

## Zur Spezifität der Nucleosidphosphorylasen

## Enzymatische Konfigurationsbestimmung von Nucleosiden

E. LODEMANN und A. WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main)

(Z. Naturforsch. **22 b**, 24–44 [1967]; eingegangen am 26. August 1966)

It is possible to determine the anomeric configuration of nucleosides by a simple, spectrophotometric assay, using the nucleoside phosphorylase activity of cell-free extracts from *E. coli*.  $\beta$ -nucleosides are split,  $\alpha$ -anomers remain unchanged. For a single estimation 20–40  $\mu\text{g}$  of nucleoside are required. 6-Azauracil- and 8-azaguanine- $\beta$ -D-ribose and some nucleoside phosphates are resistant, a fact, which is of interest in view of the specificity of nucleoside phosphorylasen.

Das Verfahren, nach dem erstmals der Beweis für die  $\beta$ -Konfiguration der natürlichen Nucleoside erbracht wurde, stammt von TODD und Mitarbeitern<sup>1</sup>. Durch Perjodat oxydation der Nucleoside wurden Dialdehyde gewonnen und mit den Dialdehyden aus den entsprechenden, synthetisch dargestellten Glucosiden verglichen.

Aus dem gleichen Arbeitskreis stammt das Verfahren der Darstellung von Cyclonucleosiden<sup>2–4</sup>. Die Cyclisierung zwischen der 5'-Hydroxylgruppe des Ribosidrestes und der 2-ständigen Hydroxylgruppe der (enolisierten) Pyrimidine bzw. dem N<sub>(3)</sub> der Purine (unter Kationenbildung) ist nur bei  $\beta$ -Konfiguration möglich.

Weitere Konfigurationsbeweise wurden erbracht durch Röntgenstrukturanalyse<sup>5</sup>, durch Bestimmung der Rotationsdispersion (positiver oder negativer Cotton-Effekt<sup>6–9</sup>), durch Auswertung der NMR-Spektren<sup>6, 10, 11</sup> und durch Überführung in Verbindungen mit bekannter Konfiguration<sup>12, 13</sup>.

Alle diese Verfahren haben entweder den Nachteil eines beträchtlichen apparativen Aufwands oder eines relativ hohen Substanzbedarfs. Da sich aber bei allen Desoxyribosidsynthesen die Frage nach der Konfiguration der erhaltenen Produkte erhebt, möchten wir auf ein einfaches, enzymatisches Verfahren hinweisen, das wir bereits seit einiger Zeit erfolgreich anwenden<sup>14</sup>.

Es handelt sich um die phosphorolytische Spaltung der  $\beta$ -Nucleoside in freie Base und  $\alpha$ -D-Ribose bzw. Desoxy- $\alpha$ -D-ribose-1-phosphat durch im zellfreien Extrakt von Mikroorganismen oder Säugetierzellen enthaltene Nucleosidphosphorylasen<sup>15–21</sup>. Wir benutzten für unsere Versuche Extrakte von *Escherichia coli*. Der Ablauf der Reaktion wurde spektrophotometrisch verfolgt, da die Spaltung der glykosidischen Bindung eine geringe, aber meßbare Verschiebung des Absorptionsmaximums des Aglykons zur Folge hat. Der Substanzbedarf beträgt 20–40  $\mu\text{g}$ , die Reaktionsdauer 1–2 Stunden. Alle unter-

<sup>1</sup> J. DAVOLL, B. LYTGOE u. A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1946**, 833.

<sup>2</sup> V. M. CLARK, A. R. TODD u. J. ZUSSMAN, J. chem. Soc. [London] **1951**, 2952.

<sup>3</sup> A. M. MICHELSON u. A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] **1955**, 816.

<sup>4</sup> A. M. MICHELSON, The Chemistry of the Nucleosides and Nucleotides, Academic Press, London-New York 1963, S. 15.

<sup>5</sup> S. FURBERG, Acta crystallogr. [Copenhagen] **3**, 325 [1950].

<sup>6</sup> R. U. LEMIEUX u. M. HOFFER, Can. J. Chem. **39**, 110 [1961].

<sup>7</sup> T. L. V. ULBRICHT, J. P. JENNINGS, P. M. SCOPES u. W. KLYNE, Tetrahedron Letters [London] **1964**, 695.

<sup>8</sup> T. R. EMERSON, R. J. SWAN u. T. L. V. ULBRICHT, Biochem. biophysic. Res. Commun. **22**, 505 [1966].

<sup>9</sup> T. L. V. ULBRICHT, T. R. EMERSON u. R. J. SWAN, Tetrahedron Letters [London] **1966**, 1561.

<sup>10</sup> R. U. LEMIEUX, Can. J. Chem. **39**, 116 [1961].

<sup>11</sup> Z. SAMEK u. J. FARKAS, Coll. Czechoslovak. Chem. Comm. **30**, 2149 [1965].

<sup>12</sup> R. BROSSMER u. E. RÖHM, Angew. Chem. **76**, 50 [1964].

<sup>13</sup> M. PRYSTAS u. F. SORM, Coll. Czechoslovak. Chem. Comm. **31**, 1053 [1966].

<sup>14</sup> E. LODEMANN, Dissertation, Technische Hochschule München 1963.

<sup>15</sup> H. M. KALCKAR, J. biol. Chemistry **167**, 429 [1947].

<sup>16</sup> R. S. WRIGHT u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **78**, 811 [1956].

<sup>17</sup> G. M. TENER, R. S. WRIGHT u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **79**, 441 [1957].

<sup>18</sup> Y. TAKAGI u. B. L. HORECKER, J. biol. Chemistry **225**, 77 [1957].

<sup>19</sup> M. HOFFER, Chem. Ber. **93**, 2777 [1960].

<sup>20</sup> G. D. BIRNIE, H. KROEGER u. CH. HEIDELBERGER, Biochemistry **2**, 566 [1963].

<sup>21</sup> A. CIHAK u. F. SORM, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **30**, 672 [1964].

suchten natürlichen Ribo- und Desoxyribofuranoside (Guanin-, Adenin-, Uracilribosid und -desoxyribosid, Thymidin) sowie einige unnatürliche Desoxyriboside (5-Bromuracil-, 5-Joduracil- und Naphtho[2.1-d]imidazol-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribosid<sup>14</sup>) wurden gespalten. Cytidin und Cytosindesoxyribosid wurden ebenfalls phosphorolytisch gespalten, jedoch unter gleichzeitiger Desaminierung zu Uracil, wie die Veränderungen des Spektrums zeigten und auch aus

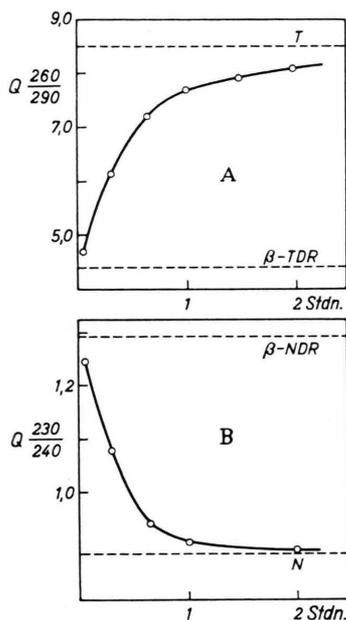


Abb. 1. Spaltung von  $\beta$ -Thymidin und  $\beta$ -Naphthoimidazol-desoxyribosid durch Nucleosidphosphorylasen eines zellfreien Extraktes von *E. coli*. A) Ordinate: Quotient aus Extinktion 260  $m\mu$  : Extinktion 290  $m\mu$ . T: Wert für Thymidin;  $\beta$ -TDR: Wert für Thymin-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribosid. Abszisse: Inkubationszeit in Stunden. B) Ordinate: Quotient aus Extinktion 230  $m\mu$  : Extinktion 240  $m\mu$ . N: Wert für Naphthoimidazol;  $\beta$ -NDR: Wert für Naphthoimidazol-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribosid. Abszisse: Inkubationszeit in Stunden.

Arbeiten von LAMPEN<sup>22, 23</sup> bekannt ist. Nicht gespalten wurden Thymin- und Naphtho[2.1-d]imidazol-2'-desoxy- $\alpha$ -D-ribosid und 5.6-Dimethylbenzimidazol- $\alpha$ -D-ribosid, sowie die Glucoside von Naphtho- und Benzimidazol. Nicht gespalten wird außerdem 6-Azauracil- $\beta$ -D-ribosid, was bereits früher von HEIDELBERGER<sup>20</sup> bei Versuchen mit Extrakten aus Ehrlich-Ascites-Zellen festgestellt wurde. Auch 8-Azaguanin

$\beta$ -D-ribosid wird durch den zellfreien Extrakt von *E. coli* nur in sehr schwachem Maße gespalten. Diese Resistenz kann nicht auf eine höhere Stabilität der N-glykosidischen Bindung zurückgeführt werden, da wir für 6-Azauridin bei Säurebehandlung die gleiche Hydrolysegeschwindigkeit festgestellt haben wie für Uridin. Man kann daher annehmen, daß die Nucleosidphosphorylasen spezifisch auf Veränderungen in der Nähe des glykosidischen Zentrums reagieren (Azauridin, Azaguanin), nicht dagegen auf Veränderungen am Pyrimidinring des Puringerüsts (Naphthoimidazol).

Eine unterschiedliche Spezifität der Nucleosidphosphorylasen zeigt sich bei ihrer Einwirkung auf Mononucleotide. Während Adenyl- und Guanylsäure – wenn auch langsamer als die Nucleoside – gespalten werden, sind Cytidyl-, Desoxycytidyl- und Thymidylsäure resistent. Bei der Konfigurationsbestimmung von Mononucleotiden ist daher die vorherige Spaltung mit Phosphomonoesterase empfehlenswert. Eine eventuelle Beständigkeit von 5'-Nucleotiden gegen die 5'-Phosphomonoesterase aus Schlangengift kann unter Umständen ebenfalls ein Hinweis auf das Vorliegen einer  $\alpha$ -Konfiguration sein<sup>24</sup>, jedoch ist z. B. auch von Orotidin-5'-phosphat ( $\beta$ -Form) bekannt, daß es durch dieses Enzym nicht gespalten wird<sup>25</sup>.

### Versuchsdurchführung

Die Zellen aus einer 100-ml-Kultur von *E. coli* B oder *E. coli* K<sub>12</sub> werden am Ende der log. Phase geerntet und homogenisiert (Ultraschall oder andere Verfahren). Nach Zentrifugation erhält man ca. 3 ml zellfreien Extrakt, der tiefgefroren längere Zeit haltbar ist.

Zu 2 ml der Lösung des zu untersuchenden Nucleosids (Extinktion bei  $\lambda_{\max} \approx 0,7$ ) in 0,1-m. Phosphatpuffer  $p_H = 7$  werden 0,5 ml des 1:50 mit Phosphatpuffer verdünnten zellfreien Extrakts gegeben. Die Extinktion der Vergleichslösung (2 ml Puffer + 0,5 ml Enzymlösung), gegen Puffer gemessen, beträgt bei 260  $m\mu$  etwa 0,100. Die Spaltung kann in thermostatisierten Quarzküvetten oder einfacher in Quarzküvetten im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt werden. Verfolgt wird die Änderung des Quotienten der Extinktionen bei zwei geeignet gewählten Wellenlängen, z. B. bei Thymidin 260 und 290  $m\mu$  (vgl. Abb. 1). Die

<sup>22</sup> T. P. WANG, H. Z. SABLE u. J. O. LAMPEN, J. biol. Chemistry **184**, 17 [1950].

<sup>23</sup> L. A. MANSON u. J. O. LAMPEN, J. biol. Chemistry **193**, 539 [1951].

<sup>24</sup> M. IKEHARA, E. OTHSUKA, E. HONDA u. A. NOMURA, J. org. Chemistry **30**, 1077 [1965].

<sup>25</sup> J. G. MOFFATT, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1118 [1963].

Abspaltung von Guanin, Adenin, Uracil, 5-Bromuracil und 5-Joduracil wurde bei 260 und 280  $m\mu$ , von Cytosin bei 265 und 280  $m\mu$ , von Naphthoimidazol bei 230 und 240  $m\mu$ , von 5,6-Dimethylbenzimidazol bei 245 und 260  $m\mu$ , von 6-Azauracil bei 250 und 280  $m\mu$  und von 8-Azaguanin bei 255 und 275  $m\mu$  verfolgt. Eine Inkubationsdauer von 60 Min. reicht im allgemeinen vollständig, um einen deutlichen Effekt zu erhalten. Bei

längerer Inkubation (3 Stdn.) überlagern sich z. B. bei Thymidin andere, langsamer verlaufende Reaktionen.

Wir danken Herrn Dr. D. GRÜNBERGER für die Überlassung von 8-Azaguanosin, Herrn Dr. H. DELLWEG für die Isolierung von  $\alpha$ -Ribazolphosphat aus Vitamin B<sub>12</sub> und Herrn Dr. K. GAURI für die Synthese von  $\alpha$ -Thymidin nach HOFFER<sup>19</sup>.

## The Role of General Metabolites in the Biosynthesis of Natural Products

### I. The Terpene Marrubiin

ALBERTO BRECCIA and ROBERTO BADIELLO

Istituto Chimico „G. Ciamician“ dell'Università di Bologna (Italy)  
Centro Nazionale di Chimica delle Radiazioni e dei Radioelementi del C.N.R. Sezione III —  
Bologna (Italy)

(Z. Naturforschg. 22 b, 44—49 [1967]; eingegangen am 28. Juli 1966)

The biosynthesis of the diterpene marrubiin has been studied using some labelled possible precursors: [2-<sup>14</sup>C] mevalonate, [1-<sup>14</sup>C] acetate, [2-<sup>14</sup>C] acetate, [2-<sup>14</sup>C] pyruvate, [2,3-<sup>14</sup>C] succinate, [1,4-<sup>14</sup>C] succinate, [5-<sup>14</sup>C] ketoglutarate and [1,5-<sup>14</sup>C] citrate. Metabolism times of 24, 36, 48, 72 and 96 hours were used. The labelled compounds were supplied in solution to flowering white horehound (*Marrubium vulgare* L.), cut at the base of the stem.

The incorporation results indicate that marrubiin undergoes a rapid turnover with a biological half life of about 24 hours. The rate of up-take of <sup>14</sup>C from the precursors is in the following order: [2-<sup>14</sup>C] mevalonate, [2-<sup>14</sup>C] acetate, [1-<sup>14</sup>C] acetate, [2-<sup>14</sup>C] pyruvate and [2,3-<sup>14</sup>C] succinate. Incorporation of <sup>14</sup>C from the other compounds is negligible. If [2-<sup>14</sup>C] mevalonate is used, labelled marrubiin is formed 10—100 times more active than with the other precursors.

The results suggest that all the precursors are degraded to acetic units through the Krebs cycle before their utilization, with the exception of mevalonate.

Some samples of marrubiin(I) have been degraded chemically to the corresponding keto-derivative(II), in order to determine the distribution of radioactivity between the decahydro-naphthalenic and furanic parts. The results are in good agreement with the distribution of the radioactivity in the molecule, as expected from the terpenoid structure of marrubiin.

Marrubiin is the bitter principle of the white horehound (*Marrubium vulgare* L; fam. Labiatae/Marrubiae), a plant that grows in dry areas. It also occurs widely in other higher plants.

The structure of this compound was elucidated only in 1953 by COCKER and al.<sup>1</sup> on the basis of spectroscopic and degradation studies. Though confirmation of the direct chemical synthesis is still lacking, marrubiin has been assigned the formula I, corresponding to a furanoid diterpene. The function of substances of this type in plants is still unknown, and little is known of the mechanism of their formation in plant tissues.

The general scheme of the biosynthesis of natural products with terpenoid and steroid structures is linked with the theory formulated by RUZICKA<sup>2</sup> under the name of the biogenetic law of active isoprene.

Whereas the literature contains a considerable amount of information on the biosynthesis of the animal sterols<sup>3</sup>, it contains much less on the biosynthesis of typical sterols<sup>3</sup> and terpenes<sup>4</sup> of higher plants.

In the preliminary investigation into the mechanism of formation of marrubiin<sup>5</sup>, the incorporation of some simple precursors such as [1-<sup>14</sup>C] acetate,

<sup>1</sup> W. COCKER, B. E. CROSS, S. R. DUFF, J. T. EDWARD, and T. F. HOLLEY, J. chem. Soc. 1953, 2540.

<sup>2</sup> L. RUZICKA, H. HEUSSER, and A. ESCHENMOSER, Experientia [Basel] 9, 537 [1953]; A. ESCHENMOSER, L. RUZICKA, O. JEGER u. D. ARIGONI, Helv. chim. Acta 38, 1850 [1955]; L. RUZICKA, Proc. chem. Soc. [London] 1959, 341.

<sup>3</sup> E. STAPLE, The Biosynthesis of Steroids in "Biogenesis of Natural Compounds" p. 155 ed. P. BERNEFELD, Pergamon Press, Oxford 1963.

<sup>4</sup> H. J. NICHOLAS, The Biogenesis of Terpenes in Plants in "Biogenesis of Natural Compounds" p. 641 ed. P. BERNEFELD, Pergamon Press, Oxford 1963.

<sup>5</sup> A. ABBONDANZA, A. BRECCIA, and A. CRESPI, Proc. of the 1964 Venice International Symposium on the Preparation and Bio-medical Application of labelled Molecules p. 95, Euratom, Bruxelles 1964; A. ABBONDANZA, R. BADIELLO, and A. BRECCIA, Tetrahedron Letters 48, 4337 [1965].