J.Haverkamp, L.Dorland, J.F.G.Vliegenthart, Carbohydr. Res. 82, 125 (1980)
- 3) L.W.Jaques, E.B.Brown, J.M.Barrett, W.S.Brey jr., W.Weltner jr., J. Biol. Chem. 252, 4533 (1977)
- 4) H.Friebolin, M.Supp, R.Brossmer, G.Keilich, D.Ziegler, Angew.Chem. 92, 200 (1980)
- 5) H.Friebolin, R.Brossmer, G.Keilich, D.Ziegler, M.Supp, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 697 (1980)
- 6) R.Brossmer, U.Rose, Manuskript in Vorbereitung
- 7) G.Keilich, D.Ziegler, R.Brossmer, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 1302 (1980)
- 8) A.Mannschreck, A.Mattheus, G.Rissmann, J. Molec. Spectrosc. 23, 15 (1967)
- 9) H.S.Isbell, W.Pigman, Adv. Carbohydr. Chem. 24, 13 (1969)