

Zur Biosynthese der D-Aldgarose II

Biosynthesis of D-Aldgarose II

ROLF SCHMID und HANS GRISEBACH

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen am Biologischen Institut II der Universität Freiburg,
78 Freiburg i. Br., Schaenzlestr. 9/11(Z. Naturforsch. **25 b**, 1259—1263 [1970]; eingegangen am 9. Juli 1970)

The incorporation of pyruvate-[2-¹⁴C] into the sugars of aldgamycin E in normal fermentations and in resting cell cultures of *S. lavendulae* was compared. The extent of incorporation of radioactivity into the hydroxyethyl branch of D-aldgarose (3,1'-O-carbo-4,6-dideoxy-3-C-[1'-hydroxyethyl]-D-ribo-hexose) was about the same in both cases (44—45% of the radioactivity in aldgarose). With D-glucose-[U-¹⁴C] as a precursor the radioactivity was evenly distributed in the hexose chain of aldgarose and D-mycinos (6-deoxy-2,3-O-methyl-D-allose), whereas the incorporation into the hydroxyethyl branch [C-(1')-C-(2')] of aldgarose was negligible.

Radioactivity from L-ethionine-[ethyl-¹⁴C] was not incorporated to a significant extent into C-(1')-C-(2') of aldgarose. Experiments with bicarbonate-[¹⁴C] indicate that the cyclic carbonate of aldgarose originates from a carboxylation reaction. The results of experiments with oxythiamine, pyriethamine, bisulfite, and fluoropyruvate did not allow any conclusion on the possible participation of hydroxyethylthiamine-pyrophosphate in the biosynthesis of aldgarose.

In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, daß die bisher gefundene beste Vorstufe für die Hydroxyäthylverzweigung der D-Aldgarose (3,1'-O-Carbo-4,6-dideoxy-3-C-[1'-hydroxyäthyl]-D-ribo-hexose) aus Aldgamycin E Pyruvat ist, während die Methylgruppe des Methionins, Acetat und D-Glucose keine oder sehr schlechte Vorstufen dieser Verzweigung sind¹. Als unmittelbare Vorstufe für die Hydroxyäthylverzweigung postulierten wir *aktiven Acetaldehyd*.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über Versuche mit *ruhenden Zellen* von *Streptomyces lavendulae*, den Einbau von D-Glucose-[U-¹⁴C] und L-Äthionin in Aldgarose, über die Herkunft des cyclischen Carbonats der Aldgarose und über Versuche mit Hemmstoffen des Pyruvatstoffwechsels.

Material und Methoden

Markierte Verbindungen und Chemikalien

L-Äthionin-äthyl-[1,2-¹⁴C₂] stammte von CEA, 91-Gif-sur-Yvette, Frankreich. D-Glucose-[U-¹⁴C] und Pyruvat-[2-¹⁴C] wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen. Vor der Verwendung wurde durch Dünnschichtchromatographie und Radioaktivitätsbestimmung mit einem Dünnschichtscanner der Fa. Berthold (Wildbad, Schwarzwald) auf radiochemische Reinheit geprüft.

3-Fluorpyruvat stammte von der Schuchardt GmbH., München, Pyriethamin und Oxythiamin von der Sigma Co., St. Louis, MO, USA.

Inkubationen

Die Züchtung von *S. lavendulae* AL 471 (Fa. Lederle Co., Pearl River, N.J., USA) in einem Submersmedium aus Mannit, Trypton und Sojadialysat und die pulsweise Zugabe der in sterilem Wasser gelösten Vorstufen wurden früher beschrieben¹.

Zur Gewinnung von *ruhenden Zellen* wurde der Inhalt eines normalen Fermentationsansatzes (250 ml) nach 16,5 Stdn. Inkubation bei 10 000 g zentrifugiert und das Sediment 2-mal mit je 100 ml sterilem M/75 Phosphatpuffer von pH 7,6 gewaschen, wobei nach jedem Waschen bei 10 000 g zentrifugiert wurde. Das Mycel überführte man dann in einen 500 ml Kolben, der 100 ml M/75 Phosphatpuffer von pH 7,6, 100 mg Natriumacetat, 10 mg Propionsäure und 30 mg Glucose enthielt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Beim Einbauversuch mit 3-Fluorpyruvat wurden pro Kolben 20 mg der Verbindung zu Beginn der Inkubation mit *ruhenden Zellen* gleichzeitig mit dem Mycel zugegeben.

Auch bei den Hemmstoffversuchen mit den Antivitaminen erfolgte die Zugabe der Verbindungen gleichzeitig mit dem Mycel. Von Pyruvat-[2-¹⁴C] gab man je 15 µCi 5, 7, 9 und 11 Stdn. nach Überführung des Mycels in den Puffer zu den Kolben.

In allen Fällen wurde nach 22 Stdn. (= 38,5 Stdn. Gesamtinkubation) abgebrochen und aufgearbeitet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. GRISEBACH, Biologisches Institut II der Universität D-7800 Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9/11.

¹ R. SCHMID u. H. GRISEBACH, Europ. J. Biochem. **14**, 243 [1970].

Die Einbauversuche mit L-Äthionin-[äthyl- ^{14}C], $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, Glucose-[U- ^{14}C] und die Hemmstoffversuche mit Bisulfit wurden im Vollmedium durchgeführt.

Die Bioautogramme wurden nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung von Chalcomycin und Aldgamycin E (0,25 mm Kieselgel G/Merck, Laufmittel Essigsäureäthylester) durch Diffusion in Agar angefertigt, der mit *B. subtilis* (Bactisubtil, Merell-Iptor, Pharm. Gesellschaft mbH., Groß-Gerau) beimpft war².

Aufarbeitung und Abbaureaktionen

Die Extraktion der Antibiotika aus den Fermentationsansätzen, der Abbau von Aldgamycin E zu Methylalldgarosid und Methylmycinosid einerseits und zu Aldgamycin C und Mycinosyl-alldganolid andererseits sind bereits beschrieben¹. Die Bestimmung von Acetaldehyd aus C(1')-C(2') der Aldgarose und C(5)-C(6) der Mycinose erfolgte nach einer Modifikation der Methode von BHATTACHARYYA und AMINOFF^{3,1}. Die Bestimmung der D-(-)-3-Hydroxybuttersäure (C(3)-C(6) der Aldgarose) wurde nach papierelktrophoretischer Abtrennung der Säure⁴ vom Reaktionsgemisch in 0,1 M Ammoniumcarbonatpuffer von pH 9,0 durch Umsetzung mit D-(-)-3-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (Boehringer GmbH., Mannheim) und NAD und Messung des entstandenen NADH bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Eichkurve mit DL-3-Hydroxybuttersäure aufgenommen (Fa. Roth, Karlsruhe).

Die Bestimmung der Aktivität in der cyclischen Carbonatgruppe der Aldgarose wurde auf folgende Weise durchgeführt: In einem 250 ml Erlenmeyer mit Schliffstopfen und seitlichem Ansatz mit Gummikappe, in dem sich 5 mg Aldgamycin E und ein offenes, mit 5 ml 9-proz. methanolischer Äthanolamin-Lösung gefülltes Zählgläschen für Flüssigkeitsszintillationszählung befanden, injizierte man durch die Gummikappe 5 ml 0,5 N NaOH und nach einer Stunde bei Raumtemperatur 10 ml 0,5 N HCl. Der Kolben wurde nach 12 Std. Reaktionszeit geöffnet und in das Zählgläschen 15 ml Toluol-Cocktail gegeben.

Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten in Lösung mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler LS 100 der

Fa. Beckman. Als Szintillationslösungen wurden *Dioxan-Cocktail* (5 g PPO, 100 g Naphthalin, 1 l Dioxan) und *Toluol-Cocktail* (5 g PPO, 1 l Toluol) verwendet.

Die Quenchkorrektur erfolgte durch Zugabe von Toluol-[methyl- ^{14}C] bekannter spezifischer Aktivität.

Massenspektrometrie

Das Massenspektrum wurde mit einem SM-1-B-Gerät der Fa. Varian aufgenommen. Einzelheiten der Betriebsbedingungen und des Spektrums von Aldgamycin E wurden früher beschrieben¹.

Ergebnisse und Diskussion

1. Einbau von Pyruvat-[2- ^{14}C] in Aldgamycin bei ruhenden Zellen von *S. lavendulae*

Nach Inkubation von normalen Fermentationsansätzen von *S. lavendulae* mit Pyruvat-[2- ^{14}C] fanden sich 45% der Aktivität der Aldgarose in der Hydroxyäthylverzweigung. Wir hofften, daß mit ruhenden Zellen dieses Organismus ein noch ausgeprägter Einbau der C-Atome 2 und 3 des Pyruvats in die Verzweigung erfolgen würde. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse mit Normalkulturen und ruhenden Zellen zeigt Tab. 1. Entgegen den Erwartungen ist der Einbau des Pyruvats in die Verzweigung bei ruhenden Zellen nicht höher. Besonders viel Radioaktivität wird hierbei in den Makrolidring unbekannter Struktur eingebaut. Die beiden Zucker enthalten nur $\frac{1}{3}$ der Aktivität des Aldgamycins, wobei Aldgarose mehr als doppelt so stark markiert ist wie Mycinose. Fast die gesamte Differenz der Radioaktivität beider Zucker befindet sich in der Hydroxyäthylverzweigung der Aldgarose. Dieser Befund bekräftigt erneut die Herkunft dieser Struktur aus dem Pyruvatstoffwechsel.

Inkubationsmethode	Vorstufe	Einbaurrate in Aldgamycin E [%]	Mycinosid [%] ^a	Aldgarosid [%] ^b	C(1') - (2') aus Aldgarose [%] ^b	Aktivität im Mycel [%]
Vollmedium ¹	Pyruvat-[2- ^{14}C]	0,15	43	38	45 (16)	12
Ruhende Zellen	Pyruvat-[2- ^{14}C]	0,33	10	22	44 (10)	40

Tab. 1. Vergleich des Einbaus von Pyruvat-[2- ^{14}C] in die Zucker von Aldgamycin E bei wachsenden und ruhenden Zellen. ^a von Aldgamycin E. ^b von Aldgarose. Werte in Klammern Prozent von Aldgamycin E.

² K. H. WALLHÄUSER, in: E. STAHL: Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 541.

³ A. K. BHATTACHARYYA u. D. AMINOFF, Anal. Biochem. 14, 278 [1966].

⁴ D. GROSS, Chem. Ind. [London] 1959, 1219.

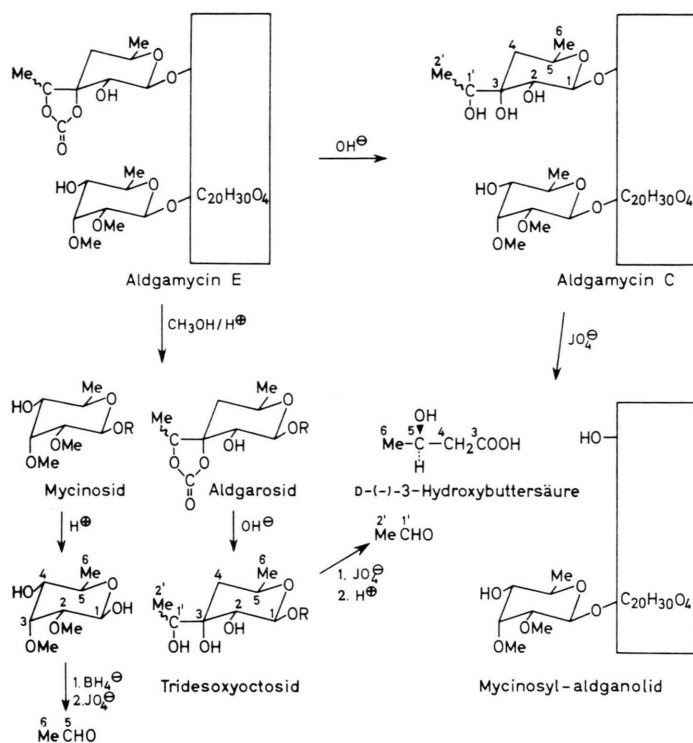


Abb. 1. Abbau von Aldgamycin E zur Lokalisierung der Radioaktivitätsverteilung.

2. Genauere Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in Aldgarose und Mycinoase mit D-Glucose-[U- ^{14}C] als Vorstufe

Bereits früher war gezeigt worden, daß Radioaktivität von D-Glucose-[U- ^{14}C] nur zu etwa 1% der Gesamtaktivität im Aldgamycin in die Hydroxyäthylseitenkette der Aldgarose eingebaut wird¹. Durch den in der Abb. 1 gezeigten Abbau wurde die Radioaktivitätsverteilung innerhalb von Aldgarose und Mycinoase nun genauer ermittelt. Die quantitative Bestimmung der beim Abbau mit Perjodat aus Aldgarose erhaltenen D(-)-3-Hydroxybuttersäure erfolgte mit D(-)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.30). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Während in der Hydroxyäthylseitenkette der Aldgarose nur etwa 4% der Aktivität bezogen auf diesen Zucker lokalisiert sind, finden sich

in den C-Atomen 3–6 der Aldgarose etwa 68% der Aktivität, was innerhalb der Fehlergrenzen dem berechneten Aktivitätsanteil für Gleichverteilung in der Hexosekette entspricht. Die Hexosekette der Aldgarose stammt daher erwartungsgemäß aus D-Glucose. Der Befund, daß aus Glucose-[U- ^{14}C] nur eine sehr geringe Aktivität in die Verzweigung eingebaut wird, während Pyruvat unter gleichen Bedingungen einen etwa 10-fach besseren Aktivitätseinbau in diese C-Atome zeigt, läßt auf einen sehr geringen glykolytischen Abbau der Glucose während der Inkubationsphase schließen.

3. Einbau von L-Äthionin-[äthyl-1,2- ^{14}C]

Die Methylgruppe des Methionins wird nicht in die Hydroxyäthylverzweigung der Aldgarose eingebaut¹. Obwohl eine C-Methylierung mit Äthionin

Vorstufe	Methylaldgarosid [%] ^a	C(1') – C(2') aus Aldgarose [%] ^b	C(3) – C(6) aus Aldgarose [%] ^b	Methylmycinosid [%] ^a	C(5) – C(6) aus Mycinoase [%] ^c
D-Glucose-[U- ^{14}C]	33	4	68	26	30

Tab. 2. Einbau von D-Glucose-[U- ^{14}C] in die Zucker aus Aldgamycin E. ^a von Aldgarose E. ^b von Aldgamycin. ^c von Mycinoase.

bisher nicht bekannt ist, sollte der Einbau von Äthionin in die Verzweigung der Aldgarose geprüft werden, da N- und S-Äthylierungen durch Äthionin bekannt sind. So wird bei Zugabe von Äthionin zu Fermentationsansätzen von *Streptomyces lincolnesis* ein abgewandeltes Linkomycin gebildet, das an Stelle der N- und S-Methylgruppen Äthylgruppen trägt⁵.

Zunächst wurde festgestellt, daß Konzentrationen von 0,25 μ Mol/ml Äthionin im Medium keinen Einfluß auf das Wachstum von *S. lavendulae* haben und auch in Gegenwart von Äthionin die Antibiotikumproduktion nicht gehemmt wird. Wie mit dem markierten Äthionin festgestellt wurde, wird diese Verbindung allerdings sehr schlecht von den Zellen aufgenommen. Nach 26 Stdn. betrug die Radioaktivitätsaufnahme durch das Mycel nur 9 Prozent. Die gemessene Einbaurate in Aldgamycin war 0,05 Prozent. Wegen des geringen Aktivitätseinbaus war die Bestimmung der Aktivität in der Verzweigung der Aldgarose sehr ungenau. In der Verzweigung des Zuckers fanden sich weniger als 10% der Gesamtaktivität des Aldgamycins. Dieses Ergebnis schließt aus, daß Äthionin eine Vorstufe für die Verzweigung der Aldgarose ist.

4. Einbau von Bicarbonat-[¹⁴C] in Aldgamycin

Unseres Wissens ist Aldgarose der bisher einzige bekannte Naturstoff mit einer cyclischen Carbonatgruppierung. Markiertes Acetat, Methionin, Äthionin, Glucose und Pyruvat gaben keinen spezifischen Aktivitätseinbau in das Carbonyl-C dieser Gruppierung¹. Bei Zusatz von Na-Bicarbonat zum Fermentationsmedium betrug die Einbaurate in Aldgamycin nur 0,02 Prozent. Dabei wurden aber auch nur 3% der angebotenen Radioaktivität am Ende der Inkubation wiedergefunden. Ursache hierfür dürfte das Entweichen von CO₂ aus der Lösung sein, da der

pH während der Fermentation unter 7 abfiel. Von der Aktivität im Aldgamycin (3,4 · 10⁶ dpm/mMol) befanden sich 45% (1,52 · 10⁶ dpm/Mol) in der cyclischen Carbonatgruppe. Daher dürfte gesichert sein, daß diese Gruppierung durch eine O-Carboxylierungsreaktion gebildet wird. Ob hierbei ein Biotin-Enzym beteiligt ist, soll im zellfreien System untersucht werden. Wahrscheinlich wird erst das fertig gebildete Aldgamycin C (Abb. 1) zu Aldgamycin E carboxyliert, da Aldgamycin C als Stoffwechselprodukt von *S. lavendulae* auftritt⁶.

5. Versuche mit Hemmstoffen

a) Oxythiamin und Pyrithiamin: Oxythiamin und Pyrithiamin sind Antivitamine des Vitamins B₁ und hemmen B₁-abhängige Reaktionen durch kompetitive Bindung an das Apoenzym⁷. Es wurden Inhibitorversuche im Vollmedium und mit *ruhenden Zellen* mit den in Tab. 3 angegebenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. In allen Fällen wurde zu verschiedenen Zeiten die Antibiotikabildung mit Hilfe der Bioautogramm-Technik untersucht. Immer wurde Aldgamycin E + Chalcocycin gebildet. Eine Hemmung der Aldgarose-Biosynthese konnte also unter unseren Bedingungen nicht festgestellt werden. Dies schließt die Beteiligung von TPP an der Biosynthese der Aldgarose jedoch nicht aus, da Oxythiamin und Pyrithiamin nur wirksam sind, wenn sie *in vivo* pyrophosphoryliert werden⁷. Ferner zeigen Mikroorganismen, die Thiamin selbst synthetisieren, eine stark verringerte oder keine Sensibilität gegenüber diesen Hemmstoffen^{7, 8}.

b) Bisulfit: Bei Vergärung von Rohrzucker durch Hefe läßt sich der Acetaldehyd als Bisulfit-Addukt abfangen⁹. Bei Auftreten von freiem Acetaldehyd bei der Biosynthese der Aldgarose sollte deren Synthese durch Bisulfitzusatz zum Medium

Pyrithiamin (Vollmedium)	M	4 · 10 ⁻⁷	8 · 10 ⁻⁷	4 · 10 ⁻⁶	8 · 10 ⁻⁶	1,2 · 10 ⁻⁵
Pyrithiamin (<i>ruhende Zellen</i>)	M	10 ⁻⁶	3 · 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	3 · 10 ⁻⁵	
Oxythiamin (<i>ruhende Zellen</i>)	M	10 ⁻³				

Tab. 3. Eingesetzte Konzentrationen von Vitamin B₁-Antagonisten.

⁵ A. D. ARGOUDELIS, T. E. EBLE u. D. J. MASON, J. Antibiotics [Tokyo] **23**, 1 [1970].

⁶ G. A. ELLESTAD, M. P. KUNSTMAN, J. E. LANCASTER, L. A. MITSCHER u. G. MORTON, Tetrahedron [London] **23**, 3893 [1967].

⁷ J. L. WEBB: Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. II, Academic Press, New York and London 1966, S. 514.

⁸ D. W. WOOLLEY u. A. G. C. WHITE, J. exp. Medicine **78**, 489 [1943].

¹¹ H. BOSCH u. P. V. NAIR, J. biol. Chemistry **229**, 377 [1957].

hemmbar sein. Bei Zugabe von 1, 2 und 4 Moläquivalent Kalziumsulfid pro Moläquivalent Kohlenstoffquelle (Mannit) des Fermentationsansatzes ließen sich durch Bioautogramm-Technik zu allen Zeiten Aldgamycin + Chalcomycin nachweisen. Eine Hemmung der Aldgarose-Biosynthese war also nicht zu beobachten.

Bei normalen Fermentationsansätzen wird von *S. lavendulae* parallel zu den Antibiotika ein braunes Melanin gebildet, das aus dem Tyrosinstoffwechsel stammt¹⁰. In Gegenwart von 4 Moläquivalent Kalziumsulfid/Mol Mannit wird die Bildung dieses Farbstoffes inhibiert. Der Fermentationsansatz färbt sich tiefgelb und zeigt ein Absorptionsmaximum von 354 nm. Das Maximum wird bei Zugabe von 1 N H₂SO₄ nach etwa 320 nm und nach Zugabe von 1 N NaOH nach etwa 375 nm in reversibler Weise verschoben. Die Reaktion mit FeCl₃ ist positiv. Die Natur dieses Farbstoffes wurde von uns nicht weiter untersucht.

c) Fluorpyruvat: Die Inhibitionswirkung von Fluorpyruvat auf die oxydative und reduktive

Umsetzung von Pyruvat wurde von mehreren Arbeitsgruppen in Leber- und Nierenhomogenaten¹¹ und in *E. coli* und *A. aerogenes*¹² bewiesen.

Demgegenüber konnten EISMAN et al.¹³ zeigen, daß reines Fluorpyruvat in geringen Konzentrationen von Rinderherz-LDH zu Fluorlactat umgewandelt wird. Wir versuchten, durch Gabe von Fluorpyruvat zu *ruhenden Zellen* von *S. lavendulae* Aldgamycin zu erhalten, das in der Hydroxyäthylverzweigung fluorierte Aldgarose enthält.

Nach Beendigung der Fermentation wurde das gebildete Aldgamycin E ohne Verdünnung durch Standard aus dem Medium isoliert, gereinigt und massenspektrometrisch vermessen. Dabei zeigte sich, daß die Verbindung kein Fluor enthielt.

Die Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie. Den Lederle Laboratories, Pearl River, USA, danken wir für die Überlassung des Streptomyces-Stammes und für Vergleichssubstanzen. Herrn Dr. H. ACHENBACH, Freiburg, danken wir für die Aufnahme des Massenspektrums.

⁹ C. V. NEUBERG u. E. REINFURTH, Ber. dtsch. chem. Ges. **52**, 1677 [1919].

¹⁰ J. R. MENCHER u. A. H. HEIM, J. gen. Microbiol. **28**, 665 [1962].

¹² J. MAGER u. I. BLANK, Nature [London] **173**, 127 [1954].

¹³ E. H. EISMAN, H. X. LEE JR. u. A. D. WINTER, Biochemistry **4**, 606 [1965].