

viele gemeinsame Strukturmerkmale; der augenfälligste Unterschied ist das in die Re2-C3-Bindung inserierte Schwefelatom S3 (Re2-S3 2.452(2) Å). Auch die C2-C3-Bindung von **3b** ist kurz (1.38(1) Å), jedoch ebenfalls der C3-S3-Abstand (1.676(8) Å). Dieser ist damit sogar noch kleiner als die C-S-Abstände in der Dithiocarboxylat-Gruppe (1.713(7) Å und 1.702(7) Å) und hat somit einen gewissen Doppelbindungscharakter.

In zunehmendem Maße beschäftigen sich Untersuchungen mit der Oxygenierung von organischen Liganden in Metallkomplexen durch Atom-Transfer-Reaktionen^[7]. Uns sind allerdings keine Untersuchungen bekannt, in denen sowohl Sauerstoff- als auch Schwefelatome in denselben Übergangsmetall-Kohlenstoff-Bindungstyp inseriert werden konnten.

Experimentelles

2: 100.0 mg (0.139 mmol) **1** und 100.0 µL (1.660 mmol) CS₂ wurden in 200 mL Dichlormethan gelöst und unter Rückfluß für 4 h erhitzt. Das Produkt wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel) isoliert. 82.8 mg **2** (orange, 78%). IR (Hexan): $\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O}) [\text{cm}^{-1}] = 2098 (\text{w}), 2008 (\text{s}), 1995 (\text{m}), 1959 (\text{s}), 1582 (\text{w})$; ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 11.65 (\text{s}, 1 \text{H}, \text{CH}), 4.09 (\text{s}, 3 \text{H}, \text{OMe})$; MS: $m/z = 758 (M^+, ^{187}\text{Re})$, Ionen, die der Abspaltung der acht Carbonylliganden entsprechen; korrekte Elementaranalyse.

3a: 20.0 mg (0.026 mmol) **2** ließ man mit 3.0 mg (0.032 mmol) Pyridin-N-oxid in 30 mL Dichlormethan bei 25 °C 20 min lang reagieren. Das Produkt wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel) isoliert. 19.8 mg **3a** (gelb, 97% Ausbeute). IR (Hexan): $\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O}) [\text{cm}^{-1}] = 2120 (\text{vw}), 2101 (\text{w}), 2018 (\text{s}), 2002 (\text{s}), 1991 (\text{s}), 1958 (\text{s}), 1605 (\text{m})$; ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 9.64 (\text{s}, 1 \text{H}, \text{CH}), 3.92 (\text{s}, 3 \text{H}, \text{OMe})$; MS: $m/z = 774 (M^+, ^{187}\text{Re})$, Ionen, die der Abspaltung von sechs Carbonylliganden entsprechen; korrekte Elementaranalyse.

3b: 20.0 mg (0.026 mmol) **2** ließ man mit 20.0 µL (0.336 mmol) C₂H₄S in 20 mL Hexan bei 25 °C über 3 h reagieren. Das Produkt wurde dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel) isoliert. 10.2 mg **3b** (orange, 50% Ausbeute). IR (Hexan): $\tilde{\nu}(\text{C}=\text{O}) [\text{cm}^{-1}] = 2114 (\text{vw}), 2101 (\text{w}), 2019 (\text{s}), 2004 (\text{s}), 1993 (\text{m}), 1963 (\text{s}), 1958 (\text{m}), 1585 (\text{w})$; ¹H-NMR (C₆D₆): $\delta = 10.17 (\text{s}, 1 \text{H}, \text{CH}), 2.82 (\text{s}, 3 \text{H}, \text{OMe})$; korrekte Elementaranalyse.

Eingegangen am 21. August 1993 [Z 6309]

[1] N. E. Schore, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1081.

[2] G. Palyi, G. Vardi, L. Markó in *Stereochemistry of Organometallic and Inorganic Compounds*, Vol. 1 (Hrsg.: I. Bernal), Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 358.

[3] E. Sappa, A. Tiripicchio, P. Braunstein, *Chem. Rev.* **1983**, *83*, 203.

[4] F. R. Lemke, D. J. Szalda, R. M. Bullock, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8466.

[5] a) R. D. Adams, L. Chen, W. Wu, *Organometallics* **1993**, *12*, 1623; b) *ibid.* **1993**, *12*, 2404.

[6] **2**: Orange Kristalle, Re₂S₂O₁₀C₁₃H₄, $M_r = 756.70$, monoklin, 20 °C, Raumgruppe C_{2/c}, $a = 1865.1(3)$, $b = 1151.3(3)$, $c = 1795.2(2)$ pm, $\beta = 97.54(1)^\circ$, $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.63 \text{ g cm}^{-3}$, MoK α -Strahlung, $2\theta_{\text{max}} = 46^\circ$, 2320 Reflexe mit $I > 3\sigma(I)$, 248 Variablen, empirische Absorptionskorrektur (Ψ -Scans), $R = 0.028$, $R_w = 0.032$. - **3b**: Orange Kristalle, Re₂S₂O₁₀C₁₃H₄, $M_r = 788.76$, triklin, 20 °C, Raumgruppe P $\bar{1}$, $a = 1236.3(2)$, $b = 1388.0(3)$, $c = 597.3(1)$ pm, $\alpha = 93.09(2)$, $\beta = 101.06(1)$, $\gamma = 77.81(1)^\circ$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.66 \text{ g cm}^{-3}$, MoK α -Strahlung, $2\theta_{\text{max}} = 45^\circ$, 2126 Reflexe mit $I > 3\sigma(I)$, 269 Variablen, empirische Absorptionskorrektur (Ψ -Scans), $R = 0.020$, $R_w = 0.022$. TEXSAN-Programmbibliothek zur Strukturlösung (V 5.0) der Molecular Structure Corp., The Woodlands, TX. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1EZ, unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.

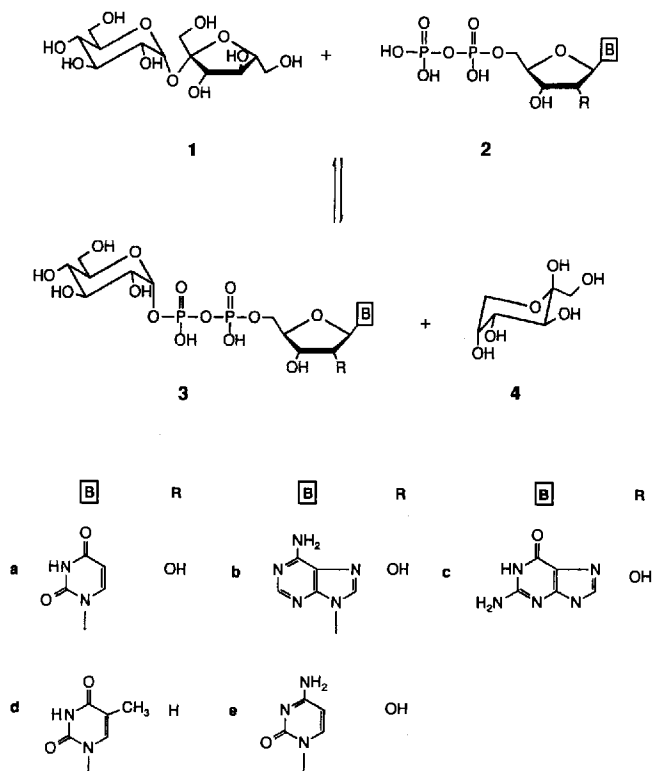
[7] a) J. Muzart, A. Riahi, *Organometallics* **1992**, *11*, 3478; b) T. V. Lubben, P. T. Wolczanski, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 424; c) P. L. Alsters, J. Boersma, G. van Koten, *Organometallics* **1993**, *12*, 1629; d) C. Sinha, D. Bandyopadhyay, A. Chakravorty, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1173; e) A. K. Mahapatra, D. Bandyopadhyay, P. Bandyopadhyay, A. Chakravorty, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2214; f) C. Sinha, D. Bandyopadhyay, A. Chakravorty, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 468; g) A. K. Mahapatra, D. Bandyopadhyay, P. Bandyopadhyay, A. Chakravorty, *ibid.* **1984**, 999; h) P. T. Matsunaga, G. L. Hillhouse, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2075.

Kontinuierliche enzymatische Synthese von 2'-Desoxythymidin-5'-(α -D-glucopyranosyl)-diphosphat**

Astrid Zervosen, Lothar Elling und Maria-Regina Kula*

2'-Desoxythymidin-5'-(α -D-glucopyranosyl)diphosphat (dTDP-Glucose) **3d** gehört zu den primären Nucleotidzuckern, deren Existenz und Bedeutung in der Biosynthese von glycosylierten Verbindungen von Leloir 1950 erkannt wurde^[1]. In der Grundlagenforschung wird heute intensiv die Rolle komplexer Glykokonjugate bei der interzellulären und immunologischen Erkennung in biologischen Systemen untersucht^[2]. Im Zuge dieser Entwicklung gewinnt die enzymatische Synthese von Oligosaccharidstrukturen mit Glycosyltransferasen^[3] und Glycosidasen^[4] im Vergleich zur arbeitsintensiven, durch aufwendigen Einsatz von Schutzgruppen gekennzeichneten chemischen Synthese immer mehr an Bedeutung^[5]. Der Gebrauch einer Glycosyltransferase setzt die Verfügbarkeit eines geeigneten Nucleosiddiphosphatzuckers voraus. In den letzten Jahren wurden mehrere aktivierte Zucker unter Verwendung unterschiedlicher Pyrophosphorylasen im präparativen Maßstab hergestellt^[6].

Wir haben erstmalig Saccharose-Synthase (EC 2.4.1.13), die einzige bisher bekannte Glycosyltransferase, die sowohl die Spaltung als auch die Synthese eines Disaccharids katalysiert,



Schema 1. Synthese von Nucleosiddiphosphatzuckern mit Saccharose-Synthase aus Reis.

[*] Prof. Dr. M.-R. Kula, Dipl.-Chem. A. Zervosen, Dr. L. Elling
Institut für Enzymtechnologie der
Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich
Postfach 2050, D-52404 Jülich
Telefax: Int. + 2461/61-2490

[**] Wir danken Dr. W. Klaffke (Universität Hamburg) für die Aufnahme der NMR-Spektren und seine Unterstützung bei ihrer Auswertung sowie Dr. U. Kragl (Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich) für die Bereitstellung eines Enzym-Membran-Reaktors.

zur Herstellung von dTDP-Glucose eingesetzt. Von dTDP-Glucose ausgehend sind eine Reihe von aktivierten Desoxyzuckern (z.B. dTDP-Dihydrostreptose, dTDP-L-Rhamnose) zugänglich, die Bestandteile von bestimmten Antibiotika^[7] oder von Lipopolysacchariden der Enterobakterien sind^[2]. Die aus Reiskörnern aufgereinigte Saccharose-Synthase spaltet Saccharose in Gegenwart von Uridin-5'-(UDP) **2a**, 2'-Desoxythymidin-5'-(dTDP) **2d**, Adenosin-5'-(ADP) **2b**, Cytidin-5'-(CDP) **2e** und Guanosin-5'-(GDP)diphosphat **2c** (Schema 1) und bietet sich somit zur Synthese von primären Nucleotidzuckern an^[8]. Das Enzym kann bei Glycosyltransferase-katalysierten Reaktionen zur In-situ-Regenerierung von dTDP-Glucose eingesetzt werden. Hingegen kann die dTDP-Glucose-Pyrophosphorylase^[9], die die Reaktion von dTTP mit Glucose-1-phosphat katalysiert, aufgrund der noch ungelösten Frage der enzymatischen Regenerierung von dTTP aus dTDP für gekoppelte Reaktionen nicht verwendet werden.

Mit einem Enzym-Membran-Reaktor (EMR) konnte nun erstmals eine kontinuierliche enzymatische Synthese eines Nucleosiddiphosphatzuckers im präparativen Maßstab realisiert werden. Die Saccharose-Synthase wurde unter Abtrennung der störenden Nebenaktivitäten, der Phosphatasen und der Invertase, aus Reis aufgereinigt^[10]. Unter den Synthesebedingungen (200 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (Hepes)-NaOH-Puffer, pH 7.0, 30 °C) wurde für das Enzym eine Aktivitätshalbwertszeit von 119 h gemessen. dTDP-Glucose ist unter diesen Bedingungen stabil, während 1% des eingesetzten dTDP bei der Synthese im EMR zu 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat (dTMP) hydrolysiert. Bei der Umsetzung von 5 mM dTDP und 350 mM Saccharose **1** wurde im EMR eine maximale Ausbeute von 89.6% dTDP-Glucose **3d** erzielt (Abb. 1).

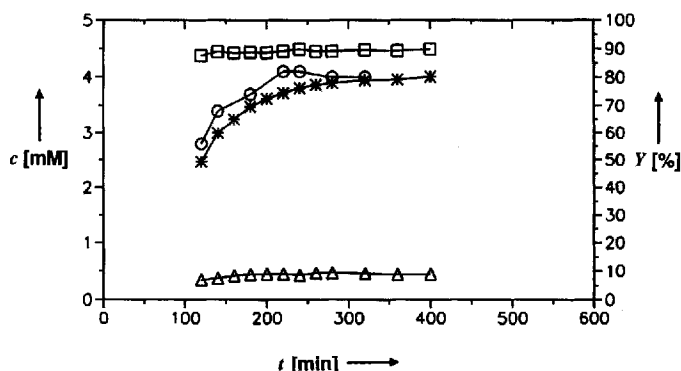


Abb. 1. Konzentrations-Zeit-Verlauf der kontinuierlichen Synthese von dTDP-Glucose **3d** (*) im Enzym-Membran-Reaktor; Ausgangskonzentrationen: 5 mM dTDP **2d** (Δ), 350 mM Saccharose **1**, 200 mM Hepes-NaOH; pH 7.0; 30 °C; 990 mU Saccharose-Synthase; Verweilzeit: 0.67 h. D-Fructose (o); Y: Ausbeute (\square).

Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von $98.1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (ca. 1 g d^{-1} dTDP-Glucose im verwendeten Reaktor). Im Vergleich zu parallel durchgeführten Synthesen im Satzreaktor kann der Enzymverbrauch von 3.9 U g^{-1} dTDP-Glucose auf 1 U g^{-1} gesenkt werden.

Aliquote der im EMR synthetisierten dTDP-Glucose **3d** wurden nach zwei unterschiedlichen Reinigungsverfahren aufgearbeitet. dTDP-Glucose wurde durch Ionenaustauschchromatographie isoliert; bei der anschließenden Lyophilisation konnte die Zersetzung der dTDP-Glucose dadurch verringert werden, daß der pH-Wert der Lösung auf pH 7.0 eingestellt wurde. Bei der Entsalzung des Lyophilisats wurde alternativ zur Gelfiltration

tion eine Ethanol-Aceton-Fällung durchgeführt, die sich durch ein einfaches Scale-up auszeichnet. Beide Reinigungsverfahren sind noch verbesserungswürdig. Aufgrund der hohen Ausbeute von fast 90% dTDP-Glucose kann das Produkt eventuell ohne vorherige Reinigung für weitere enzymatische Umsetzungen eingesetzt werden. Die enzymatisch hergestellte dTDP-Glucose (Reinigungsverfahren 2) wurde ^1H - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-spektroskopisch charakterisiert (Tabelle 1).

Tabelle 1. NMR-spektroskopische Daten von dTDP-Glucose **3d**. ^1H -NMR (400 MHz, D_2O); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, D_2O) [11].

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ = 7.80 (s, 1H; H-6'), 6.40 (dd, $^3J(1,2a) \approx ^3J(1,2b) \approx 7.0 \text{ Hz}$, 1H; H-1), 5.65 (dd, $^3J(1'',2'') = 3.6 \text{ Hz}$, $^3J(1'',P) = 7.1 \text{ Hz}$, 1H; H-1''), 4.80 (HDO), 4.66 (m, 1H; H-4), 4.25 (m, 2H; H-5a, 5b), 4.02–3.86 (m, $^2J(6'a, 6'b) = 12.7 \text{ Hz}$, 2H; H-5'', H-6'a), 3.86–3.79 (m, $^3J(3'',4'') = 9.2 \text{ Hz}$, $^3J(4'',5'') = 8.7 \text{ Hz}$, $^3J(5'',6'b) = 4.6 \text{ Hz}$, $^2J(6'a,6'b) = 12.7 \text{ Hz}$, 2H; H-4'', H-6'b), 3.58 (ddd, $^3J(1'',2'') = 3.6 \text{ Hz}$, $^3J(2'',3'') = 9.7 \text{ Hz}$, $^4J(2'',P) = 3.4 \text{ Hz}$, 1H; H-2''), 3.51 (dd, $^3J(2'',3'') = 9.7 \text{ Hz}$, $^3J(3'',4'') = 9.2 \text{ Hz}$, 1H; H-3''), 2.43 (m, 2H; H-2a, b), 1.98 (s, 3H; 5'-CH ₃)
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100 MHz, D_2O): δ = 156.1 (C-5'), 137.6 (C-6'), 95.8 (d, $^3J(C-1'', P) = 6.5 \text{ Hz}$, C-1''), 85.5 (C-1), 73.1 (C-5''), 71.8 (d, $^4J(C-2'',P) = 8.5 \text{ Hz}$, C-2''), 71.4 (C-3), 71.2 (C-4), 69.5 (C-3'), 65.7 (d, $^3J(C-5,P) = 6.5 \text{ Hz}$, C-5), 60.6 (C-6'), 38.8 (C-2), 11.9 (5'-CH ₃)

Arbeitsvorschrift

Die Reaktion wurde in Hepes-NaOH-Puffer (200 mM, pH 7.0) bei 30 °C durchgeführt. Zu Beginn wurden 990 mU der aufgereinigten Saccharose-Synthase [10] und 10 mg Rinderserumalbumin über einen vorgeschalteten Sterilfilter (0.2 μm , Sartorius, Göttingen) in den sterilen, mit Puffer gefüllten EMR (Volumen 10 mL; Bioengineering, Wald, Schweiz) injiziert. Anschließend wurde die Substratlösung (100 mL Puffer mit dTDP (**2d**, Na⁺-Salz, 230 mg, 5 mM, Sigma) und Saccharose (**1**, 11.98 g, 350 mM) mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 mL h^{-1} kontinuierlich durch den Reaktor gepumpt, in dem das Enzym durch eine Ultrafiltrationsmembran (YM 10, Amicon, Witten) zurückgehalten wurde. Der Syntheseverlauf wurde 400 min (zehn Verweilzeiten) lang durch regelmäßige Probeentnahme verfolgt. Mit Ionenpaar-HPLC wurden die Nucleosidphosphate und Nucleotidzucker aufgetrennt und quantitativ analysiert [10]. Aliquote der produzierten dTDP-Glucose wurden nach unterschiedlichen Reinigungsverfahren aufgearbeitet. Verfahren 1 (84.4 mg Rohprodukt): Zunächst wurden dTDP, die Zucker und der Puffer durch Ionenaustauschchromatographie mit Sepharose Q in Cl⁻-Form (1.8 \times 30 cm, Gradient: 55–200 mM LiCl bei pH 5.0) abgetrennt. Die Abtrennung von dTMP erfolgte mit Dowex 1 \times 2 in Cl⁻-Form (100–200 mesh, 2.6 \times 7.0 cm, Gradient: 55–350 mM LiCl mit 3 mM HCl). Nach der Lyophilisation wurde das Produkt durch Gelfiltrationschromatographie (G-10, 1.6 \times 30 cm) entsalzt (39.1 mg, 46.4%).

Verfahren 2 (57.8 mg Rohprodukt): Nach der Ionenaustauschchromatographie mit Sepharose Q wurde dTMP mit Dowex 1 \times 2 in Cl⁻-Form (100–200 mesh, 2.6 \times 7.0, 0–500 mM LiCl) entfernt. Im Anschluß an die Lyophilisation wurde das Lyophilisat in Ethanol gelöst und dTDP-Glucose durch Zugabe der 2.5fachen Menge Aceton ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. (24.5 mg, 42.4%) $[\alpha]_D^{25} = 48.1$ ($c = 4.6 \text{ mg}$ in H_2O). Das Produkt enthält laut HPLC-Analyse [10] 6.5% dTMP.

Eingegangen am 2. Oktober 1993 [Z 6388]

- [1] C. E. Cardini, R. Caputto, A. C. Paladini, L. F. Leloir, *Nature* **1950**, 165, 191–192.
- [2] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184–201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 155–173; K. Marumo, L. Lindqvist, N. Verma, A. Weintraub, P. R. Reeves, A. A. Lindberg, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 240, 539–545.
- [3] Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 215–238.
- [4] K. G. I. Nilsson, *Trends Biotechnol.* **1988**, 6, 256–264.
- [5] H. Waldmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, 40, 828.
- [6] J. E. Heidl, K. W. Williams, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 307–314.
- [7] H. Grisebach, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, 35, 81–126.
- [8] L. Elling, M. Groth, M.-R. Kula, *Glycobiology* **1993**, 3, 349–355; L. Elling, M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, im Druck.
- [9] S. Kornfeld, L. Glaser, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 1791–1794.
- [10] L. Elling, M.-R. Kula, *J. Biotech.* **1993**, 29, 277–286.
- [11] Die NMR-Daten stimmen mit denen von chemisch synthetisierter dTDP-Glucose überein (Dr. W. Klaffke, persönliche Mitteilung).