

# Bildung eines oxoäthylverzweigten Zuckers aus Thymidindiphosphatglucose und Pyruvat mit einem zellfreien System aus *Streptomyces aureofaciens*

Formation of an Oxoethyl-branched Sugar from Thymidine Diphospho-D-glucose  
and Pyruvate with a Cell Free System from *Streptomyces aureofaciens*

Ulrich Matern und Hans Grisebach

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen am Biologischen Institut II, Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. **29 c**, 407–413 [1974]; eingegangen am 23. März 1974)

Branched-chain Carbohydrates, Biosynthesis, Quinocycline Complex

Incubation of thymidine diphospho (TDP)-D-[U-<sup>14</sup>C]-glucose with a cell-free extract from *Streptomyces aureofaciens* and subsequent hydrolysis of the nucleotide sugars led to the formation of 4 radioactive products (I–IV). Addition of pyruvate to the incubation caused an increase in the amount of III and a decrease in that of II. Product I was identified as 4-keto-6-deoxyglucose. Product III was isolated on a preparative scale as the methylglycoside and was identified as  $\alpha$ -methyl-2,6-dideoxy-4-C-[1'-oxoethyl]-L-xylo-hexopyranoside (Fig. 1, **3**) from its NMR spectrum and by its borate complex formation, which established the cis configuration of the hydroxyl groups at C-3 and C-4. The oxoethyl-branched sugar formed in the cell-free system is epimer at C-3 with the sugar formed *in vivo* by *S. aureofaciens*. The reason for this difference is not clear. Product II could be tentatively formulated as 4-keto-2,6-dideoxy-L-xylo-hexopyranose (**6**) on the basis of its chromatographic and chemical properties and its reduction by sodiumborohydride to two sugars. The products II–IV were also obtained when TDP-4-keto-6-deoxyglucose was the substrate of the reaction.

Addition of thiaminepyrophosphate to the incubation in the presence of pyruvate did not increase the yield of III. The increase in the amount of III formed in the presence of pyruvate could be inhibited by addition of glyoxylic acid. After incubation of [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]-hydroxyethyl-thiaminepyrophosphate with TDP-glucose in the cell-free extract no radioactive III could be detected.

Die Anthrazyklin Antibiotika Chinozyklin A und B und Isochinozyklin A und B aus *S. aureofaciens* (FD 111 88 Pfizer) enthalten als glykosidische Komponenten die verzweigt-kettigen Zucker 2,6-Dideoxy-4-C-[1'-hydroxyäthyl]-L-xylo-hexopyranose (Fig. 1, **1**, R = H) (aus A-Komponenten) und 2,6-Dideoxy-4-C-[1'-oxoäthyl]-L-xylo-hexopyranose (**2**, R = H) (aus B-Komponenten) <sup>1</sup>.

Einbauversuche mit markierten Vorstufen hatten gezeigt, daß die C<sub>2</sub>-Verzweigung der Zucker **1** und **2** aus den C-Atomen 2 und 3 von Pyruvat stammt und **2** sehr wahrscheinlich die Vorstufe von **1** ist <sup>2</sup>. Auf Grund dieser Befunde hatten wir als aktivierten C<sub>2</sub>-Donor für die Oxoäthylverzweigung von **2** Hydroxyäthylthiaminpyrophosphat angenommen <sup>2</sup>.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Bildung eines oxoäthylverzweigten Zuckers aus TDP-Glucose und Pyruvat mit einem zellfreien System aus *S. aureofaciens*. Außerdem über Versuche

zum Nachweis der Beteiligung von TPP bzw. HETPP bei dieser Reaktion.

## Material und Methoden

### Chemikalien

TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose (50  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) wurde von ICN, Irvine, California, USA, bezogen und [2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat (16  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) von NEN, Dreieichenhain. TDP-glucose stammte von Boehringer GmbH, Mannheim, Thiaminpyrophosphat und Amberlyst A 21 von Serva, Heidelberg, und alle übrigen Chemikalien von Merck AG, Darmstadt.

### Kultivierung von *S. aureofaciens*

Die Kultivierung des Stammes FD 11 88 von Pfizer, Inc, USA, und der Test aus Antibiotikaproduktion erfolgte wie früher beschrieben <sup>2</sup>.

**Abkürzungen:** TPP, Thiaminpyrophosphat; HETPP,  $\alpha$ -Hydroxyäthylthiaminpyrophosphat; TDP, Thymidindiphosphat; Rha, Rhamnose.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Grisebach, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen am Biologischen Institut II der Universität D-7800 Freiburg i. Br., Germany, Schänzlestr. 9/11.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

### Analytische Methoden

Absteigende Papierchromatographie wurde durchgeführt auf Schleicher u. Schüll 2043 b mit dem Laufmittel 1. Methyläthylketon-Essigsäure-H<sub>2</sub>O (8:1:1, v/v) und auf Whatman 3 MM mit 2. Isobuttersäure-Pyridin-H<sub>2</sub>O (2:0,2:1, v/v) und 3. Isobuttersäure-Pyridin-H<sub>2</sub>O-Ammoniak (140:14:70:2, v/v).

Zur Borsäurechromatographie wurden Whatman 3 MM Papiere mit 50% ihres Gewichtes 0,2 M K-Boratpuffer, pH 10,0 bzw. mit 0,2 M K-Phosphatpuffer, pH 10,0 beladen und mit *n*-Butanol, das zuvor mit dem jeweiligen Puffer gesättigt worden war, entwickelt.

Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt auf Kieselgel G Folien (Merck) mit 4. Chloroform; 5. Chloroform-Methanol (100:3, v/v); 6. Methyläthylketon-Äther (1:1, v/v); 7. Äther-Pyridin (100:2, v/v); 8. Chloroform-Aceton (1:1, v/v).

Elektrophorese wurde durchgeführt auf Macherey Nagel NM 214 mit 9. 0,05 M K-Boratpuffer, pH 10,0 und 10. 0,05 M K-Phosphatpuffer, pH 10,0. Die Sichtbarmachung der Zucker erfolgte mit Anisaldehyd/Essigsäure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Reagens (0,5:50:1, v/v)<sup>1</sup>.

Für die Radioaktivitätsmessung auf Papier wurde Flüssigkeitsszintillationszählung im Toluolcocktail (5 g PPO/l Toluol) verwendet, oder ein Paperscanner der Fa. Berthold, Wildbad. Kieselgelchromatogramme wurden im Dünnschichtscanner derselben Fa. ausgewertet.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian 100 MHz-Gerät mit Fourier-Transform bei der Ciba AG, Basel, aufgenommen. Einstrahlungsmessungen erfolgten mit einem 90 MHz-Gerät bei der Firma Bruker-Physik in Karlsruhe.

### Herstellung des zellfreien Extraktes

Zu den angegebenen Fermentationszeiten wurde das Mycel bei 30 000 × *g* für 10 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgossen und das Mycel mit 0,05 M K-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen. Nach Suspension des Mycels im gleichen Gewicht des Phosphatpuffers wurde unter Eiskühlung mit Ultraschall (Branson S 125, power position 4) im Rhythmus 10 sec Beschallen – 10 sec Pause für 3 min aufgeschlossen. Danach zentrifugierte man 10 min bei 30 000 × *g* und dekantierte den Überstand sofort. Dieser Rohsaft wurde zur Inkubation verwendet.

### Enzymatische Inkubation

Die Standardinkubation enthielt: 2 µl einer wäßrigen Lösung von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose (50 000 dpm) oder von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-4-keto-6-desoxyglucose

(50 000 dpm), 5 µl einer 50 mM Na-Pyruvatlösung und 50 µl Rohsaft (15 – 20 mg Protein/ml).

Nach Inkubation für 1 Stunde bei 25 °C wurde 10 µl 10-prozentige Trifluoressigsäure zugesetzt und zur Hydrolyse der Nucleotidzucker 20 min bei 20 °C belassen. Zur quantitativen Hydrolyse von TDP-4-keto-6-desoxyglucose mußte 10 min auf 95 °C erhitzt werden.

### Darstellung von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-4-keto-6-desoxyglucose

TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose (0,1 µCi) wurde mit 500 µl eines zellfreien Extraktes aus Mycel, das 20 Stunden nach Fermentationsbeginn geerntet worden war (zu einem späteren Zeitpunkt sinkt die Ausbeute), für 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Äthanol wurde zentrifugiert und der Überstand auf gewaschenem (10 mM EDTA-Lösung/Wasser/Methanol) Whatman Papier aufgetragen und 70 Stunden bei etwa 10 °C mit Laufmittel 3 chromatographiert. Nach Auswaschen der Buttersäure mit Aceton und Trocknen des Papiers wurde ein Autoradiogramm (30 Stunden Exposition) angefertigt. Die Zone mit der höchsten Laufstrecke (28 cm, siehe Ergebnisse) wurde mit Wasser eluiert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute an TDP-4-keto-6-desoxyglucose betrug etwa 90%.

### Darstellung von [α-<sup>14</sup>C]-Hydroxyäthylthiaminpyrophosphat und Umsatz mit TDP-glucose

Pyruvatdehydrogenasekomplex wurde aus Schweineherzen nach der Methode von Scriba und Holzer<sup>3</sup> bis zur ersten Ammonsulfatfällung dargestellt. Mit diesem Enzymkomplex wurde aus 16 mg [2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat (16 µCi/µmol) und TPP nach einer veröffentlichten Methode<sup>4</sup> 11 mg [α-<sup>14</sup>C]-HETPP mit einer spez. Aktivität von 1,45 µCi/µmol gewonnen.

Zur Inkubation wurden in 50 µl Rohsaft bis zu 4 nmol (0,8 · 10<sup>-5</sup> mol/l) TDP-glucose und 50 nmol bis 500 nmol [<sup>14</sup>C]-HETPP eingesetzt.

## Ergebnisse

### Inkubation von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose mit zellfreiem Extrakt aus *S. aureofaciens*

Inkubation von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose mit einem zellfreien Extrakt aus *S. aureofaciens* nach 25 Stunden Fermentation lieferte nach Hydrolyse der Nukleotid-Zucker mit 2% Trifluoressigsäure und Papierchromatographie mit Laufmittel 1 neben nicht hydrolysierter TDP-glucose in der Startzone und nicht umgesetzter Glucose (*R*<sub>Rha</sub> = 0,17) 4 weitere radioaktive Verbindungen mit folgenden *R*<sub>Rha</sub>-Wer-

ten: I 1,0; II 2,3; III 3,2 und IV 4,0. Die relativen Mengen der Produkte I–IV wechselten sehr stark in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer und den Inkubationsbedingungen. Die relative Menge von III konnte durch Zusatz von Pyruvat zu Beginn der Inkubation stark erhöht werden, wobei die relative Menge an II entsprechend abnahm (Tab. I).

Tab. I. Abhängigkeit der relativen Mengen der Verbindungen I–IV von Zusätzen zur Inkubation. Die Inkubation erfolgte mit einem zellfreien Extrakt aus Mycel nach 25 Stunden Fermentation unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen.

Zusatz zur Inkubation von TDP-[U- <sup>14</sup> C]-glucose mit 50 µl Rohsaft	Relative Menge an Produkten			
	I	II	III [%]	IV
5 µl Puffer	20	45	15	10
5 µl Na-Pyruvat (50 mM)	10	25	45	8
5 µl α-Ketoglutarat (50 mM)	—	42	12	20
5 µl Acetylphosphat (50 mM)	—	45	19	16

Die relative Menge von III änderte sich nicht über einen breiten Konzentrationsbereich von Pyruvat (Tab. II). Wurde Pyruvat durch α-Ketoglutarat oder Acetylphosphat ersetzt, so stieg die Menge von III nicht an (Tab. I).

Konzentration von Pyruvat im Inkubationsansatz [mM]	Relative Menge an III [%]
0,5	35
1,0	43
2,5	46
5,0	47
10,0	45
25,0	38
50,0	33

Tab. II. Einfluß der Pyruvatkonzentration im Inkubationsansatz auf die relative Menge von Produkt III.

### Nukleotidspezifität der Reaktion

TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose ( $4 \cdot 10^{-4}$  µmol) wurden mit je 50 µl Rohsaft ohne und mit Zusatz von je  $4 \cdot 10^{-1}$  µmol einer der folgenden nicht markierten Nukleotidzucker durchgeführt: TDPG, CDPG, GDPG, ADPG und UDPG. Nach Hydrolyse und Chromatographie konnten nur bei Zusatz von TDPG keine radioaktiven Produkte mehr nachgewiesen werden (Verdünnung durch das nichtmarkierte Substrat), während bei Zusatz der anderen Nukleotidzucker die Radioaktivität in den Produkten unbeeinflusst blieb.

### Identifizierung von Produkt I als 4-Keto-6-desoxyglucose und als Zwischenstufe der Biosynthese der Produkte II–IV

Wurden die Kulturen bereits etwa 20 Stunden nach Beginn der Fermentation geerntet, so bildete sich nach Inkubation mit einem Extrakt aus diesen Zellen und anschließender Hydrolyse nur das Produkt I mit über 90% Umsatz. Wurde die Hydrolyse weggelassen und der mit Äthanol abgestoppte Reaktionsansatz (siehe Methoden) auf Papier für 70 Stunden bei 10 °C mit Laufmittel 3 chromatographiert, erhielt man 3 radioaktive Zonen: Zone 1, Laufstrecke 22 cm; Zone 2, Laufstrecke 25 cm und Zone 3, Laufstrecke 28 cm. Ein Teil der eluierten Zonen wurde jeweils mit NaBH<sub>4</sub> reduziert und anschließend hydrolysiert (10% Trifluoressigsäure, 95 °C, 20 min), ein anderer Teil ohne Reduktion ebenso hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden dann auf Papier mit Laufmittel 1 chromatographiert.

Zone 1 ergab nach Hydrolyse nur Radioaktivität am Start. Dieser nicht hydrolysierbare Anteil der TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose betrug etwa 8% der Gesamtaktivität.

Zone 2 zeigte nach Hydrolyse neben etwas Radioaktivität am Start nur Aktivität in der Glucosezone ( $R_{\text{Rha}} = 0,17$ ) und war daher nicht umgesetzte TDP-Glucose.

Zone 3 wurde als TDP-4-keto-6-desoxyglucose identifiziert durch das Absorptionsspektrum nach Zusatz von Alkali<sup>5</sup> und durch die Bildung von 6-Desoxygalactose ( $R_{\text{Rha}} = 0,7$ ) und 6-Desoxyglucose ( $R_{\text{Rha}} = 0,9$ ) nach Reduktion und Hydrolyse.

Inkubierte man präparativ gewonnene TDP-[U-<sup>14</sup>C]-4-keto-6-desoxyglucose an Stelle von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose im Enzymansatz, entstanden die gleichen Produkte II–IV wie mit TDP-glucose als Substrat (Tab. III).

Tab. III. Vergleich der Inkubation von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-4-keto-6-desoxyglucose mit Inkubation von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose. Zellfreier Extrakt aus Mycel nach 25 Stunden Fermentation in Standardinkubation.

Substrat	Sonstige Zusätze	Relative Menge an Produkten		
		II	III [%]	IV
TDP-glucose	—	56	16	5,5
TDP-4-keto-6-desoxyglucose	—	46	17,5	6
TDP-glucose	Na-Pyruvat	31	44,5	6
TDP-4-keto-6-desoxyglucose	Na-Pyruvat	27	35	6,5

### Identifizierung des Produktes III

Der Standardinkubationsansatz mit Pyruvat (1 Stunde Inkubation) wurde gefriergetrocknet, in 2% methanolischer Trifluoressigsäure suspendiert und 3 Stunden bei 25 °C belassen. Nach Entfernung der Säure über Amberlyst A21 wurde das konzentrierte Eluat auf Kieselgel mit Methyläthylketon chromatographiert. Die radioaktive Zone hatte denselben  $R_F$ -Wert wie die authentischen Methylglycoside<sup>2</sup> des Zuckers **2**. Rechromatographie dieser Zone auf Papier mit dem Laufmittel 1 ergab eine radioaktive Zone mit  $R_{Rha} = 4,2$ , was ebenfalls dem Laufverhalten der Methylglycoside von **2** entspricht. Nach Elution und Entfernen des Lösungsmittels ließ sich die Verbindung sublimieren (0,1 Torr, 80 °C, 1 Stunde). Chromatographie des Sublimats auf Kieselgel mit Laufmittel 5 ergab 2 Verbindungen ( $R_F$  0,56 = III<sub>1</sub> und 0,36) etwa im Verhältnis 4:1. Rechromatographie der Verbindung mit höherem  $R_F$ -Wert auf Kieselgel mit Laufmittel 7 ergab eine Verbindung mit  $R_F$  0,63. In den Laufmitteln 5 und 6 unterschied sich III<sub>1</sub> wenig, aber signifikant im  $R_F$ -

Tab. IV. Vergleich der  $R_F$ -Werte auf Kieselgel des Methylglycosids III<sub>1</sub> mit den Werten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methylglycoside<sup>1</sup> des Zuckers **2**.

Laufmittel	$\alpha$ -Methylglycosid von <b>2</b>	$\beta$ -Methylglycosid von <b>2</b>	III <sub>1</sub>
		$R_F$	
5	0,7	0,57	0,56
6	0,84	0,84	0,80

Wert von dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methylglycosid von **2** (Tab. IV). Unter den oben angegebenen Bedingungen der Methanolyse reagierten nur 2-Desoxyzucker, z. B. Digitoxose. 6-Desoxy- und 3-Desoxyzucker wurden nicht hydrolysiert.

Aus 28 mg TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose (50  $\mu$ Ci/mmol) wurden nach Inkubation mit 500 ml zellfreiem Extrakt und 2,5 mmol Pyruvat durch Methanolyse, chromatographische Reinigung auf Papier und Kieselgel der III<sub>1</sub> entsprechenden Verbindung und wiederholte Sublimation etwa 200  $\mu$ g einer radioaktiven kristallinen Verbindung erhalten.

Das Protonenresonanzspektrum mit Fourier Transform dieser Substanz hat große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des  $\alpha$ -Methylglycosids des Zuckers **2**<sup>1</sup> (Tab. V). Das Signal für das Proton an C-3 zeigt jedoch eine Verschiebung um 0,82 ppm nach tieferem Feld gegenüber dem entsprechenden Signal von **2** und eine große Kopplungskonstante von 11 Hz, die einer axial-axial Kopplung entspricht<sup>8</sup>. Weiterhin ist das Proton an C-5 um 0,42 ppm nach höherem Feld verschoben. Diese Ergebnisse können so gedeutet werden, daß im Gegensatz zu **2** die Hydroxylgruppe in III<sub>1</sub> am C-3 äquatorial ständig ist (**3**). Damit entfällt die 1,3 diaxiale Wechselwirkung zwischen der OH-Gruppe an C-3 und dem Proton an C-5, wodurch die Verschiebung des Signals dieses Protons nach höherem Feld bewirkt wird. Das 3 Protonen Singulett bei 2,32 ppm, das den Methylprotonen der Oxoäthylseitenkette zugeordnet werden kann, beweist die enzymatische Einführung der C<sub>2</sub>-Verzweigung.

Tab. V. Vergleich der  $\delta$ -Werte und Kopplungskonstanten der Methylglycoside der Zucker **2** und **3**. Kopplungskonstanten in Hz. Die Spektren wurden bei 100 MHz in [<sup>2</sup>H]Chloroform gemessen.

Methylglycosid <b>2</b> *			Methylglycosid <b>3</b>		
Proton	$\delta$	Multiplizität	Proton	$\delta$	Multiplizität
H (1)	4,87	1 H breites Dublett	H (1)	4,83	1 H breites Dublett
H (2a)	1,85	1 H Oktett	H (2a)	~1,6	1 H {
H (2e)	2,33	1 H Sextett	H (2e)	2,1	1 H { Multipl. J <sub>1,2a</sub> =3,5
H (3e)	3,60	1 H Multipl. {	H (3a)	4,42	1 H Oktett
		J <sub>2a,2e</sub> =14,8			J <sub>3a,2a</sub> =11
		J <sub>2e,3</sub> =3			J <sub>3a,2e</sub> =6
		J <sub>2a,3</sub> =3			J <sub>5,Me</sub> =6,5
		J <sub>3,OH</sub> =9,5			
H (5e)	4,57	1 H Quartett	H (5e)	4,15	1 H Quartett
		J <sub>5,Me</sub> =6,5			bei Einstrahlung in Dublett
CH <sub>3</sub> -C (5)	1,07	3 H Dublett	CH <sub>3</sub> -C (5)	1,05	3 H Dublett
CH <sub>3</sub> -C (7)	2,39	3 H Singulett	CH <sub>3</sub> -C (7)	2,32	3 H Singulett
CH <sub>3</sub> O-	3,44	3 H Singulett	CH <sub>3</sub> O-	3,39	3 H Singulett
HO-C (4)	3,99	1 H Singulett	HO-C (4)	3,88	1 H Singulett
HO-C (3)	4,02	1 H Dublett	HO-C (3)	3,76	1 H Singulett verbreitert
		Abwesend nach <sup>2</sup> H Austausch			

\* Die Werte für Methylglycosid **2** stammen aus unserer früheren Arbeit<sup>1</sup>.

Die Annahme, daß in **3** die Hydroxylgruppe im Gegensatz zu **2** äquatorial steht, konnte durch Boratkomplexbildung von **3** (zwischen Hydroxylgruppen an C-3 und C-4) bekräftigt werden. Aus Tab. VI Tab. VI. Vergleich der  $R_F$ -Werte des Methylglycosids **3** mit L-Rhamnose in Boratpuffer.

Laufmittel	Methylglycosid <b>3</b>	L-Rhamnose
	$R_F$	
<i>n</i> -Butanol/ Boratpuffer pH 10,0	0,08	0,085
<i>n</i> -Butanol/ Phosphatpuffer pH 10,0	0,52	0,16

ist zu ersehen, daß bei Papierchromatographie von **3** im Borat Puffer als stationärer Phase<sup>6</sup> eine Verzögerung des  $R_F$ -Wertes eintritt. Das Methylglycosid **2** bildet keine Boratkomplexe<sup>1</sup>. Außerdem zeigt **3** bei Papierelektrophorese in Borat Puffer von 10,0<sup>7</sup> im Gegensatz zu **2** eine Wanderung mit  $R_{\text{Pikrat}} = 0,33$ .

Unter der Annahme, daß **3** wie **2** der L-Reihe angehört, kann **3** somit die Struktur des  $\alpha$ -Methyl-2,6-dideoxy-4-C[1'-oxyäthyl]-L-lyxo-hexopyranosid zugeschrieben werden (Fig. 1).

#### Eigenschaften der Verbindung II

Wurde unter Bedingungen, unter denen vorwiegend Verbindung II gebildet wurde (siehe unten), inkubiert, anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert und nach Hydrolyse im Laufmittel 1 auf Papier aufgetrennt, ergaben sich an Stelle von II zwei radioaktive Verbindungen mit  $R_{\text{Rha}} = 2,0$  und  $R_{\text{Rha}} = 1,6$  etwa im Verhältnis 2:1. Dies deutete darauf hin, daß II ein Ketozucker ist, aus dem durch Reduktion mit Borhydrid 2 epimere Zucker entstanden waren.

Rechromatographie der beiden Substanzen auf Kieselgel-Folien mit Laufmittel 8 ergab für die Substanz mit  $R_{\text{Rha}} = 2,0$  einen  $R_F$  von 0,11 und für die Substanz mit  $R_{\text{Rha}} = 1,6$  einen  $R_F$  von 0,14. Authentische 2-Desoxy-L-fucose zeigt im gleichen Chromatogramm einen  $R_F$  von 0,11 und D-Digitoxose einen  $R_F$  von 0,28. Nach dem Laufverhalten ist Verbindung II daher ein 2,6-Dideoxyzucker. Die 2-Desoxyfunktion von II wurde weiterhin angezeigt durch

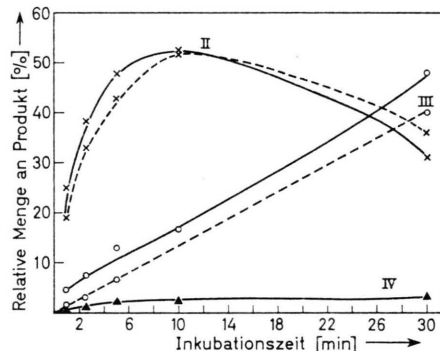


Fig. 2. Abhängigkeit der relativen Menge an den Produkten II–IV von der Inkubationszeit. ---, zellfreier Extrakt nach 22 Stunden Fermentation; —, Extrakt nach 26 Stunden Fermentation.

die blaue Färbung, die II mit Vanillin-Perchlorsäure<sup>9</sup> (3% wäßrige Perchlorsäure und 2% äthanol. Vanillin 1:1) ergab.

Auf Grund dieser Befunde und dem Ergebnis, daß II offensichtlich in **3** umgewandelt wird (siehe Tab. I und unten) kann geschlossen werden, daß II die 4-Keto-2,6-dideoxy-L-lyxo-hexopyranose **6** (Fig. 3) ist. Reduktion dieses Zuckers sollte zu 2-Desoxy-

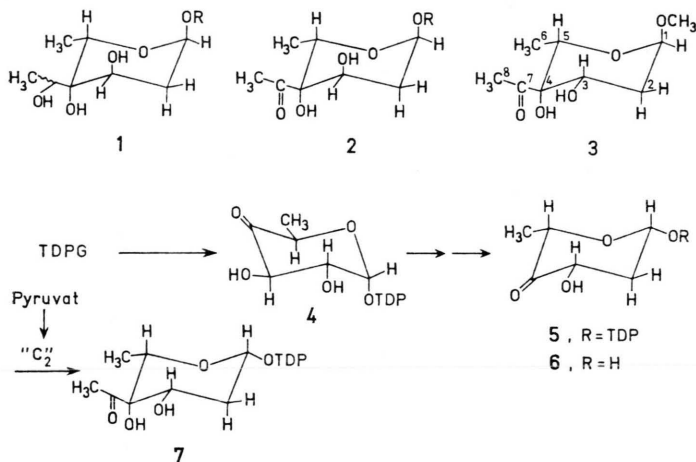


Fig. 1. Struktur der verzweigten Zucker aus Chinozyklen A und B und aus dem Enzymansatz. R = Aglykon.

Fig. 3. Vorgeschlagene Reaktionsfolge für die Biosynthese des oxoäthylverzweigten Zuckers **7** aus TDP-Glucose.

L-fucose und 2-Desoxy-L-rhamnose führen. Ein Reduktionsprodukt stimmte im  $R_F$ -Wert mit 2-Desoxy-L-fucose überein (siehe oben). Von 2-Desoxy-L-rhamnose stand uns keine Vergleichssubstanz zur Verfügung, jedoch zeigt die publizierte Skizze eines Dünnschichtchromatogramms von 2-Desoxy-rhamnose und 2-Desoxy-fucose<sup>10</sup> im Laufmittel 8 einen etwas höheren  $R_F$ -Wert für 2-Desoxy-rhamnose. Dies stimmt mit dem Laufverhalten des zweiten Reduktionsproduktes von II überein.

### Reihenfolge der Produkte

Um einen Hinweis auf die Reihenfolge der Produkte II–IV zu erhalten, wurden Inkubationen von TDP-[U-<sup>14</sup>C]-glucose mit zellfreien Extrakten aus verschiedenen Fermentationsperioden und für verschieden lange Inkubationszeiten durchgeführt. Etwa 21 Stunden nach Fermentationsbeginn beginnt die Antibiotikaproduktion<sup>2</sup>. Die Bildung von TDP-4-keto-6-desoxyglucose erreicht ihr Maximum etwa 1,5 Stunden, bevor die Bildung von II einsetzt.

Die Abhängigkeit der relativen Menge der Produkte II–IV von der Fermentations- und Inkubationsdauer ist in Fig. 2 dargestellt. Einschränkend ist zu sagen, daß im Rohextrakt die Produktmenge nicht linear mit der Proteinkonzentration ist. Aus dem Verlauf der Produktbildung und der Abnahme von II und Zunahme von III bei Zusatz von Pyruvat (Tab. I) läßt sich jedoch schließen, daß II, als aktivierter Zucker (5), eine Vorstufe des TDP-Derivates von III (7) ist. Auf Grund dieser und der oben geschilderten Ergebnisse kann daher die in Fig. 3 dargestellte Reaktionsfolge für die Biosynthese der TDP-2,6-didesoxy-4-C[1'-oxoäthyl]-L-lyxo-hexopyranose (7) postuliert werden. Die durch TDP-glucose 4,6-Dehydratase (EC 4.2.1.46) aus TDP-glucose gebildete TDP-4-keto-6-desoxy-D-glucose (4) geht in einem oder mehreren Schritten in TDP-4-keto-2,6-didesoxy-L-lyxo-hexose (5) über, welche dann mit einer aus Pyruvat gebildeten aktivierten C<sub>2</sub>-Verbindung (siehe unten) 7 ergibt.

### Versuche zur Kofaktorabhängigkeit der Carboligase Reaktion

Einleitend wurde bereits gesagt, daß wir „aktiven Acetaldehyd“ (HETPP) als Vorstufe für die Herkunft der Oxoäthylseitenkette postuliert hatten<sup>1</sup>. Ein Hinweis für die Beteiligung von TPP an der Reaktion konnte bisher nicht erhalten werden. Wei-

tere Versuche wurden daher unternommen, um die Natur des Kofaktors zu klären.

Wie aus Tab. VII hervorgeht, hatte ein Zusatz von TPP und Mg<sup>2+</sup> zu einem Inkubationsansatz mit Pyruvat keinen zusätzlichen stimulierenden Effekt auf die Menge von III. Zusatz von Glyoxylsäure

Tab. VII. Einfluß von TPP und Glyoxylsäure auf die relativen Mengen der Verbindungen II–IV.

Zusätze zur Standard-Inkubation ohne Pyruvat	Relative Menge an Produkten [%]		
	II	III	IV
10 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	52	17	8
5 $\mu$ l 50 mM Pyruvat + 5 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	30	43	6
5 $\mu$ l 50 mM Pyruvat + 5 $\mu$ l TPP/ MgSO <sub>4</sub> (je 100 mM)	35	34	6
5 $\mu$ l 50 mM Pyruvat + 5 $\mu$ l 50 mM Glyoxylsäure	45	20	10
5 $\mu$ l 50 mM Glyoxylsäure; nach 15 min	46	19	10
5 $\mu$ l Pyruvat/TPP/MgSO <sub>4</sub> (je 100 mM)			

unterdrückte den stimulierenden Einfluß von Pyruvat auf die Ausbeute von III. Wurde mit Glyoxylsäure vorinkubiert und nach 15 min Pyruvat, TPP und Mg<sup>2+</sup> zugesetzt, konnte die Hemmung durch Glyoxylsäure nicht aufgehoben werden. Nach Gel-siebzentrifugation<sup>12</sup> durch Sephadex G-25 sanken im Ansatz mit Pyruvat die relativen Mengen von II von 21 auf 13% und von III von 37 auf 8%, während die Menge von IV von 20 auf 34% anstieg. Zugabe von TPP, MgCl<sub>2</sub> und (oder) dem für die Bildung von 3-Desoxyzuckern als Kofaktor benötigten Pyridoxaminphosphat<sup>13</sup> erhöhte nicht die Aktivität des siebzentrifugierten Rohsaftes für die Bildung von III.

Mit aus Schweineherzen gewonnenem Pyruvat-dehydrogenasekomplex, TPP und [2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat wurde [ $\alpha$ -<sup>14</sup>C]-Hydroxyäthylthiaminpyrophosphat mit einer spez. Aktivität von 1,45  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol dargestellt<sup>4,5</sup>. Nach Inkubation des markierten HETPP mit TDP-glucose und zellfreiem Extrakt sowie unter Zusatz von einem mit Glyoxylsäure vorinkubierten Extrakt, oder Gel-zentrifugiertem Rohsaft konnte jedoch kein radioaktives Produkt III nachgewiesen werden. Unter den angewandten Bedingungen wäre ein Umsatz des HETPP von über 5% noch zu messen gewesen.

### Diskussion

Nachdem sich die Arbeiten zur zellfreien Biosynthese verzweigtkettiger Zucker bisher auf C<sub>1</sub>-ver-

zweigte Zucker beschränkt haben<sup>14–16</sup>, wird in dieser Arbeit erstmals die zellfreie Synthese einer C<sub>2</sub>-verzweigten Pyranose beschrieben. Die Ergebnisse bestätigen den aus den Markierungsversuchen gezogenen Schluß, daß diese Verzweigung aus Pyruvat stammt<sup>2, 11</sup>. Ebenso wie im Falle der Biosynthese von L-Mycarose<sup>15, 16</sup> und L-Dihydrostreptose<sup>17</sup> verläuft die Biosynthese des oxoäthylverzweigten Zuckers **7** (Fig. 3) ausgehend von TDP-glucose über TDP-4-keto-6-desoxy-glucose (**4**).

Eigenartigerweise ist nun der im zellfreien System entstandene Zucker **7** auf Grund des Protonenresonanzspektrums und seines chromatographischen Verhaltens am C-3 epimer zu dem *in vivo* von *S. aureofaciens* gebildeten Zucker **2**. Welche Faktoren hierfür verantwortlich sind, ist bisher unbekannt. Das vorläufig als L-lyxo konfigurierter Ketozucker identifizierte Zwischenprodukt **5** läßt darauf schließen, daß die Epimerisierung an C-3 bereits vor Anknüpfung der C<sub>2</sub>-Seitenkette stattgefunden hat.

Die starke Abnahme der Bildung des verzweigten Zuckers nach Behandlung des Rohextraktes mit Sephadex G-25 macht die Beteiligung eines oder mehrerer Kofaktoren bei der Anknüpfung der C<sub>2</sub>-Seitenkette wahrscheinlich, wenn auch dieses Ergebnis nur als vorläufig zu betrachten ist, da auch die Aktivität für die Bildung von **II** absank.

Die teilweise Hemmung der Carboligase-Reaktion durch Glyoxylsäure ist ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung von Thiaminpyrophosphat an der Reaktion, da Glyoxylsäure als spezifischer Hemmstoff

für TPP-abhängige Reaktionen gilt<sup>18</sup>. Allerdings ist der Mechanismus dieser Hemmwirkung ungeklärt<sup>19, 20</sup>.

Der Versuch, die Beteiligung von HETPP mit Hilfe von <sup>14</sup>C-markiertem HETPP direkt nachzuweisen, verlief erfolglos. Ein Umsatz unter 5% hätte aber wegen der relativ geringen spez. Aktivität des eingesetzten HETPP nicht mehr erfaßt werden können. Auch bei Vorinkubation mit Glyoxylsäure, die endogenes TPP binden sollte, wurde kein Einbau von <sup>14</sup>C aus HETPP gefunden.

Die Ergebnisse schließen eine Beteiligung von HETPP dennoch nicht aus, da HETPP nicht als echter Kofaktor angesehen werden kann, sondern nur unter Enzymkatalyse, z. B. mit Pyruvatdecarboxylase, in den eigentlichen Kofaktor – das Carbanion – übergeht<sup>20</sup>.

Weitere Arbeiten zur Auftrennung der an der komplexen Reaktion beteiligten Enzyme sind im Gange.

Die Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie. Unser Dank gilt Herrn Dr. Fritz, Ciba-Geigy AG, Basel, und Herrn Keller, Bruker-Physik, Karlsruhe, für die Aufnahme der NMR-Spektren. Herrn Prof. Dr. Reichstein, Basel, danken wir für Desoxyzucker. Der *S. aureofaciens* Stamm wurde uns freundlicherweise von der Fa. Pfizer, USA, zu Verfügung gestellt. Weiterhin danken wir Herrn Dr. J. Ullrich, Freiburg, für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

- <sup>1</sup> U. Matern, H. Grisebach, W. Karl u. H. Achenbach, Eur. J. Biochem. **29**, 1–4 [1972] und dort zitierte Literatur.
- <sup>2</sup> U. Matern u. H. Grisebach, Eur. J. Biochem. **29**, 5–11 [1972].
- <sup>3</sup> P. Scriba u. H. Holzer, Biochem. Z. **334**, 473–486 [1961].
- <sup>4</sup> B. Deus, J. Ullrich u. H. Holzer, Methods in Enzymology (McCormick, D. B. u. Wright, L. D., eds.) **18 A**, 259–266 [1970].
- <sup>5</sup> R. Okazaki, T. Okazaki, J. L. Strominger u. A. M. Michelson, J. Biol. Chem. **237**, 3014–3026 [1962].
- <sup>6</sup> M. T. Kraus, H. Jäger, O. Schindler u. T. Reichstein, J. Chromatogr. **3**, 63–74 [1960].
- <sup>7</sup> A. B. Foster, Advan. Carbohydr. Chem. **12**, 81–115 [1957].
- <sup>8</sup> J. M. van der Veen, J. Org. Chem. **28**, 564–566 [1963].
- <sup>9</sup> A. P. MacLennan, H. M. Randall u. D. W. Smith, Analyt. Chem. **31**, 2020–2022 [1959].
- <sup>10</sup> H. Brockmann, E. Spohler u. T. Waehnelde, Chem. Ber. **96**, 2935–2936 [1963].
- <sup>11</sup> R. Schmid, H. Grisebach u. W. Karl, Eur. J. Biochem. **14**, 243–252 [1970].

- <sup>12</sup> H. Determann, Gelchromatographie, p. 59, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- <sup>13</sup> P. Gonzalez-Porcu u. J. L. Strominger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 1625–1628 [1972].
- <sup>14</sup> H. Grisebach u. R. Schmid, Angew. Chem. **84**, 192–206 [1972]; Angew. Chem. internat. Edit. **11**, 159–173 [1972].
- <sup>15</sup> H. Pape u. G. U. Brillinger, Arch. Mikrobiol. **88**, 25–35 [1973].
- <sup>16</sup> Y. Eguchi, M. Takagi, F. Uda, K. Kimata, S. Okuda, N. Suzuki u. S. Suzuki, J. Biol. Chem. **248**, 3341–3352 [1973].
- <sup>17</sup> R. Ortmann, U. Matern, H. Grisebach, P. Stadler, V. Sinnwell u. H. Paulsen, Eur. J. Biochem. **43**, 265–271 [1974].
- <sup>18</sup> A. Schellenberger, Angew. Chem. **79**, 1050–1061 [1967].
- <sup>19</sup> M. Crompton u. G. G. Laties, Arch. Biochem. Biophys. **143**, 143–150 [1971].
- <sup>20</sup> J. Ullrich u. A. Mannschreck, Eur. J. Biochem. **1**, 110–116 [1967].