

# NACHWEIS EINES ENZYMGEBUNDENEN ZWISCHENPRODUKTS BEI DER UMWANDLUNG VON THYMIDINDIPHOSPHAT-D-GLUCOSE IN THYMIDINDIPHOSPHAT-L-RHAMNOSE IN *E. COLI* B

J. LEHMANN \* und E. PFEIFFER

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br., Germany

Received 9 February 1970

An incubation mixture of TDP-D-glucose and a purified enzyme extract from *E. coli* B containing TDP-D-glucose 4,6-hydro-lyase was treated with  $\text{NaB}^3\text{H}_4$ . Hydrolysis of the separated sugar nucleotide fraction yielded D-galactose-4- $^3\text{H}$  but no  $^3\text{H}$ -labelled D-glucose. This indicates the presence of TDP-4-keto-D-glucose as an intermediate in the enzymatic conversion of TDP-D-glucose to TDP-L-rhamnose. The stereospecificity of the  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  reduction can only be explained if TDP-4-keto-D-glucose exists as an enzyme bound complex.

## 1. Einleitung

Der erste Reaktionsabschnitt in der Biosynthese der Thymidindiphosphat-L-rhamnose [1, 2] führt zur Bildung von Thymidindiphosphat-4-keto-6-desoxy-D-glucose (II) aus Thymidindiphosphat-D-glucose (I). Im zweiten Reaktionsabschnitt wird die isolierbare Verbindung II in Thymidindiphosphat-L-rhamnose (III) überführt [3] (Abb. 1).

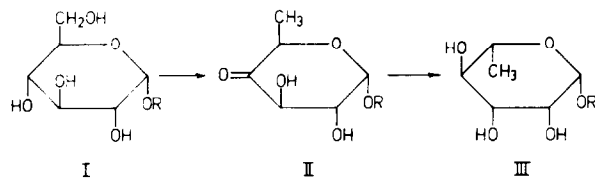


Abb. 1.

Die Umwandlung von I in II wird durch eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige TDP-D-glucose-4,6-hydrolase (4.2.1.43) katalysiert [4]. Untersuchungen von Melo et al. [5], Gabriel et al. [6] und Hermann et al. [7] haben gezeigt, daß diese Umwandlung mit Hilfe zweier Reaktionen durchgeführt wird: (1) einer Hydridwanderung von 4- nach 6-Stellung, (2) einer Dehydatisierung zwischen 5- und 6-Stellung des

\* Herrn Prof. Dr. K. Wallenfels in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet.

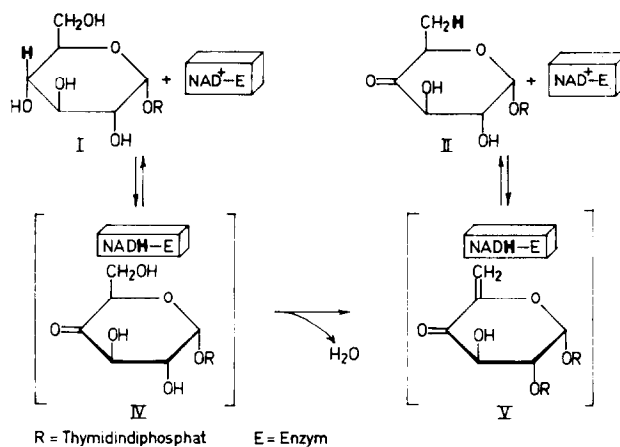


Abb. 2.

## D-Glucopyranoseringes.

Wir zeigen in dieser Arbeit, daß bei der Umwandlung von I in II die Zwischenstufe IV auftritt. Durch diesen Nachweis wird der von Melo et al. [5] und Gabriel et al. [6] postulierte Reaktionsweg (Abb. 2) bestätigt.

## 2. Material und Methoden

Gereinigter Enzymextrakt aus *E. coli* B [7]

(Endvolumen 5 ml\*) wurde mit Thymidindiphosphat-D-glucose (3,2  $\mu$ mol) 3 Std. bei 37° inkubiert und anschließend unter Eiskühlung mit NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> (41  $\mu$ mole, spezifische Aktivität: 4,9 Ci/mmol  $\Delta$  2,7  $\times 10^{12}$  dpm/mÄquivalent <sup>3</sup>H) versetzt. Nach 16 Std. wurde das Reaktionsgemisch auf etwa pH 5 angesäuert, und nach 2stündigem Aufbewahren bei Raumtemperatur das denaturierte Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Der Niederschlag wurde mit Wasser (3 ml) aufgeschlämmt und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten klaren Lösungen wurden lyophilisiert, in Wasser (0,5 ml) aufgenommen und absteigend chromatographiert (Papier: Whatman Nr. 1; Lösungsmittelgemisch: Äthanol – 1 M Ammoniumacetat in Wasser, 7 : 3, v/v; Laufzeit: 15 Std.). Die im UV-Licht sichtbare breite Zone der Zuckernucleotide [2], die stark radioaktiv war\*\*, wurde nach Ausschneiden des entsprechenden Papierstreifens eluiert. Das Einengen des Eluats erfolgte durch Lyophilisieren im Hochvakuum. Dabei wurde auch das Ammoniumacetat entfernt.

Der feste Rückstand wurde in 0,02 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer pH 9,2 (5 ml) mit alkalischer Phosphatase† 7 Std. bei 37° inkubiert. Nach Abtrennen des Proteins durch Hitzedenaturierung und anschließende Zentrifugation, einmaligem Auswaschen des Niederschlages und erneuter Zentrifugation wurden die vereinigten klaren Lösungen lyophilisiert. Der Rückstand, in Wasser (0,4 ml) aufgenommen, wurde absteigend neben den Referenzverbindungen D-Fucose (Zone a), D-Isorhamnose (Zone b), D-Glucose (Zone c) und D-Galaktose (Zone d) chromatographiert (Papier: Whatman Nr. 1; Lösungsmittelgemisch: n-Butanol-Pyridin-Wasser, 6 : 4 : 3, v/v/v; Laufzeit: 30 Std.). Die mit den genannten Referenzverbindungen†† gleichlaufenden

Tabelle 1  
Identifizierung der <sup>3</sup>H-markierten Reduktionsprodukte durch Papierchromatographie\* und Bestimmung ihrer Radioaktivitäten.

Referenzverbindung	Zone	R <sub>Glucose</sub>	Radioaktivität des Zoneneluats** dpm
D-Fucose	a	1,28	4,4 $\times 10^9$
D-Isorhamnose	b	1,50	4,4 $\times 10^9$
D-Glucose	c	1,00	—
D-Galaktose	d	0,81	3,9 $\times 10^7$ ***

\* Bedingungen im Text.

\*\* Mittelwerte, die aus den Meßwerten aliquoter Teile des entsprechenden Zoneneluats errechnet wurden. Die Einzelwerte für eine Zone wichen nie mehr als  $\pm 1,5\%$  vom Mittelwert ab.

\*\*\* Dies entspricht bei Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> einer Konzentration von etwa 0,01  $\mu$ mol III im Reaktionsansatz.

Zonen wurden ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Radioaktivität aliquoter Teile der Eluate wurde durch Messung in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (720 Series, Liquid Scintillation System der Nuclear Chicago Company) bestimmt und auf das jeweilige Gesamteluat umgerechnet (Tab. 1).

### 3. Resultate und Diskussion

Wie zu erwarten zeigte das Diastereomerenpaar D-Fucose und D-Isorhamnose (Eluate der Zonen a und b), das aus dem Produkt II der enzymatischen Umsetzung von I (Umsatz nach 3 Std. etwa 50% [7] entstanden war, eine entsprechend hohe Radioaktivität. Das der D-Glucose entsprechende Eluat der Zone c wies keine Radioaktivität auf, das der D-Galaktose entsprechende Eluat der Zone d hingegen war radioaktiv (Tab. 1).

Zur eindeutigen Identifizierung der radioaktiven Verbindung aus Zone d als D-Galaktose wurde das gesamte Eluat mit einer wäßrigen Lösung unmarkierter D-Galaktose (2 g in 10 ml) vermischt und nach Eindampfen der Lösung D-Galaktose durch Kristallisation aus 80% Äthanol zurückgewonnen. Die spezifische Radioaktivität, bezogen auf 2 g D-Galaktose, entsprach der Gesamtaktivität der Zone d. Es trat also bei der Cokristallisation kein Aktivitäts-

\* Zusammensetzung: Enzymprotein (33,6 mg), Tris-HCl-Puffer pH 8 (32  $\mu$ mole), Äthylendiamintetraessigsäure (0,8  $\mu$ mole), Cystein (2,4  $\mu$ mole), MgCl<sub>2</sub> (8  $\mu$ mole).

\*\* Bei getrennter Behandlung von Enzymextrakt + Zusätzen einerseits und von Thymidindiphosphat-D-glucose-Lösung andererseits mit NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> war nach Chromatographie nur im ersten Fall sehr geringe Radioaktivität auf der Startlinie nachzuweisen (markiertes Restprotein).

† C.F.Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim.

†† Die Entwicklung der Referenzverbindungen erfolgte mit Anilinphthalat.

Tabelle 2  
Abbau von D-Galaktose-<sup>3</sup>H.

Gemessene Verbindung	dpm/mmol	Ausbeute in % <sup>3</sup> H	Erfasste C-Atome
D-Galaktose	$2,75 \times 10^5$	100,0	1 2 3 4 5 6
6-O-Benzoyl-D-galaktose-phenylosotriazol	$2,70 \times 10^5$	98,0	1 3 4 5 6
Natriumformiat	$2,65 \times 10^5$	98,2	4
4-Formyl-2-phenyl-1,2,3-triazol und O-Benzoyl-glykolaldehyd	$1,35 \times 10^2$	0,005	1 3 5 6

verlust ein. Die molare spezifische Radioaktivität blieb auch konstant, nachdem ein Teil der markierten D-Galaktose zum  $\beta$ -D-Galaktopyranose-pentaacetat [8] umgesetzt worden war, das nach wiederholtem Umkristallisieren seine spezifische Radioaktivität nicht veränderte.

Der Rest der markierten D-Galaktose wurde schließlich nach weiterer Verdünnung mit unmarkiertem Träger nach der Methode von Simon et al. [9] in 6-O-Benzoyl-D-galaktose-phenylosotriazol überführt und dieses mit Natriumperjodat abgebaut (Tab. 2).

Die in Tabelle 2 wiedergegebenen Werte zeigen, daß die eingesetzte D-Galaktose-<sup>3</sup>H ausschließlich in 4-Stellung markiert ist. Diese Verbindung konnte nur aus dem Zwischenprodukt IV (Abb. 1) entstehen. Die Reduktion von IV zu dem entsprechenden 4-<sup>3</sup>H-markierten D-Galaktosenucleotid ohne gleichzeitige Bildung des 4-epimeren D-Glucosenucleotids beweist die Existenz von IV als enzymgebundenes Zwischenprodukts, das in dieser Form reduziert wird. Nur so ist eine stereospezifische Reduktion durch  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  zu erklären.

In früheren Arbeiten wurde gefunden, daß die Entfernung des Wasserstoffs am C-Atom 4 von 4-<sup>3</sup>H-markiertem I durch  $\text{NAD}^+$  ohne Isotopieeffekt abläuft [6], die Deprotonierung aus der 5-Stellung von 5-<sup>3</sup>H-markiertem I jedoch mit einem erheblichen Isotopieeffekt verbunden ist [7]. Dies ist nach der nun feststehenden Reaktionsabfolge dadurch zu erklären, daß die Dehydrierung (I $\rightarrow$ IV) reversibel, die

Dehydratisierung als Folgereaktion (IV $\rightarrow$ V) spontan [10] und irreversibel ist und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion I $\rightarrow$ II darstellt.

#### Dank

E.P. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium, J.L. für eine Sachbeihilfe.

#### Literatur

- [1] L.Glaser und S.Kornfeld, J. Biol. Chem. 236 (1961) 1975.
- [2] R.Okazaki, T.Okazaki, J.L.Strominger und A.M.Michelson, J. Biol. Chem. 237 (1962) 3014.
- [3] A.Melo und L.Glaser, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1475.
- [4] Shu-Fong Wang und O.Gabriel, Federation Proc. 28 (1969) 539; J. Biol. Chem. 245 (1970), im Druck.
- [5] A.Melo, W.H.Elliott und L.Glaser, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1467.
- [6] O. Gabriel und L.C.Lindquist, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1479.
- [7] K.Herrmann und J.Lehmann, European J. Biochem. 3 (1968) 369.
- [8] C.S.Hudson und H.O.Parker, J. Am. Chem. Soc. 37 (1915) 1589.
- [9] H.Simon, Z.Naturforsch. 18 b(1963) 360; H.Simon und J.Steffens, Ber. 95 (1962) 358.
- [10] O.Gabriel, Carbohydrate Res. 6 (1968) 111.