

DIE ENZYMATISCHE UMWANDLUNG VON 2-DESOXY-D-*lyxo*-HEXOSE (2-DESOXY-D-GALAKTOSE) IN 3,6-ANHYDRO-2-DESOXY-D-*lyxo*-HEXOSE (D-ISOGALAKTAL)*

JOCHEN LEHMANN UND EKKEHARD SCHRÖTER

Chemisches Laboratorium der Universität, D-78 Freiburg i. Br. (Deutschland)

(Eingegangen am 26. Juni 1973; angenommen in revidierter Form am 18. März 1974)

ABSTRACT

Incubation of 2-deoxy-D-*lyxo*-hexose with β -galactosidase, gave **2** in small ($\sim 2\%$) yield a compound which was shown to be 3,6-anhydro-2-deoxy-D-*lyxo*-hexose ("D-isogalactal" **2**), identified by comparison of the reduced and acetylated product with an authentic sample of 2,3,6-tri-*O*-acetyl-1,4-anhydro-5-deoxy-D-*arabino*-hexitol. Enzymic synthesis of **2** is likely to start from the 2-deoxy-D-*lyxo*-hexopyranosyl cation (**10**) which undergoes β -elimination to give 2,3-dideoxy-D-*threo*-hex-2-enose (**12**, "D-pseudogalactal"). Spontaneous intramolecular addition then yields **2**. This pathway would support the hypothesis of a generally occurring formation of a free cyclic carboxonium ion in the action of β -galactosidase on sterically suitable aldohexopyranoses and aldohexopyranosides.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Inkubation von 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose mit β -Galaktosidase läßt sich 3,6-Anhydro-2-desoxy-D-*lyxo*-hexose („D-Isogalaktal“ **2**) nachweisen und in geringer Ausbeute (ca. 2%) isolieren. Verbindung **2** wurde durch Vergleich der durch Reduktion und anschließende Acetylierung erhaltenen Verbindung mit authentischem 2,3,6-Tri-*O*-acetyl-1,4-anhydro-5-desoxy-D-*arabino*-hexitol identifiziert. Die enzymatische Synthese von **2** wird wahrscheinlich durch Bildung des 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexosyl-Kations (**10**) eingeleitet, das durch β -Eliminierung in 2,3-Dideoxy-D-*threo*-hex-2-enose (**12**, „D-Pseudogalaktal“) umgewandelt wird. Durch spontane intramolekulare Addition entsteht daraus **2**. Diese Reaktionsfolge würde die Hypothese stützen, daß allgemein bei Einwirkung von β -Galaktosidase auf sterisch geeignete Aldohexopyranosen und Aldohexopyranoside ein freies, cyclisches Carboxonium-Ion entsteht.

*Reaktionen enolischer Zuckerderivate. Teil IX¹. Für Teil VIII, siehe Zit. 1.

EINLEITUNG

In einer früheren Arbeit¹ wurde die Hydratisierung von D-Glucal und D-Galaktal zu den entsprechenden 2-Desoxy-D-hexosen durch β -Glucosidase bzw. β -Galaktosidase beschrieben.

Beide Reaktionen hatten sich als nicht reversibel erwiesen. Bei längerer Inkubation von 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (2-Desoxy-D-galaktose, **1**) mit hohen Konzentrationen an β -Galaktosidase war zwar ein Produkt entstanden, das ähnliche chromatographische Eigenschaften hatte wie D-Galaktal, mit diesem jedoch nicht identisch war. Die Behandlung von 2-Desoxy-D-*arabino*-hexose (2-Desoxy-D-glucose) mit β -Glucosidase ergab überhaupt keine Umsetzung.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Identifizierung des bei Einwirkung von β -Galaktosidase auf 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (**1**) entstehenden Produktes berichtet und dessen Bildung diskutiert.

ERGEBNISSE

Bei Inkubation von 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (**1**) mit β -Galaktosidase entsteht eine dünn-schichtchromatographisch und papierchromatographisch nachweisbare Verbindung, deren Wanderungsgeschwindigkeiten etwa denen des D-Galaktals entsprechen. Jedoch konnte durch Cokristallisation einer ¹⁴C-markierten Probe mit authentischem D-Galaktal sichergestellt werden, daß die beiden Verbindungen nicht identisch sind¹.

Die Verbindung entsteht aus 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (**1**) auch spontan oder in Gegenwart von unspezifischem Protein, jedoch langsamer als bei Inkubation mit β -Galaktosidase (Tabelle I). Die enzymatische Reaktion wird durch Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid gehemmt. Der Umsatz ist der Enzymkonzentration proportional (Tabelle II).

TABELLE I

UMSETZUNG VON 2-DESOXY-D-*lyxo*-HEXOSE (**1**) ZU 3,6-ANHYDRO-2-DESOXY-D-*lyxo*-HEXOSE (**2**)^a

Ansatz ^b	Umsatz (%)
1. 1 , β -Galaktosidase, Puffer	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 31 36 26 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">31</div>
2. 1 , Albumin, Puffer	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 3,0 3,1 3,0 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">3,0</div>
3. 1 , Puffer	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 3,2 3,2 3,1 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em; margin: 0 5px;">}</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">3,2</div>

^aIn 0,2M Natriumphosphat-Puffer, pH 6,8. nach 11 Wochen bei 35°. ^bAnsätze: (1.) **1** (50 nCi, 16 nMol), β -Galaktosidase (20 μ l, 100 μ g), Puffer (30 μ l); (2.) **1** (50 nCi, 16 nMol), Albumin (0,5 mg), Puffer (50 μ l); (3.) **1** (50 nCi, 16 nMol), Puffer (50 μ l).

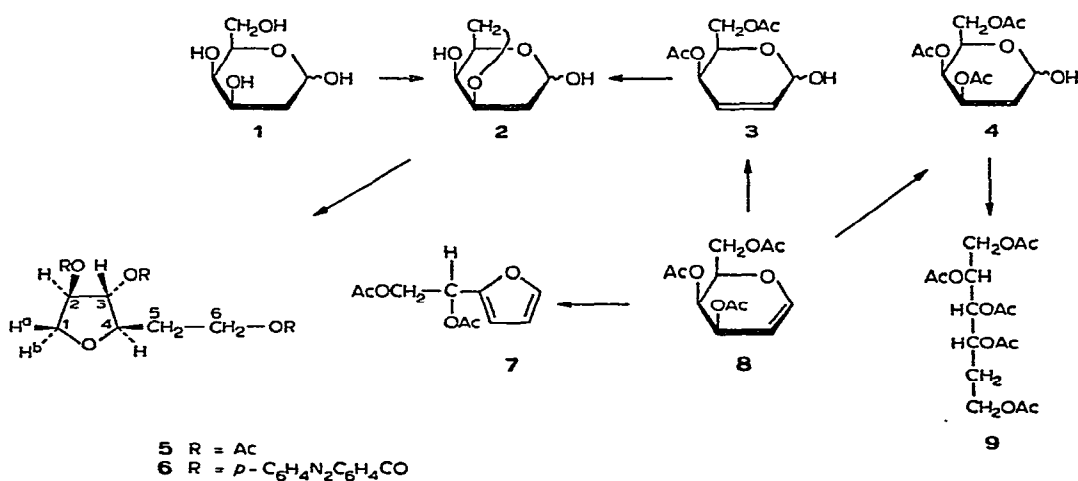
TABELLE II

 UMSETZUNGEN VON 2-DESOXY-D-*lyxo*-HEXOSE (1) IN GEGENWART VERSCHIEDENER ENZYMKONZENTRATIONEN UND IN GEGENWART VON ISOPROPYL-1-THIO- β -D-GALAKTOSID^a

β -Galaktosidase (μ l)	Inhibitor (mg)	Umsatz (%)
5	0	10,3
10	0	14,6
20	0	26,4
20	2,4	6,0
0	0	4,9

^a1 (30 nCi, 10 nMol); Puffer (ad 50 μ l); 5 Wochen bei 35°.

Die Verbindung wurde als 3,6-Anhydro-2-desoxy-D-*lyxo*se („D-Isogalaktal“) (2) wie folgt identifiziert: Sowohl Peracetylierung als auch Pertrimethylsilylierung der dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Verbindung lieferten jeweils zwei gaschromatographisch trennbare Acetyl- bzw. Trimethylsilyl-Derivate. Dies läßt auf ein Anomeren-Paar schließen. Nach Behandeln von 2 mit Natriumborhydrid waren sowohl das stabile und destillierbare Polyol-Acetat 5 als auch der entsprechende Trimethylsilyläther gaschromatographisch einheitlich. Verbindung 5 wurde nach Entacetylierung in das kristalline *p*-Phenylazobenzoat 6 übergeführt. Dem Kernresonanzspektrum zufolge ist 5 2,3,6-Tri-*O*-acetyl-1,4-anhydro-5-desoxy-D-*arabino*-hexitol. Diese Struktur ist in Einklang mit den Ergebnissen der Elementaranalyse von 5 und 6. Wichtiger zusätzlicher Beweis für die Struktur von 5 ist ihre Identität mit dem auf bekanntem chemischem Wege gewonnenen 2,3,6-Tri-*O*-acetyl-1,4-anhydro-5-desoxy-D-*arabino*-hexitol.

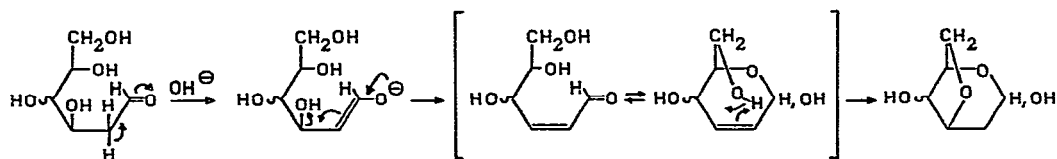


Verbindung 2, aus der durch Reduktion und Acetylierung 5 entsteht, war 1935 von Lohaus und Widmaier² aus 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galaktal (8) über die Zwischenstufe 4,6-Di-*O*-acetyl-2,3-didesoxy-D-*threo*-hex-2-enose (4,6-Di-*O*-acetyl-D-pseudo-galaktal, 3) dargestellt und „Isogalaktal“ genannt worden. Foster *et al.*³ gewannen 2 später auf anderem Wege und sicherten damit die Struktur.

Die organisch-chemische Synthese von 5 erfolgte durch Reduktion von roher 3,6-Anhydro-2-desoxy-D-*lyxo*-hexose (D-Isogalaktal, 2), die unter Modifizierung des Verfahrens von Lohaus und Widmaier² aus Tri-*O*-acetyl-D-galaktal (8) dargestellt worden war, mit Natriumborhydrid und durch anschließende Acetylierung. Als Hauptprodukt entstand in guter Ausbeute eine einheitliche Substanz, die in allen Eigenschaften mit 5 übereinstimmt. Als Nebenprodukte fielen das bei Glykalumlagerungen regelmäßig auftretende Furanderivat⁴ 7* und 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-5-desoxy-D-*arabino*-hexitol** (9) an. Verbindung 9 entstand durch Reduktion der 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-D-*lyxo*-hexose (4), die beim Kochen von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galaktal (8) mit Wasser durch die als Nebenreaktion ablaufende Hydratisierung gebildet wurde.

DISKUSSION

Auf chemischem Wege⁵ entstehen die Isoglykale aus den entsprechenden 2-Desoxyhexosen durch β -Eliminierung unter Bildung des Pseudoglykals, gefolgt von einem nucleophilen Angriff der Hydroxyl-Gruppe von C-6 an C-3 (Schema 1).



Schema 1

Die einleitende Ablösung des Protons von C-2 ist nur in der Carbonylform möglich. 2-Desoxy-D-*arabino*-hexose und 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose tauschen bei pH 6,8 Tritium aus¹, nicht aber Phenyl-2-desoxy- α ,D-*lyxo*-hexopyranosid. Selbst in Gegenwart von Alkali (pH 13) findet bei dem 2-Desoxyglykosid kein Tritium-Austausch statt.

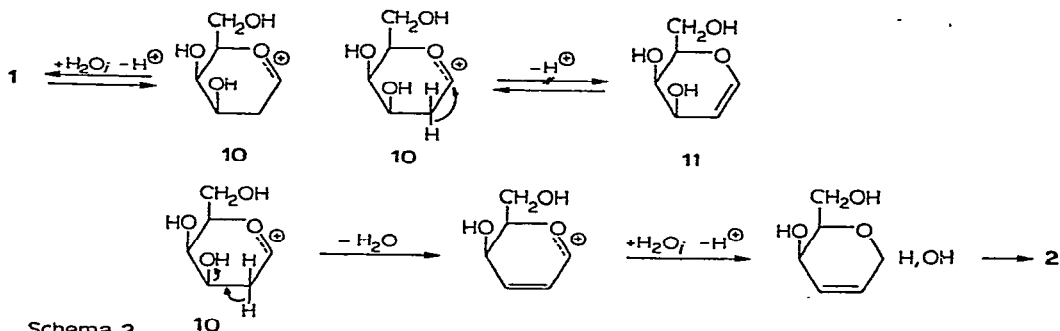
Da der einzige plausible Weg von der enzymgebundenen 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (1) zur 3,6-Anhydro-2-desoxy-D-*lyxo*-hexose (2) über eine Deprotonierung am C-2 führt, muß die C-2-H-Bindung labilisiert sein. Labilisierung des C-2-Protons bei der Enzymreaktion durch eine benachbarte Carbonyl-Gruppe ist auszuschließen,

*Die Autoren danken Herrn Dr. R. J. Ferrier für die Überlassung des Kernresonanz- und des i.r.-Spektrums.

**Verbindung 9 wurde durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert.

da die acyclische Form der Aldose kein Substrat der β -Galaktosidase ist⁶. Die Labilisierung kann jedoch ermöglicht werden durch die Bildung eines cyclischen Carbonium-Oxonium-Ions (10) nach Protonierung des Lactolsauerstoffs durch das Enzym und anschließenden Wasseraustritt.

Von dem 2-Desoxyhexopyranosyl-Kation 10 kann man drei Reaktionen erwarten (Schema 2):



1. Rückreaktion mit Wasser aus dem Medium.
2. Stabilisierung zu D-Galaktal (11) unter Abgabe eines Protons von C-2.
3. Abgabe eines Protons von C-2 und Austritt der Hydroxyl-Gruppe von C-3 unter Bildung von 2,3-Dideoxy-D-threo-hex-2-enose (12).

Die Wasseranlagerung an 10 (Weg 1) ist die „natürliche“ Reaktion. D-Galaktal (11)-Bildung (Weg 2) findet nicht statt, denn auch bei Inkubation hoher Aktivitäten an 2-Desoxy-D-lyxo-hexose-¹⁴C (1) mit β -Galaktosidase konnte kein D-Galaktal (11) nachgewiesen werden¹. Die enzymatische Hydratisierung des D-Galaktals (11) ist irreversibel. Die 3,6-Anhydro-2-desoxy-D-lyxo-hexose (2) ist ein Folgeprodukt der vinylogenen Reaktion (Weg 3). Sie entsteht durch Isomerisierung aus der instabilen 2,3-Dideoxy-D-threo-hex-2-enose (12).

EXPERIMENTELLER TEIL

Papierchromatographie. — Papierchromatogramme wurden auf Whatman Nr. 1 Chromatographiepapier absteigend mit 1-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3, v/v) angefertigt. Inaktive Substanzen wurden mit Anilinphthalat entwickelt, radioaktive Substanzen durch Auszählen im Radiopapierchromatographen (4 π , fensterlos) lokalisiert.

Dünnschichtchromatographie. — Verwendet wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 (Merck, Darmstadt). Laufmittel: Benzol-Methanol (1:1, v/v) für Verbindungen mit freien Hydroxylgruppen, Äther-Petroläther (Sdp. 60–70°) (9:1, v/v) für acylierte Verbindungen.

Gaschromatographie. — Trennungen wurden in Glassäulen vorgenommen. Packung: Silicongummi SE 52 (3 %) auf Chromosorb G; Trägergas: Stickstoff;

FID. Acetylierungen mit Acetanhydrid in Pyridin; Trimethylsilylierungen mit Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorsilan (2:1, v/v) in Pyridin.

Enzymatische Umsetzungen. — *A. Materialien.* β -Galaktosidase aus *E. coli* (Boehringer, Mannheim); Kristallsuspension, 5 mg/ml; spez. Aktivität ~ 30 U/mg (Lactose). 0.2M Natriumphosphat-Puffer, pH 6.8. Albumin aus Eiern, trocken (Merck, Darmstadt). Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (Serva, Heidelberg).

B. Ansätze. (a) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (Zit. 1, 50 nCi, 16 nMol), Puffer (30 μl), Enzym (20 μl); (b) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (50 nCi, 16 nMol), Albumin (0,5 mg), Puffer (50 μl); (c) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (50 nCi, 16 nMol), Puffer (50 μl). Je drei Proben wurden 11 Wochen bei 35° inkubiert und nach Denaturierung des Proteins (5 min bei 90°) auf Papier chromatographiert. Die Chromatogramme wurden im Radiopapierchromatographen ausgezählt (1, R_F 0,47; 2, R_F 0,69), die Diagramme planimetriert (Tabelle I)*.

(d) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (30 nCi, 10 nMol), Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (2,4 mg), Enzym (20 μl), Puffer (30 μl); (e) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (30 nCi, 10 nMol), Puffer (50 μl); (f) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose- I - ^{14}C (1) (drei Proben, je 30 nCi, 10 nMol), Enzym (5 μl , 10 μl , 20 μl), Puffer (45 μl , 40 μl , 30 μl). Die Proben wurden 5 Wochen bei 35° inkubiert und dann wie unter (a)–(c) weiterbehandelt (Tabelle II).

(g) 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (1, 5 g) wurden in Puffer (100 ml) gelöst, mit β -Galaktosidase (30 mg) versetzt und 12 Wochen bei 35° inkubiert. Nach Denaturierung des Proteins (5 min bei 90°) wurde filtriert, lyophilisiert, in Benzol-Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und auf eine Säule (100 \times 6 cm) mit Kieselgel (0,05–0,2 mm, Merck) gegeben. Eluiert wurde mit Benzol-Methanol (1:1, v/v). Die Fraktionen, die ausschließlich 2 enthielten, wurden vereinigt und bei vermindertem Druck eingedampft; Ausbeute**, 98 mg (2% d. Th.); farbloser Sirup.

2,3,6-Tri-O-acetyl-1,4-anhydro-5-desoxy-D-arabino-hexitol (5). — (a) Aus dem Produkt der Enzymreaktion. Der farblose Sirup (2, 100 mg) wurde in Wasser (1 ml) aufgenommen, mit Natriumborhydrid (50 mg) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Das Gemisch wurde dann mit Essigsäure schwach angesäuert, unter vermindertem Druck eingedampft, dreimal mit Methanol (je 10 ml) abgedampft, in Pyridin (50 ml) aufgenommen, unter Eiskühlung mit Acetanhydrid (25 ml) behandelt und 10 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde in Eiswasser (300 ml) eingerührt und sechsmal mit Chloroform (je 60 ml) extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden über Calciumsulfat (Sikkon) getrocknet und unter vermindertem Druck eingedampft. Destillation des Rückstandes im Vakuum (<0,01 mm Hg, Bad 160–170°, Sdp. 122°) ergab 145 mg (79% d. Th) farbloses Öl;

*Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Ansätze (a) bis (d) mit kristalliner, hochreiner β -Galaktosidase aus einem *E. coli* K 12-Stamm wiederholt. Die Autoren danken den Herren Prof. K. Wallenfels und Dr. G. Kurz für die Überlassung einer Enzym-Probe.

**Wegen des veränderten Enzym:Substrat-Verhältnisses ist die Ausbeute sehr viel geringer als bei den Ansätzen mit ^{14}C -markierter 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose (1). Zudem wurden nach der Säulenchromatographie nur die einheitlichen Fraktionen aufgearbeitet.

$[\alpha]_{578}^{22} -41^\circ$ (c 2,4, Chloroform); n.m.r.-Daten*, δ 1,88 (qu, 2 H, H-5, $J_{4,5} = J_{5,6}$ 6,7 Hz); 2,05, 2,11, 2,13 (3 s, 9 H, Acetyl); 3,65 (qu, 1 H, H-1b, $J_{1a,1b}$ 10,5 Hz, $J_{1b,2}$ 3 Hz); 4,00–4,39 (m, 4 H, H-1a, H-4 und H-6); 5,11 (qu, 1 H, H-2, $J_{1a,2} = J_{1b,2} = J_{2,3}$ 3 Hz); 5,25 (d, 1 H, H-3).

Anal. Ber. für $C_{12}H_{18}O_7$: C, 52,55; H, 6,62. Gef.: C, 52,44; H, 6,38.

(b) Aus 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galaktal (8). 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galaktal (roh, 10 g) wurde mit Wasser (300 ml) 30 min unter Rückfluß gekocht, mit Aktivkohle versetzt, nochmals aufgeköcht, filtriert und bei vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5M methanolische Natriummethylat-Lösung (40 ml) aufgenommen und bei Raumtemperatur 15 min stehengelassen, wobei intensive Dunkelfärbung eintrat. Anschließend wurde eine Lösung von Natriumborhydrid (1,3 g) in Wasser (20 ml) zugefügt, worauf sich die Lösung allmählich aufhellte. Nach 3 h wurde mit Eisessig schwach angesäuert und unter vermindertem Druck eingedampft. Der sirupöse Rückstand wurde mit Pyridin (35 ml) und Acetanhydrid (35 ml) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde in Eiswasser (500 ml) eingerührt, dreimal mit Chloroform (je 100 ml) extrahiert und die Chloroformphase über Calciumsulfat (Sikkon) getrocknet. Nach dem Eindampfen verblieb ein sirupöser Rückstand, der im Vakuum ($<0,01$ mm Hg, Bad $130-170^\circ$) destilliert wurde. Die Hauptfraktion ($122-124^\circ$) wurde nochmals destilliert ($<0,01$ mm Hg, Bad $160-167^\circ$, Sdp. $122-124^\circ$); Ausbeute: 4,2 g (41 %) 5. Aus dem Vorlauf der ersten Destillation wurden 0,3 g 7 isoliert (identifiziert durch Vergleich der n.m.r.- und i.r.-Spektren), der Destillationsrückstand enthielt hauptsächlich 9 (identifiziert durch dünnschicht- und gaschromatographischen Vergleich mit einer authentischen Probe). N.m.r.- und i.r.-Spektren der auf verschiedenen Wegen gewonnenen Proben von 5 stimmen überein.

1,4-Anhydro-5-desoxy-2,3,6-tri-O-p-phenylazobenzoyl-D-arabino-hexitol (6). — 2,3,6-Tri-O-acetyl-1,4-anhydro-5-desoxy-D-arabino-hexitol (5, 275 mg, 1 mMol) wurde 1 h mit 0,02M Natriummethylat-Lösung (3 ml) behandelt, unter vermindertem Druck eingedampft, mit p-Phenylazobenzoylchlorid (800 mg, 3,3 mMol) in Pyridin (5 ml) versetzt und 2 h auf 100° erhitzt. Darauf wurde Wasser (10 Tropfen) zugefügt, weitere 25 min bei 100° gehalten, in Eiswasser (150 ml) eingerührt, abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das feste Produkt wurde in Chloroform (50 ml) aufgenommen, filtriert, durch eine Säule (5×2 cm) mit Aluminiumoxid (neutral) trocken filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde aus Benzol-Chloroform (1:1, v/v) umkristallisiert; Ausbeute: 310 mg (40 %); Schmp. 198° .

Anal. Ber. für $C_{45}H_{36}N_6O_7$: C, 69,94; H, 4,70; N, 10,87. Gef.: C, 70,21; H, 4,61; N, 11,03.

Die Operation wurde mit Proben der Verbindung 5 verschiedener Herkunft ausgeführt. Die Azoate zeigten gleiches chromatographisches Verhalten, die i.r.-Spektren waren identisch, Mischschmelzpunkt: 198° .

*Die Autoren danken Herrn Dr. Englert (Hoffmann-La Roche, Basel) für die Aufnahme eines 90 MHz Fourier-Spektrums.

DANK

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.

LITERATUR

- 1 J. LEHMANN UND E. SCHRÖTER, *Carbohydr. Res.*, 23 (1972) 359.
- 2 H. LOHAUS UND O. WIDMAIER, *Ann.*, 520 (1935) 301.
- 3 A. B. FOSTER, W. G. OVEREND, M. STACEY UND G. VAUGHAN, *J. Chem. Soc.*, (1954) 3367.
- 4 R. J. FERRIER UND D. M. CIMENT, unveröffentlicht; E. ALBANO, D. HORTON UND T. TSUCHIYA, *Carbohydr. Res.*, 2 (1966) 349; J. S. BRIMACOMBE, I. DA'ABOUL UND C. N. TUCKER, *ibid.*, 19 (1971) 276.
- 5 R. J. FERRIER, W. G. OVEREND UND A. E. RYAN, *J. Chem. Soc.*, (1962) 1488.
- 6 J. LEHMANN UND H. REINSHAGEN, *Ann.*, 732 (1970) 112; K. WALLENFELS UND R. WEIL, in P. D. BOYER (Hrsg.), *The Enzymes*, Vol. VII, Academic Press, New York, 3. Ausg, 1972, p. 642.