

Nucleotide als Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Polysacchariden

I. Einleitung und sulfatierte Polysaccharide [*]

VON PROF. DR. JACK L. STROMINGER

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE,
ST. LOUIS, MISSOURI (USA)

Nucleotide spielen im Stoffwechsel nicht nur als Vorstufen der Nucleinsäuren eine Rolle. Viele niedermolekulare Verbindungen (Säuren, Alkohole, Zucker) werden für anschließende Biosynthesen aktiviert, indem sie Anhydride oder Ester mit Nucleotiden bilden. Diese Nucleotid-Derivate wirken als Überträger der mit ihnen verbundenen Reste. Häufig werden diese Reste chemisch abgewandelt, während sie sich am Nucleotid befinden, und erst dann in einer biosynthetischen Reaktion übertragen. Nach einer Übersicht der Nucleotid-Typen und ihrer Reaktionen wird über Untersuchungen zur Biosynthese sulfaterter Polysaccharide berichtet.

I. Einleitung

Vor etwas mehr als 10 Jahren entdeckten Leloir und Mitarbeiter [1] in Hefe einen Cofaktor für die Umsetzung von Galaktose. Sie isolierten die Verbindung und zeigten, daß es sich um Uridin-diphosphoglucose handelt. Seit diesen grundlegenden Untersuchungen ist es immer deutlicher geworden, daß viele säurelösliche Nucleotide nicht nur Vorstufen der Nucleinsäuren sind, sondern daneben auch in anderen Stoffwechselprozessen eine Rolle spielen. Es gibt vier Gruppen säurelöslicher Nucleotide entsprechend den vier Hauptnucleotiden der Ribonucleinsäure. Außerdem wurden kürzlich mehrere säurelösliche Desoxyribonucleotide entdeckt. Die Adenosin-nucleotide kennt man seit mindestens 25 Jahren. Bald nach der Isolierung der Uridin-diphosphoglucose (UDPG) fand man dann auch Guanosin- und Cytidin-nucleotide in der säurelöslichen Gewebefraktion. Einleitend beschreiben wir die Derivate der einzelnen Nucleotide und ihre Stoffwechselfunktionen [**].

[*] Diese Arbeit und eine weitere, die später in dieser Zeitschrift erscheinen wird, sind überarbeitete Fassungen zweier Vorlesungen, die im Juli 1960 an der Universität Freiburg/Brsg. und im Oktober 1960 als McLaughlin Lectures an der Universität Texas gehalten wurden. Die Arbeiten im Laboratorium des Autors wurden vom US-Public Health Service (Grants NIAM A-1158 und NIAID E - 1902) sowie von der US National Science Foundation (Grant G-7619) unterstützt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

[**] Wollte man die erste Hälfte dieses Aufsatzes mit Zitaten belegen, so hätte man mehrere hundert Arbeiten zu nennen. Hier wurden daher nur wenige Zitate angeführt. Ausführliche Literaturhinweise findet man in mehreren Zusammenfassungen [2-6].

[1] R. Caputto, L. F. Leloir, C. E. Cardini u. A. C. Paladini, J. Biol. Chemistry 184, 333 (1950).

[2] A. Kornberg, Advances in Enzymol. 18, 191 (1957).

[3] L. F. Leloir u. C. E. Cardini in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York 1960, Bd. II, Kap. 2.

[4] M. F. Utter in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York 1960, Bd. II, Kap. 4.

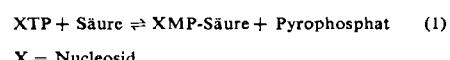
[5] E. P. Kennedy in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York 1960, Bd. II, Kap. 3.

[6] J. L. Strominger, Physiol. Rev. 40, 55 (1960).

Adenosin-nucleotide

Unter den Adenosin-nucleotiden sind vor allem die Redox-Coenzyme Diphospho-pyridinnucleotid (DPN), Triphospho-pyridinnucleotid (TPN) und Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) zu nennen.

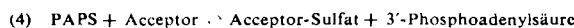
Jede dieser Verbindungen kann – wie die meisten anderen – als Anhydrid eines Mononucleotids, d. h. einer substituierten Phosphorsäure, mit einer zweiten Säure aufgefaßt werden. So ist DPN das Anhydrid aus Adenylsäure und Nicotinamidribosolphat; FAD ist das Anhydrid aus Adenylsäure und Riboflavinphosphat. Gebildet werden diese Substanzen vor allem durch Reaktion eines Nucleosidtriphosphates (Adenosintriphosphat im Fall der Adenosin-nucleotide) mit der zweiten Säure (Gleichung 1).



Die Reaktion zwischen ATP und Riboflavinphosphat führt so unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat zum Anhydrid Flavin-adenin-dinucleotid (FAD). Diesen Syntheseweg (Substitution des Pyrophosphatrestes in einem Nucleosidtriphosphat durch die zweite Säure) entdeckte Kornberg [2] bei seinen Untersuchungen über den DPN-Stoffwechsel.

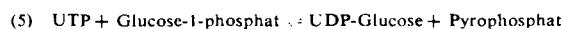
Außer in Form der Redox-Coenzyme spielen Adenosin-nucleotide bei der Aktivierung einiger Verbindungen, z. B. der Aminosäuren, eine Rolle. Adenyl-aminoäuren sind in den letzten Jahren isoliert und synthetisiert worden, und sie gelten als Zwischenprodukte bei der Proteinbiosynthese. Anorganisches Sulfat wird in gleicher Weise aktiviert: Produkt der Primärreaktion mit ATP ist Adenylsulfat (Gleichung 2). Doch liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion weit auf der linken Seite. In der lebenden Zelle wird es durch Phosphorylierung des Adenylsäure-Restes verlagert (Gleichung 3). Das Produkt, „aktiviertes Sulfat“, ist 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS). Diese Verbindung wirkt als Sulfat-Überträger bei der Biosynthese des Chondroitin-

sulfates und anderer natürlich vorkommender Schwefelsäure-ester [7] (Gleichung 4).



Uridin-nucleotide [3,6]

Bei den Uridin-nucleotiden handelt es sich um Anhydride aus Uridylsäure und Zuckerphosphaten, d. h. um UDP-Zucker-Verbindungen (Gleichung 5). Man kennt eine große Zahl derartiger Stoffe. Im Stoffwechsel nehmen sie an Transglykosidierungen teil (Gleichung 6) und wirken als Coenzyme bei der Umwandlung eines Zuckers in einen anderen.



Guanosin-nucleotide [4,6]

Auch die Guanosin-nucleotide dienen zur Aktivierung von Zuckern, doch wurde diese Gruppe bisher nicht sehr ausführlich untersucht. Erst vor kurzem ist – nach Isolierung einiger neuer Vertreter dieser Substanzklasse – das Interesse an diesen Verbindungen wieder erwacht. Am längsten kennt man die Guanosin-diphosphomannose [8] (GDP-Mannose), doch ist ihre Rolle im Stoffwechsel noch immer ungeklärt. Vermutlich wirkt sie als Zwischenprodukt bei der Synthese mannose-haltiger Polysaccharide. GDP-D-Mannose ist auch Vorstufe der GDP-L-Fucose [9]. Fucose (6-Desoxy-L-galaktose) ist ein wichtiger Bestandteil der Blutgruppensubstanzen und vieler anderer Polysaccharide. GDP-D-Mannose kann weiter in GDP-Colitose [10] umgewandelt werden. Colitose ist eine 3,6-Bisdesoxy-hexose (3,6-Bisdesoxy-L-galaktose) und tritt in den O-Endotoxinen mehrerer gramnegativer Bakterien auf, beispielsweise in den O-Endotoxinen einiger pathogener *E. coli*-Stämme, welche die infantile Diarrhoe verursachen. Die Synthese der O-Endotoxine und ihrer Vorstufen wird gegenwärtig sehr intensiv erforscht.

Cytidin-nucleotide

Verbindungen, die als Derivate der Cytidylsäure aktiviert werden, sind mit einer Ausnahme Alkohole [5,6]. Zu ihnen gehört das Cholin (Gleichung 7). CDP-Cholin ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Synthese der Phospholipide (Gleichung 8) [5]. Es ist bemerkenswert, daß dabei nicht der Cholinrest, sondern ein Phosphocholinrest übertragen wird, so daß neben dem Phospholipid Cytidin-monophosphat (CMP) entsteht. Reaktion (8) unterscheidet sich also von den synthetischen Reaktionen der Uridin-nucleotide (Gleichung 6), bei

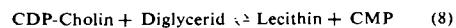
[7] F. Lipmann, Science [Washington] 128, 575 (1958).

[8] E. Cabib u. L. F. Leloir, J. biol. Chemistry 206, 779 (1954).

[9] V. Ginsburg, J. biol. Chemistry 235, 2196 (1960).

[10] E. C. Heath, Biochim. biophysica Acta 39, 377 (1960).

denen das Nucleotid nur den Zuckerrest abgibt und UDP als zweites Produkt bildet.



Ähnlich wie Cholin wird Äthanolamin für die Synthese der Äthanolaminlipide aktiviert. Auch bei der Synthese der Inositlipide tritt ein Cytidin-nucleotid als Zwischenprodukt auf, doch ist der Reaktionsverlauf hier etwas komplizierter als bei der Synthese der Cholin- und Äthanolaminlipide [11]. Aus Bakterien konnten CDP-Glycerin und CDP-Ribit isoliert werden [12]. Sie sind vermutlich für die Biosynthese von Komponenten der bakteriellen Zellwand und für die Synthese anderer bakterieller Heteropolymere von Bedeutung. Ein Nucleotid ungewöhnlicher Zusammensetzung ist die CMP-N-Acetylneuraminsäure [13].

Desoxyribonucleotide

Ähnliche Derivate der in Desoxyribonucleinsäure enthaltenen Nucleotide konnten kürzlich isoliert werden, doch sind bis heute nur wenige Verbindungen dieser Art bekannt. Zuerst fand man Desoxy-CDP-Cholin und Desoxy-CDP-Äthanolamin [14, 15]. Neuerdings gelang die Isolierung von Thymidin-diphosphozuckern, z. B. TDP-L-Rhamnose [16, 17], TDP-D-Fucose [18, 19], TDP-6-Desoxy-D-glucose [18, 19], TDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose [19, 20] und TDP-Mannose [21]. Die chemische Verwandtschaft dieser Verbindungen mit der Desoxyribonucleinsäure legt die noch ungeklärte Frage nahe, ob sie in irgendeiner funktionellen Beziehung zum genetischen Material stehen.

II. Reaktionen der Nucleotide

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß viele kleine Moleküle für synthetische Reaktionen aktiviert werden, indem sie Nucleotid-Derivate bilden. Säuren werden in Form der Adenosin-nucleotide aktiviert, Zucker (Aldehyd) in Form der Guanosin-, Uridin- oder Thymidin-nucleotide und Alkohole in Form der Cytidin- oder Desoxycytidin-nucleotide.

[11] H. Paulus u. E. P. Kennedy, J. biol. Chemistry 235, 1303 (1960).

[12] J. Baddiley, Proc. chem. Soc. [London] 177 (1959).

[13] D. G. Comb u. S. Roseman, J. Amer. chem. Soc. 80, 497 (1958).

[14] Y. Sugino, J. Amer. chem. Soc. 79, 5074 (1957).

[15] W. C. Schneider u. J. Rotherham, J. biol. Chemistry 233, 948 (1958).

[16] R. Okazaki, Biochem. biophysical Res. Commun. 1, 34 (1959).

[17] R. Okazaki, Biochim. biophysica Acta 44, 478 (1960).

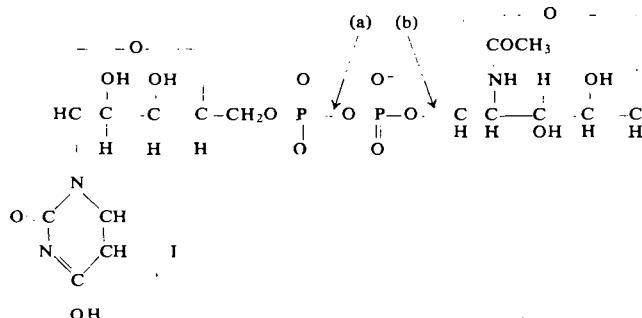
[18] J. L. Strominger u. S. S. Scott, Biochim. biophysica Acta 35, 582 (1959).

[19] R. Okazaki, T. Okazaki, J. L. Strominger u. A. M. Michelson, unveröffentlicht.

[20] R. Okazaki, T. Okazaki u. J. L. Strominger, Fed. Proc. 20, 906 (1961).

[21] J. Baddiley u. N. L. Blumson, Biochim. biophysica Acta 39, 376 (1960).

Formel I zeigt die Struktur eines solchen Nucleotids, des Uridindiphospho-N-acetylglucosamins [22]. Im Stoffwechsel dient dieses Nucleotid zur Synthese von Polysacchariden, die – wie z. B. die Hyaluronsäure – N-Acetylglucosamin enthalten. Die Säureanhydrid-Bindung (a) entsteht bei der Reaktion des Nucleosid-triphosphates mit dem Zuckerphosphat. Die Esterbindung (b) wird bei der Übertragung des Zuckerrestes auf die wachsende Polysaccharidkette gespalten. Man kann



also sagen, daß der Zuckerteil des Moleküls (I) durch den Nucleosiddiphosphat-Teil so aktiviert wird, daß er für biochemische Synthesen verwendet werden kann.

Viele Zucker werden auf diese Weise aktiviert. Eine Übersicht der mit UDP-Glucose in Beziehung stehenden UDP-Zucker gibt das Schema 1.

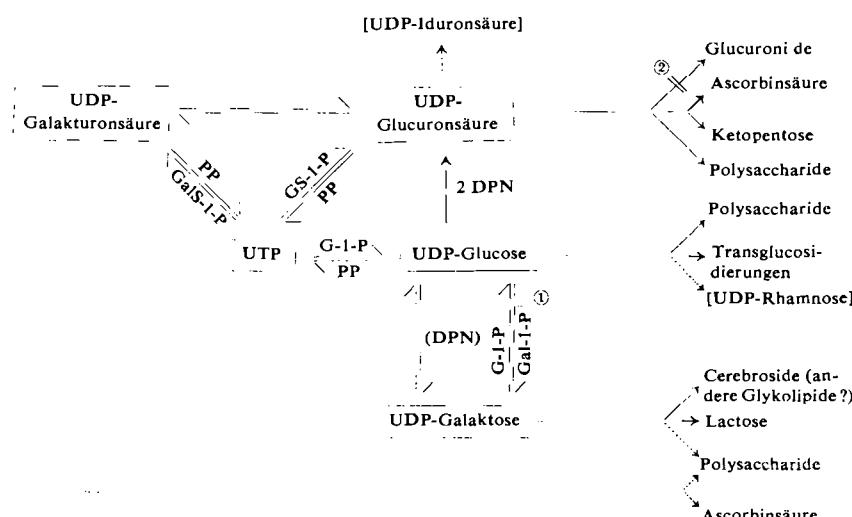
Reaktionen teilzunehmen. Beispielsweise wird UDP-Glucuronsäure zur Synthese von Glucuroniden verwendet. UDP-Glucose ist ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese des Rohrzuckers in Pflanzen (vgl. Gleichung 6), und in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß Glykogen in vivo nicht direkt aus Glucose-1-phosphat, sondern auf dem Umweg über UDP-Glucose entsteht. UDP-Galaktose spielt bei der Bildung von Lactose und den im Gehirn vorkommenden Cerebrosiden eine Rolle. Ohne Zweifel besitzt auch UDP-Galakturonsäure wichtige Funktionen im Stoffwechsel, doch sind diese noch nicht genau bekannt.



Es gibt beim Menschen zwei angeborene Störungen im Stoffwechsel der Uridin-nucleotide: die congenitale Galaktosämie (Unfähigkeit des Organismus, aus UDP-Glucose und Galaktose-1-phosphat UDP-Galaktose zu bilden; (1) im Schema 1) und die congenitale, nicht hämolytische Bilirubinämie (Unfähigkeit zur Übertragung von Glucuronsäure von der UDP-Glucuronsäure auf Bilirubin; (2) im Schema 1).

Glucuronidbildung

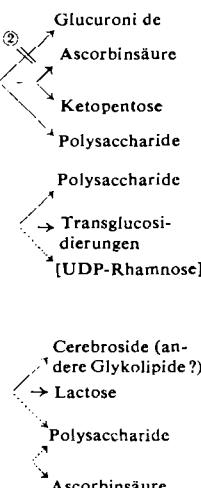
Viele Arzneimittel, körperfremde organische Stoffe und normale Metabolite werden mit Glucuronsäure konjugiert, bevor der Körper sie ausscheidet. Die Biosynthese



Schema 1. Reaktionen der mit UDP-Glucose in Beziehung stehenden UDP-Zucker. UDP = Uridin-diphosphat – UTP = Uridin-triphosphat – PP = Pyrophosphat – G-1-P = Glucose-1-phosphat – Gal-1-P = Galaktose-1-phosphat – GS-1-P = Glucuronsäure-1-phosphat – Gals-1-P = Galakturonsäure-1-phosphat – DPN = Diphosphopyridinnucleotid. – (1) · Stoffwechselstörung bei congenitaler Galaktosämie – (2) · Stoffwechselstörung bei congenitaler, nicht hämolytischer Bilirubinämie.

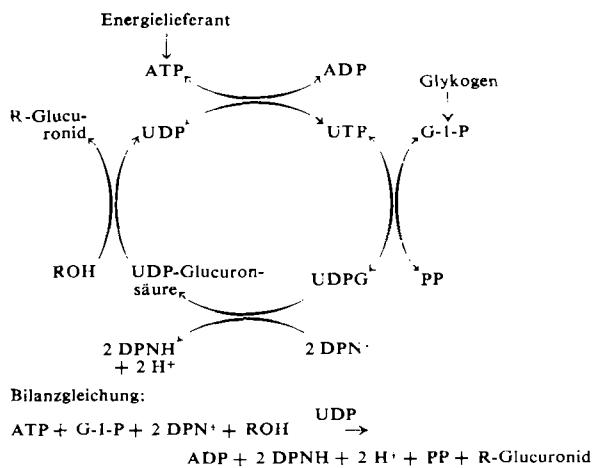
Eine Primärreaktion in diesem Schema ist die Umsetzung von Glucose-1-phosphat mit Uridintriphosphat (UTP) zu UDP-Glucose und Pyrophosphat (siehe auch Gleichung 5). Einmal in Form seines Nucleotids aktiviert, kann der Glucoserest mehrfach abgewandelt werden: es können sich UDP-Glucuronsäure, UDP-Galakturonsäure und UDP-Galaktose bilden, und jedes dieser zuckerhaltigen Nucleotide vermag an synthetischen

[22] E. Cabib, L. F. Leloir u. C. E. Cardini, J. biol. Chemistry 203, 1055 (1953).



solcher Glucuronide ist ein gutes Beispiel für einen Reaktionsszyklus, wie er für die genannten Nucleotide typisch ist (Schema 2): Zunächst entsteht Uridintriphosphat aus Uridindiphosphat und ATP. Glucose-1-phosphat wird dann durch Reaktion mit UTP aktiviert, die Zuckerkomponente des Nucleotids wird verändert, hier durch Oxydation zur Glucuronsäure, und wird schließlich auf einen Acceptor übertragen (z. B. auf Bilirubin unter Bildung des Glucuronids). Das freigesetzte UDP reagiert wieder mit ATP zum UTP. Die wesentlichen Schritte dieses Cyclus sind also: 1. Phosphorylierung, 2. Aktivierung des Zuckers, 3. Modifizierung des Zuckers, 4. Übertragung auf einen Acceptor.

Die Bildung von UDP-Glucuronsäure aus UDP-Glucose (Gleichung 9) ist eine der zwei bis heute bekannt gewordenen



Schema 2. Reaktionen bei der Glucuronidsynthese. ATP = Adenosintriphosphat — ADP = Adenosindiphosphat — UDP = Uridindiphosphat — UTP = Uridintriphosphat G-I-P = Glucose-1-phosphat PP = Pyrophosphat — UDPG = Uridin-diphosphoglucose — DPN = Diphospho-pyridinnucleotid DPNH = reduziertes Diphospho-pyridinnucleotid

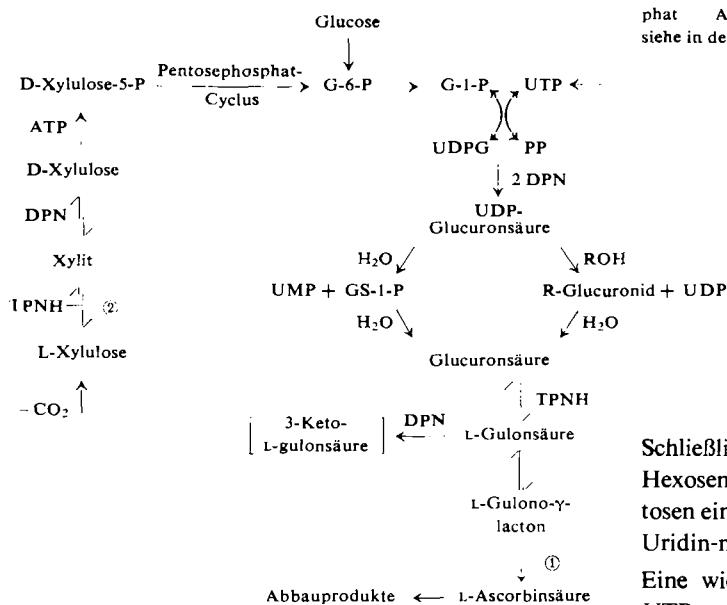
Redoxreaktionen, die unter Übertragung von vier Elektronen vor sich gehen [23].



Das zweite Beispiel eines Vier-Elektronen-Überganges ist die enzymatische Oxydation des Aminoalkohols Histidinol zur Aminosäure Histidin [24]. Bei allen anderen biologischen Oxydationen werden entweder ein oder zwei Elektronen übertragen.

Glucuronsäure-Cyclus

Neben ihrer Rolle als Donator von Glucuronsäure bei der Glucuronidsynthese hat die UDP-Glucuronsäure noch eine weitere Funktion im Stoffwechsel: sie ist die Vorstufe der freien Glucuronsäure, die zur Synthese der



Schema 3. Glucuronsäure-Cyclus des Glucoseabbaus. G-6-P = Glucose-6-phosphat — UMP = Uridin-monophosphat — TPNH = reduziertes Triphospho-pyridinnucleotid — Weitere Abkürzungen siehe in den Legenden zu Schema 1 und 2

[23] J. L. Strominger, E. S. Maxwell, J. Axelrod u. H. M. Kalckar, J. biol. Chemistry 224, 79 (1957).

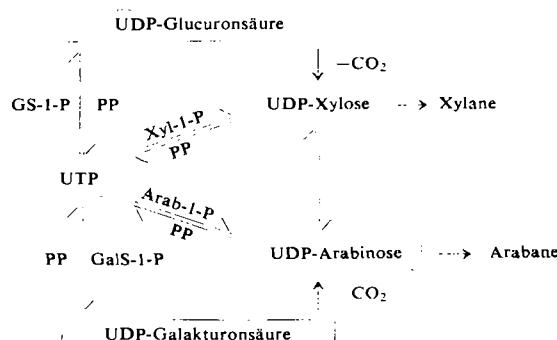
[24] E. Adams, J. biol. Chemistry 217, 325 (1955).

Ascorbinsäure dient und die für einen dritten Weg des Glucoseabbaus benötigt wird. Dieser dritte Weg ist als Uridin-nucleotid- oder Glucuronsäure-Cyclus bekannt. Man findet ihn im Stoffwechsel des Menschen und der Tiere. Einen Überblick gibt das Schema 3.

Auch hier gibt es zwei Defekte. Der eine, (1) im Schema 3, besteht in der Unfähigkeit, Ascorbinsäure zu synthetisieren, weil die dafür benötigten Enzyme fehlen. Diese Unfähigkeit findet man beim Menschen, Affen und Meerschweinchen. Die zweite, gutartige Störung, als congenitale Pentosurie bezeichnet, besteht in der Unfähigkeit L-Xylulose in Xylit umzuwandeln, (2) im Schema 3. Als Folge dieser Störung werden große Mengen L-Xylulose mit dem Urin ausgeschieden, die sich in der hier gezeigten Weise aus freier Glucuronsäure bilden.

Pflanzliche Uridin-nucleotide

Auch Pflanzen können Zucker in Form von Nucleotid-Derivaten aktivieren. Schema 4 zeigt die Bildung der Pentose-Derivate UDP-Xylose und UDP-Arabinose, die Vorstufen der Xylane und Arabane sind und damit zur Synthese wichtiger Bestandteile vieler Pflanzen dienen [25].



Schema 4. Uridin-diphosphopentosen Xyl-1-P = Xylose-1-phosphat Arab-1-P = Arabinose-1-phosphat. Weitere Abkürzungen siehe in den Legenden zu Schema 1 und 2

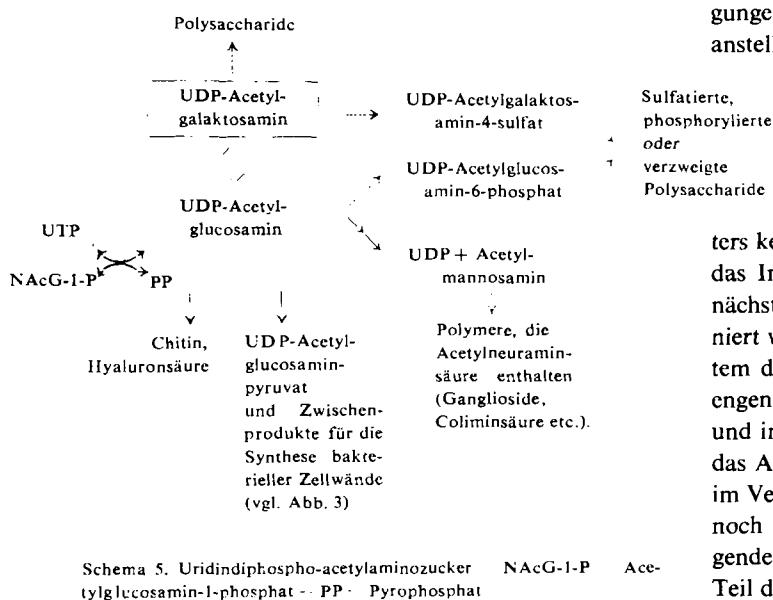
UDP-Acetylaminozucker

Schließlich bilden die Acetylaminozucker neben den Hexosen und Hexuronsäuren sowie neben den Pentosen eine dritte Gruppe von Zuckern, die in Form ihrer Uridin-nucleotide aktiviert werden (vgl. Schema 5).

Eine wichtige Reaktion ist die Umsetzung zwischen UTP und N-Acetylglucosamin-1-phosphat. Sie führt zum UDP-Acetylglucosamin, das mehrfach abgewandelt werden kann, vor allem zum UDP-Acetylgalaktosamin. Weitere, bisher noch ungeklärte Reaktionen ergeben das UDP-Acetylgalaktosamin-4-sulfat und das

[25] W. Z. Hassid, E. F. Neufeld u. D. S. Feingold, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 905 (1959).

UDP-Acetylglucosamin-6-phosphat [*], zwei ungewöhnliche Verbindungen, die aus dem Eileiter der Henne isoliert werden konnten. Alle diese Substanzen sind ebenso wie das UDP-Acetylglucosamin -- vermutlich Vorstufen verschiedener Polysaccharide einschließlich der Chondroitinsulfate und der Hyaluronsäure.



Bau und Funktion des Eileiters der Henne

Unsere Untersuchungen begannen mit der Isolierung von UDP-Acetylgalaktosamin-4-sulfat aus dem Eileiter legender Hennen [26]. Das als Uridin-nucleotid aktivierte Acetyl-galaktosamin-4-sulfat ist vermutlich Vorstufe einiger sulfatisierter Polysaccharide. Um Überlegungen über die mögliche Funktion dieser Verbindung anstellen zu können, muß man die Funktion des Eileiters kennen: Das Eigelb tritt aus der Bauchhöhle durch das Infundibulum in den Eileiter ein und gelangt zunächst in einen Abschnitt, in dem das Albumin sezerniert wird. Dieser Abschnitt ist mit etwa 20 cm bei weitem der längste. Aus ihm wandert das Ei in den sehr engen Isthmus, der bei der Henne etwa 2 cm lang ist und in dem die inneren Membranen der Eierschale um das Albumin gelegt werden. Die Membranen entstehen im Verlauf von ungefähr einer Stunde. Ihre Struktur ist noch unbekannt, aber sie enthalten mit Sicherheit irgendein sulfatiertes Polysaccharid. Im anschließenden Teil des Eileiters, dem Uterus, wird die Schale verkalkt,

| Abschnitt des Eileiters | Bau des Eileiters | Funktion des Abschnittes | $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ im Eileiter | $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ im Ei | UDP-GalNAc-SO ₄ im Eileiter |
|------------------------------|-------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Infundibulum | { | | | | |
| albumin-sezernierende Region | | Albumin-Bildung | 0 | 0 | 0 |
| Isthmus | { | Membran-Bildung | +++ | ++++ (Membranen) | ++++ |
| Uterus | | Verkalkung (Bildung der Schalenmatrix) | 0 | ? | 0 |
| Vagina | { | Bildung der Cuticula | +++ | ++ (Cuticula) | 0 |

Tabelle 1. Bau und Funktion des Eileiters der Henne

III. Struktur und Biosynthese sulfatisierter Polysaccharide

Nach dieser Einleitung können wir unsere Untersuchungen über die Synthese sulfatisierter Polysaccharide beschreiben, die zugleich einige interessante Einzelheiten über die Struktur der Chondroitinsulfate erbracht haben.

[*] Kürzlich wurde gefunden, daß UDP-Acetylglucosamin-6-phosphat [26] das Abbauprodukt eines Nucleotids ist, das im Eileiter der Henne vorkommt. Daß dieses Nucleotid UDP-Acetylglucosamin-6-phospho-1-O-galaktose ist, wurde unabhängig in zwei Laboratorien nachgewiesen [27, 28]. Der Galaktose-Rest in dieser Verbindung ist äußerst labil.

und im letzten Abschnitt, der Vagina, erhält das Ei die glatte äußere Oberfläche (Cuticula), unmittelbar bevor die Henne es legt. Um Stellen des Sulfatstoffwechsels im Eileiter nachzuweisen, wurde legenden Hennen anorganisches ^{35}S -Sulfat gegeben. Wir fanden es nur in zwei Abschnitten des Eileiters wieder: im Isthmus und in der Vagina. In beiden Abschnitten werden Membranen der Eischale synthetisiert (siehe Tabelle 1), und in beiden Regionen befindet sich der radioaktive Schwefel im Epithel. Auch die von diesen Hennen gelegten Eier wu-

[26] J. L. Strominger, Biochim. biophysica Acta 17, 283 (1955).

[27] S. Suzuki, unveröffentlicht.

[28] O. Gabriel u. G. Ashwell, unveröffentlicht.

den geprüft: sowohl die innere Schalenmembran als auch die Cuticula waren radioaktiv [29] (vgl. Tabelle 1). Als nächstes wurde das Vorkommen des UDP-N-Acetylgalaktosamin-sulfates im Eileiter untersucht. Es konnte nur im Isthmus nachgewiesen werden, findet sich dort aber in einer Konzentration von etwa $5 \mu\text{Mol/g}$ was für ein Nucleotid im Gewebe eine sehr hohe Konzentration ist. Extrahiert man den Isthmus mit heißem Wasser und chromatographiert, so ist das sulfatierte Uridin-nucleotid die einzige im Ultravioletten absorbierende Verbindung, die sich im Papierchromatogramm nachweisen lässt. Diese Ergebnisse ließen erwarten, daß der Isthmus hervorragend geeignet sein würde, um die Synthese sulfaterter Mucopolysaccharide zu studieren.

Sulfatierung von Polysacchariden

Etwa zur gleichen Zeit hatten Robbins und Lipmann [30] Phosphoadenosin-phosphosulfat (PAPS) isoliert. Es schien plausibel, daß PAPS der Sulfat-Donator bei der Synthese des UDP-Acetylgalaktosamin-sulfates sein und die Synthese in der direkten Sulfatierung des UDP-Acetylgalaktosamins bestehen könnte. ^{35}S -markiertes Phosphoadenosin-phosphosulfat wurde mit Enzymen aus dem Isthmus dargestellt und der Einbau von ^{35}S aus PAP ^{35}S in Chondroitinsulfat verfolgt in der Annahme, daß die Reaktion über das sulfatierte Uridin-nucleotid verläuft. Inkubiert man PAP ^{35}S lediglich mit Enzymen aus dem Isthmus, so besteht die Hauptreaktion in der

Tabelle 2. Synthese sulfaterter Mucopolysaccharide aus ^{35}S -Phosphoadenosin-phosphosulfat [31].

Ein Enzympräparat aus dem Isthmus vom Eileiter der Henne wurde mit PAP ^{35}S hoher spezifischer Aktivität und verschiedenen Sulfat-Acceptoren inkubiert [31]. Im Versuch 1 wurde die Bedeutung der Komponenten des Ansatzes für die Sulfat-Übertragung studiert, im Versuch 2 die relative Sulfatierungsgeschwindigkeit verschiedener Acceptor.

Versuch 1 (Chondroitinsulfat A als Acceptor)

| Inkubationsansatz: | Radioaktivität des Polysaccharids [Imp./min] |
|--|--|
| Vollständig | 3320 |
| Ohne Chondroitinsulfat A (erst nach der Inkubation zugefügt) | 30 |
| Ohne PAP ^{35}S (erst nach der Inkubation zugefügt) | 25 |
| Enzympräparat vor der Inkubation gekocht | 30 |
| Mit ^{35}S -Adenosinphosphosulfat statt PAP ^{35}S | 100 |

Versuch 2 (Verschiedene Acceptor)

| Acceptor | Radioaktivität des Polysaccharids [Imp./min] |
|--|--|
| Chondroitinsulfat A | 1750 |
| Chondroitinsulfat B | 1330 |
| Chondroitinsulfat C | 1060 |
| Heparitinsulfat | 1000 |
| Heparin, Hyaluronsäure, Glykogen oder Charoninsulfat | 40 bis 50 |

[29] J. L. Strominger u. S. Suzuki, unveröffentlicht.

[30] P. W. Robbins u. F. Lipmann, *J. biol. Chemistry* 233, 681, 686 (1958).

[31] S. Suzuki u. J. L. Strominger, *J. biol. Chemistry* 235, 257, 267, 274 (1960).

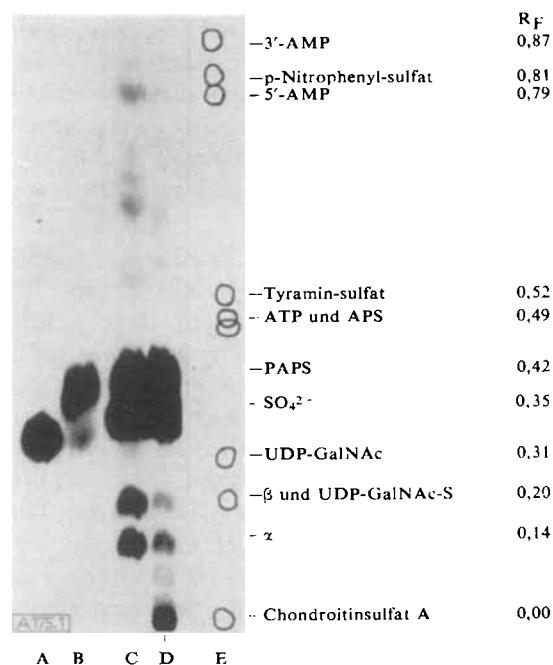


Abb. 1. Radioautogramme von Papierchromatogrammen verschiedener Ansätze mit PAP ^{35}S und einem Enzympräparat aus dem Isthmus vom Eileiter der Henne [31]. — A: Anorganisches Sulfat — B: PAP ^{35}S und vor der Inkubation gekochtes Enzympräparat — C: PAP ^{35}S und Enzympräparat — D: Wie C jedoch mit 50 μg Chondroitinsulfat A, das durch Hyaluronidase partiell hydrolysiert worden war. Die Substanz bei $R_F = 0$ ist das Polymer, Flecke zwischen $R_F = 0$ und 0,14 entsprechen sulfatierten Oligosacchariden. Wird das Polymer vor der Inkubation nicht mit Hyaluronidase behandelt, so findet man nur den Fleck bei $R_F = 0$. — E: Chromatogramm mit Vergleichssubstanzen — x und § sind nicht identifizierte Produkte.

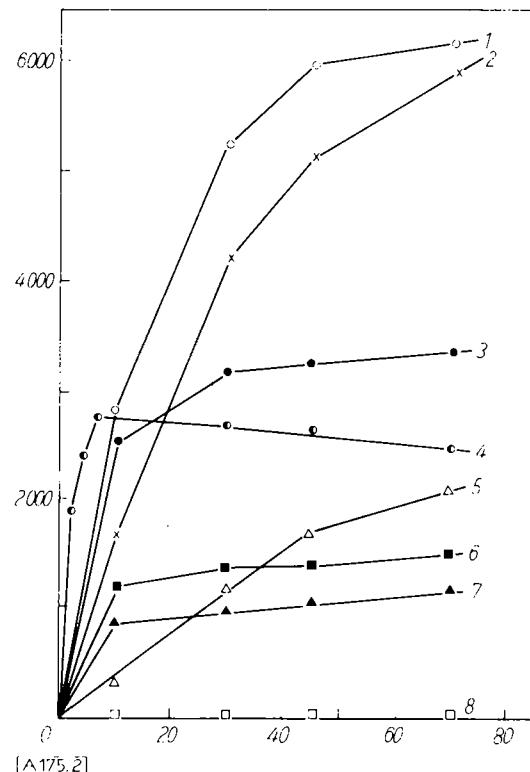


Abb. 2. Beziehung zwischen Acceptor-Konzentration und Sulfatierungsgeschwindigkeit. — Kurve 1: Chondroitinsulfat C — Kurve 2: Chondroitin aus der Hornhaut des Rinderauges — Kurve 3: Chondroitinsulfat A — Kurve 4: Chondroitinsulfat B — Kurve 5: Chondroitin, dargestellt durch chemische Ent sulfatierung von Chondroitinsulfat A. — Kurve 6: Heparitinsulfat — Kurve 7: Chondroitinsulfat aus Haifischknorpel — Kurve 8: Glykogen, Heparin, Keratosulfat, Hyaluronsäure oder Charoninsulfat.

Ordinate: Radioaktivität des Polysaccharids [Imp./min].
Abszisse: μg Acceptor/50 μl Inkubationsgemisch.

Hydrolyse des „aktivierten Sulfates“ zu anorganischem Sulfat. Fügt man dem Ansatz jedoch einen Acceptor hinzu, beispielsweise Chondroitinsulfat A, so findet man nach der Inkubation an der Startlinie im Papierchromatogramm einen neuen radioaktiven Fleck (Abb. 1), der als radioaktives Chondroitinsulfat identifiziert werden konnte [31] (Tabelle 2).

Folgende Polysaccharide wirken in diesem System als Sulfat-Acceptoren (vgl. Abb. 2): Chondroitin, Chondroitinsulfat A, B und C, Heparitinsulfat sowie schließlich ein Chondroitinsulfat, das in Japan aus Haifischknorpel gewonnen und für Chondroitinsulfat C gehalten worden war. Die Substanz unterscheidet sich jedoch in der scheinbaren Michaelis-Konstante K_M und im Wert von v_{max} vom Chondroitinsulfat C, und es ließ sich dann zeigen (siehe unten), daß sie in der Tat ein neues Chondroitinsulfat ist. – Man weiß heute, daß das Enzympräparat aus dem Eileiter-Isthmus mehrere Sulfotransferasen enthält, die für die Sulfatierung der verschiedenen Polysaccharide verantwortlich sind [32].

Verlauf der Sulfatierungsreaktion

Für den Verlauf der Sulfatierungsreaktion gab es zwei Möglichkeiten: Sulfat könnte zunächst von PAPS auf UDP-GalNAc unter Bildung des sulfatierten Uridinucleotids (UDP-GalNAc-S) übertragen werden (Gleichung 10), das dann mit dem Polysaccharid unter Übertragung des N-Acetylgalaktosaminsulfat-Restes reagiert (Gleichung 11).



Die andere Möglichkeit ist, daß der Sulfatrest vom PAPS direkt auf das Polysaccharid übertragen wird (Gleichung 12):



Es war nicht möglich, die Frage nach dem Reaktionsverlauf zu klären, solange polymere Sulfat-Acceptoren verwendet wurden, denn infolge des hohen Molekulargewichtes dieser Verbindungen ließ sich zwischen der Aufnahme von ^{35}S -Sulfat und der von Acetylgalaktosamin- ^{35}S -sulfat nicht unterscheiden. Wir studierten daher die Sulfatierung niedermolekularer Oligosaccharide, wie sie bei der enzymatischen Hydrolyse von Chondroitinsulfat A entstehen. Mit diesen Aczeptoren mußte es verhältnismäßig einfach sein, die Sulfatierungsprodukte papierchromatographisch zu identifizieren. Beispielsweise würde aus einem sulfat-freien Tetrasaccharid nach Gleichung (10) und (11) ein Pentasaccharid-monosulfat, nach Gleichung (12) dagegen ein Tetrasaccharid-monosulfat entstehen, die auf dem Papierchromatogramm leicht zu unterscheiden wären. Enzympräparat, PAP ^{35}S und verschiedene Oligosaccharide wurden also miteinander inkubiert und der Ansatz anschließend chromatographiert. In jedem Fall war die chromatographische Beweglichkeit des radioaktiven Produktes

[32] S. Suzuki, R. H. Threnn u. J. L. Strominger, Biochim. biophysica Acta 50, 169 (1961).

geringer als die des Acceptors. Das Produkt wurde eluiert und sowohl papierchromatographisch als auch papierelektrophoretisch mit authentischen Präparaten verglichen. Dabei zeigte es sich, daß die Sulfatierungsreaktion in jedem Fall in der einfachen Übertragung des Sulfatrestes von PAPS auf das Oligosaccharid (entsprechend Gleichung 12) bestanden hat. Auch Acetylgalaktosamin und Acetylgalaktosamin-monosulfat werden so sulfatiert. Es entstehen Acetylgalaktosamin-monosulfat bzw. Acetylgalaktosamin-disulfat (Abb. 3).

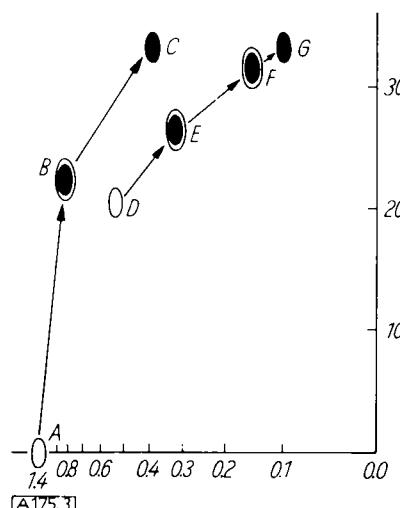


Abb. 3. Sulfatierung von Mono- und Tetrasacchariden [31]. Die Abbildung zeigt die Position der sulfatierten Verbindungen im Papierchromatogramm (Abszisse) und auf dem Elektropherogramm (Ordinate). Papierchromatogramm mit Butanol/Eisessig/Wasser entwickelt. Offene Kreise: als Acceptor eingesetzt; schwarze Kreise: als Produkt isoliert. Die Pfeile deuten den Zusammenhang zwischen Acceptor und Produkt an. A: N-Acetylgalaktosamin – B: N-Acetylgalaktosamin-monosulfat

C: N-Acetylgalaktosamin-disulfat – D: Tetrasaccharid – E: Tetrasaccharid-monosulfat – F: Tetrasaccharid-disulfat – G: Tetrasaccharid-trisulfat.

Ordinate: Laufstrecke im Elektropherogramm [cm]. Abszisse: Rf-Wert (chromatographische Beweglichkeit relativ zur Glucuronsäure).

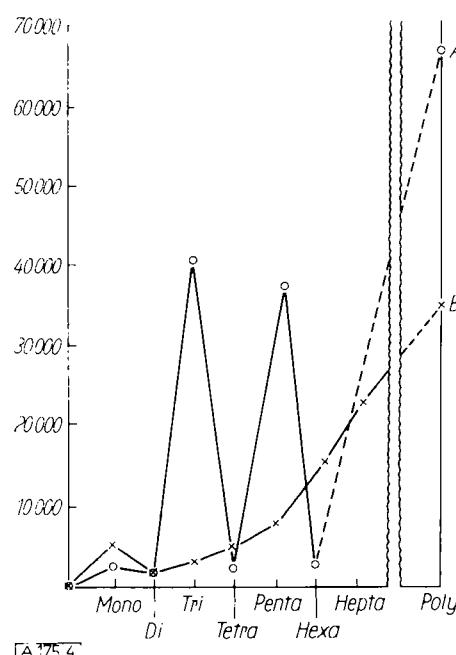


Abb. 4. Zusammenhang zwischen Sulfatierungsgeschwindigkeit und Kettenlänge des Acceptors. -o-o- sulfat-freie Acceptor — -x-x- sulfatierte Acceptor — A: Chondroitin — B: Chondroitinsulfat A. Ordinate: Radioaktivität/0,4 μMol Hexosamin [Imp./min]. Abszisse: Polymerisationsgrad des Acceptors.

Die relative Sulfatierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Acceptors zeigt Abb. 4.

Man erkennt, daß nur die Geschwindigkeit der Sulfatierung von Tri- und Pentasaccharid (GalNAc-GS-GalNAc bzw. GalNAc-GS-GalNAc-GS-GalNAc) [*] der Geschwindigkeit vergleichbar ist, mit der das Polymer sulfatiert wird. Diese Beobachtung könnte von Bedeutung sein. Alle Oligosaccharide mit geradzahligem Polymerisationsgrad enthalten Glucuronsäure am nicht-reduzierenden Ende der Kette. Die Oligosaccharide mit ungeradzahligem Polymerisationsgrad wurden daraus durch Abspaltung von Glucuronsäure mit β -Glucuronidase gewonnen, so daß am nicht reduzierenden Ende ihrer Kette ein N-Acetylgalaktosamin-Rest steht. Offenbar können Polysaccharide also durch Übertragung eines Sulfatrestes auf einen Acetylgalaktosaminrest

scheiden. Es ergab sich, daß die bei der Hydrolyse des Uridin-nucleotids entstehende Verbindung N-Acetylgalaktosamin-4-sulfat, die mit Chlorsulfonsäure synthetisierte Verbindung N-Acetylgalaktosamin-6-sulfat ist. Wir hydrolysierten dann mehrere sulfatierte Polysaccharide und isolierten die N-Acetylgalaktosamin-monosulfate. Durch Vergleich mit den uns zugänglichen authentischen Präparaten konnten wir zeigen, daß aus Chondroitinsulfat A und B N-Acetylgalaktosamin-4-sulfat entsteht, während man bei der Hydrolyse von Chondroitinsulfat C das 6-Sulfat erhält. Wir konnten so durch direkte chemische Isolierung bestätigen, was andere Autoren früher aus ihren andersartigen Untersuchungen geschlossen hatten (siehe Tabelle 3).

Weiterhin erwuchs aus diesen Untersuchungen der Nachweis eines neuen Chondroitinsulfates, das wir

Tabelle 3. Identifizierung der N-Acetylgalaktosamin-monosulfate [33]

| Substanz | R_F in Isobuttersäure/ NH_3 | Mol HCHO/Mol Hexose [*] | ϵ_{585} nach Morgan-Elson-Reaktion | IR-Spektrum [**] [cm^{-1}] |
|--|---------------------------------|-------------------------|---|--------------------------------|
| GalNAc-4-S aus Uridin-nucleotid | 0,52 | 0,92 | 200 | 695; 860; 890; 920 |
| GalNAc-6-S chemisch synthetisiert | 0,44 | 0,05 | 10000 | 775; 820; 992 |
| GalNAc-S aus Chondroitinsulfat A (Spur bei 0,44) | 0,53 | 0,62[+] | 1800[+] | 695; 860; 890; 920 |
| GalNAc-S aus Chondroitinsulfat B | 0,52 | 0,75[+] | 1120[+] | 695; 860; 890; 920 |
| GalNAc-S aus Chondroitinsulfat D | 0,44 | 0,03 | 10000 | 780; 815; 992 |

sulfatiert werden, der am nicht-reduzierenden Ende der wachsenden Kette steht. Doch bleibt die Rolle des sulfatierten Uridin-nucleotids zu klären, und es mag sein, daß es für die Einführung von Zucker- und Sulfatresten in Polysaccharidketten mehrere Mechanismen gibt.

Zur Struktur der Chondroitinsulfate

Aus diesen enzymatischen Untersuchungen ergaben sich zwei interessante Folgerungen über die Struktur der Chondroitinsulfate. Wie erinnerlich, ist auch N-Acetylgalaktosamin ein Sulfat-Acceptor. Bei der Sulfatierung entsteht ein N-Acetylgalaktosamin-monosulfat, das elektrophoretisch mit einer Verbindung identisch ist, die man bei der Hydrolyse des UDP-Acetylgalaktosamin-sulfates oder durch chemische Sulfatierung von N-Acetylgalaktosamin mit Chlorsulfonsäure erhält. Papierchromatographisch sind dagegen nur das durch enzymatische Sulfatierung und das durch Hydrolyse des Uridin-nucleotids erhaltene Acetylgalaktosamin-sulfat identisch, während das mit Chlorsulfonsäure synthetisierte Produkt langsamer wandert.

Die Struktur dieser N-Acetylgalaktosamin-sulfate wurde untersucht [33]. Durch Perjodat-Oxydation läßt sich an Hand des Perjodat-Verbrauches und der Formaldehyd-Bildung zwischen den möglichen Isomeren unter-

[*] Nach Perjodat-Oxydation bei 25°C (20 Stunden.) GalNAc-4-S verbraucht dabei 1 Mol, GalNAc-6-S 4 Mol Perjodat.

[**] Banden zwischen 660 und 1000 cm^{-1} .

[+] Diese Werte lassen vermuten, daß die Substanzen GalNAc-4-S sind aber 10 bis 15 % GalNAc-6-S enthalten.

Chondroitinsulfat D genannt haben. Egami und Mitarbeiter isolierten diese Verbindung in Japan zuerst aus Haifischknorpel [34]. Es wurde bereits erwähnt, daß sie sich als Acceptor für die Sulfotransferase vom Chondroitinsulfat C unterscheidet. Außerdem enthält sie etwa 22 % Sulfat, d. h. 1,3 Sulfat-Reste pro Acetylgalaktosamin-Einheit. Um die Struktur dieser Verbindung zu untersuchen, spaltete Suzuki [35] sie mit einem Enzym aus *Proteus vulgaris* [36]. Dieses Enzym katalysiert den praktisch quantitativen Abbau von Chondroitinsulfaten zu Disacchariden. Da es sich dabei um eine Eliminierungsreaktion und nicht um eine Hydrolyse handelt, erhält man Δ^4 -ungesättigte Disaccharide [35]. Bei der papierchromatographischen Trennung der Abbauprodukte verschiedener Chondroitinsulfat-Präparate ergab sich, daß Chondroitinsulfat D eine Verbindung liefert, die weder beim Abbau von Chondroitinsulfat A noch beim Abbau von Chondroitinsulfat C entsteht. In kleiner Menge bildet sich ein ähnliches Produkt beim Abbau von Chondroitinsulfat B. Beide Verbindungen ließen sich papierchromatographisch trennen. Wahrscheinlich sind es Isomere. Sie enthalten zwei

[34] T. Soda, F. Egami u. T. Horigome, J. chem. Soc. [Japan] 61, 43 (1940).

[35] S. Suzuki, J. biol. Chemistry 235, 3580 (1960).

[36] K. S. Dodgson u. A. G. Lloyd, Biochem. J. 68, 88 (1958).

Sulfat-Reste pro Disaccharid-Einheit, was in einer sehr hohen elektrophoretischen Beweglichkeit zum Ausdruck kommt (Abb. 5).

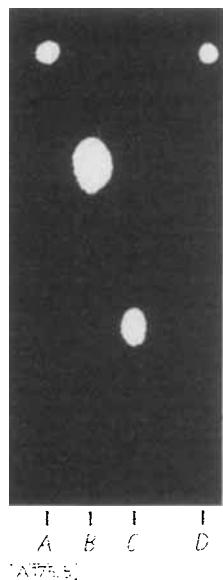


Abb. 5. Relative elektrophoretische Beweglichkeiten der ungesättigten Disaccharide aus Chondroitinsulfat D und B [36].

- A: ungesättigtes Disacchariddisulfat aus Chondroitinsulfat D
 B: ungesättigtes Disaccharid-6-monosulfat
 C: sulfat-freies ungesättigtes Disaccharid
 D: ungesättigtes Disaccharid-disulfat aus Chondroitinsulfat B

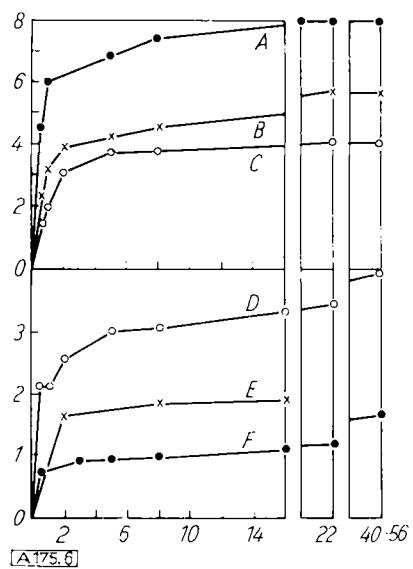
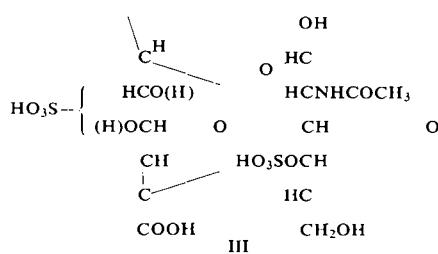
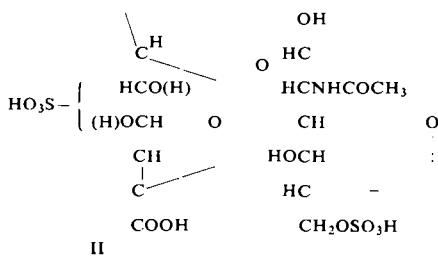


Abb. 6. Geschwindigkeit der Periodat-Oxydation ungesättigter Disaccharide [36]. Kurve A: sulfat-freies ungesättigtes Disaccharid — Kurve B: ungesättigtes Disaccharid-4-sulfat — Kurve C: ungesättigtes Disaccharid-6-sulfat — Kurve D: ungesättigtes Disaccharid-monosulfat aus Chondroitinsulfat D -- Kurve E: ungesättigtes Disaccharid-disulfat aus Chondroitinsulfat B — Kurve F: ungesättigtes Disaccharid-disulfat aus Chondroitinsulfat D. -- Bemerkenswert ist der geringe Perjodat-Verbrauch der Disulfate (Kurven E und F) verglichen mit dem Perjodat-Verbrauch der Monosulfate (Kurven B bis D) und des sulfat-freien Disaccharids (Kurve A).

Ordinate: Mol Perjodat/Mol Disaccharid.
Abszisse: Zeit [Stunden].

Aus anderen Befunden geht hervor, daß in beiden Verbindungen ein Sulfat-Rest an C-2 oder C-3 der Uronsäure steht. Beispielsweise verbrauchen die Disacchariddisulfate sehr viel weniger Perjodat als die Monosulfate, was auf eine Substitution am Glucuronsäure-Rest deutet (Abb. 6).

Der zweite Sulfat-Rest befindet sich in beiden Fällen am Acetylgalaktosamin-Teil des Moleküls. Das aus Chondroitinsulfat D entstehende Disaccharid ist ein Derivat des N-Acetylgalaktosamin-6-sulfates (II), während das Disaccharid aus Chondroitinsulfat B den zweiten Sulfat-Rest an C-4 des Acetylgalaktosamins tragen könnte (III).



IV. Schluß

Es dürfte deutlich geworden sein, daß die Frage, wie Uridin-nucleotide und andere Nucleotide an der Biosynthese sulfatierter Mucopolysaccharide beteiligt sind, nicht leicht zu lösen ist. Sulfatierte Mucopolysaccharide können die Sulfatreste an mindestens vier Stellen tragen: an C-4, C-6 oder am N des Aminozuckers sowie an der Uronsäure. Sie können außerdem verschiedene Zucker enthalten. Ohne Zweifel gibt es sowohl für den Einbau der Sulfat-Reste als auch für den Einbau der Zucker in die Polysaccharid-Kette mehrere Mechanismen. Hinsichtlich des Syntheseverlaufs einerseits und der Struktur der Polysaccharide andererseits wird man sicherlich noch Überraschungen zu erwarten haben. Es ist zu hoffen, daß die Entdeckung einiger Nucleotid-Zwischenprodukte rasche Fortschritte in der Aufklärung der Biosynthese von Chondroitinsulfaten und anderen biologisch wichtigen Heteropolymeren ermöglicht.

Übersetzt von Dr. H. Grünwald, Heidelberg

Eingegangen am 29. September 1961 [A 175]