

gehört wohl nicht zu den „echten“ Öffnungen aromatischer Ringe. Nach den Studien von O. Gerngross⁷¹⁾ geht der Ringöffnung eine Hydroxyl-Addition an die Stellung 2 des 1,3-Dibenzoyl-imidazolium-Ions voraus.

Obwohl die Anregung mit ultraviolettem Licht den Energiebedarf selbst hoher Aktivierungsschwellen zu decken vermag, ist die Zahl der bekannten photochemischen Öffnungen aromatischer Ringe sehr begrenzt. Zu den wenigen Beispielen gehört die Photolyse der 1,2,3-Thiodiazole unter Stickstoff-Entbindung; W. Kirmse und L. Horner⁷²⁾ isolierten Umwandlungsprodukte eines intermediären Carbens.

⁷¹⁾ O. Gerngross, Ber. dtsch. chem. Ges. 46, 1913 [1913].

⁷²⁾ W. Kirmse u. L. Horner, Liebigs Ann. Chem. 614, 4 [1958].

Mit aufrichtigem Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der chemischen Industrie für die Förderung der Arbeiten unseres Laboratoriums darf ich den an tüchtige Mitarbeiter verbinden: Dr. I. Ugi hat sich des Pentazol-Problems mit großer Selbständigkeit angenommen. Die Ringöffnungen in der Tetrazol- und Triazol-Reihe wurden mit Fleiß und großem Geschick von Dr. J. Sauer, M. Seidel und H. J. Sturm untersucht. Den European Research Associates, Brüssel, gebührt Dank für die Gewährung eines Stipendiums.

Eingegangen am 29. Februar 1960 [A 30]

Lipoide der Mycobakterien*) Chemische Struktur und biologische Wirkung

Von Prof. Dr. E. LEDERER

Institut de Biologie physicochimique, Paris

Bei den Lipoiden der Mycobakterien lassen sich drei große Gruppen unterscheiden: Fette, Phospholipoide und Wachse. Es sind vor allem Ester verzweigter Fettsäuren mit Zuckern, Zuckeralkoholen, Glycerin und höhermolekularen, verzweigten, aliphatischen Alkoholen. Besonders interessante Substanzen sind der toxisch wirkende Cord-Faktor und die D-Wachse. Die Struktur des Cord-Faktors konnte durch Abbau und Synthese gesichert werden. Es handelt sich um ein Trehalose-6,6'-dimycolat. Molekulargewicht und Zusammensetzung der D-Wachse variieren mit dem Bakterienstamm, aus dem sie isoliert werden. Sie bestehen je zur Hälfte aus Mycolsäuren und einem stickstoff-haltigen Polysaccharid. Die D-Wachse humarer Stämme zeigen Adjuvanzwirkung.

1. Einleitung

Wird ein gesundes Tier mit Tuberkulose-Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) infiziert, so treten nach einiger Zeit pathologische Veränderungen auf: die Bildung von Tuberkeln, eine verzögerte oder Tuberkulin-Allergie, Vergiftungs-Erscheinungen, vermehrte Bildung von Antikörpern und Resistenz gegen Neuinfektion. Der größte Teil dieser pathologischen Veränderungen geht auf Lipoid-Substanzen in den Bakterien zurück, deren chemische Struktur wir durch unsere 1947 begonnenen Untersuchungen teilweise aufklären konnten¹⁾.

2. Chemie der Lipoide aus Mycobakterien

R. J. Anderson²⁾ beschrieb zwischen 1926 und 1946 eine große Anzahl aus Tuberkel-Bakterien isolierter Lipoide. Das wichtigste Ergebnis war dabei, daß die Mycobakterien im Gegensatz zu anderen niederen und höheren Organismen Fettsäuren mit langen, verzweigten Kohlenstoffketten synthetisieren.

Substanzen mit Methyl-Seitenketten

Die wichtigsten Verbindungen mit einer einzigen Methyl-Verzweigung sind Tuberculostearinsäure und Phthiocerol. Beiden schreibt man heute keine biologische Aktivität zu.

Die Tuberculostearinsäure ($C_{19}H_{38}O_2$, $F_p = 11^\circ C$) wurde von Anderson und Chargaff³⁾ im humaren Stamm H 37 entdeckt. Sie findet sich in allen Mycobakterien-Stämmen. Nach Arbeiten von Spielman⁴⁾, Ställberg-Stenhagen⁵⁾, Prout, Cason, Ingersoll⁶⁾ und

*) Erweiterte Fassung eines Vortrages beim Symposium der Academia dei Lincei, Varenna, Sept. 1958.

**) E. Lederer: Sur quelques problèmes chimiques concernant la tuberculose. Exposés de Biochimie médicale. Masson, Paris 1958.

**) R. J. Anderson, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 3, 145 [1939]; Harvey Lectures 35, 271 [1939]; Chem. Reviews 29, 225 [1941]; Yale J. Biol. Med. 15, 311 [1943].

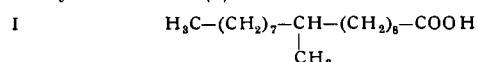
**) R. J. Anderson u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 85, 77 [1929].

**) M. A. Spielman, J. biol. Chemistry 106, 87 [1934].

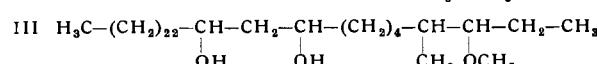
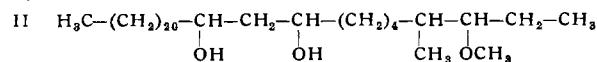
**) S. Ställberg-Stenhagen, Ark. Kemi., Mineralog. Geol., Ser. A 26, Nr. 12 [1948].

**) F. S. Prout, J. Cason u. A. W. Ingersoll, J. Amer. chem. Soc. 69, 1233 [1947]; 77, 298 [1949].

Linstead, Lunt, Weedon⁷⁾ hat sie die Struktur einer α -(-)-10-Methyl-stearinsäure (I).



Das Phthiocerol ($F_p = 72^\circ C$, $[\alpha]_D = -5^\circ$) wurde 1934 von Stendal⁸⁾ entdeckt. An seiner Strukturaufklärung arbeiteten Stodola und Anderson⁹⁾, Stenhagen und Ställberg-Stenhagen¹⁰⁾, Polgar¹¹⁾ und – in unserem Laboratorium – Demarteau-Ginsburg¹²⁾. Zunächst nahm man an, Phthiocerol sei einheitlich; eine genaue Analyse der Oxydationsprodukte ließ aber vermuten, daß es sich um ein Gemisch zweier homologer Glykole, $C_{34}H_{70}O_3$ (II) und $C_{36}H_{74}O_3$ (III), handelt.



Diese Vermutung ließ sich bestätigen, denn Phthiocerol konnte zu einem Kohlenwasserstoff, Phthioceran, reduziert werden, dessen Gaschromatogramm zwei Komponenten anzeigte: Die erste war identisch mit 4-Methyl-dotriacantan, $C_{33}H_{68}$, die zweite mit 4-Methyl-tetraacantan, $C_{35}H_{72}$. Beide Verbindungen konnten durch Gaschromatographie isoliert und ihr Molekulargewicht durch Massenspektroskopie bestimmt werden^{13,14)}.

Phthiocerol wird häufig von einigen ähnlichen Verbindungen begleitet, die wir Phthiocerolon, Phthiodiolon und Phthiotriol genannt haben¹⁵⁾. Phthiocerolon, $C_{36}H_{72}O_3$, besitzt eine Methoxyl-, eine Hydroxyl- und eine Carbonyl-Gruppe. Unveröffentlichte Versuche von Stenhagen zeigten, daß es die Gruppierung

7) R. P. Linstead, J. C. Lunt u. B. L. C. Weedon, J. chem. Soc. [London] 1950, 3331.

8) N. Stendal, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 198, 1549 [1936].

9) F. H. Stodola u. R. J. Anderson, J. biol. Chemistry 114, 467 [1936].

10) R. Ryhage, E. Stenhagen u. E. v. Sydow, Acta chem. scand. 10, 158 [1956]. S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen, J. biol. Chemistry 173, 383 [1948].

11) J. A. Hall, J. W. Lewis u. N. Polgar, J. chem. Soc. [London] 1956, 3971; N. Polgar, ebenda 1954, 1011.

12) H. Demarteau-Ginsburg, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 243, 2169 [1956]; H. Demarteau-Ginsburg u. E. Lederer, ebenda 240, 815 [1955].

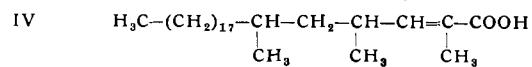
13) H. Demarteau-Ginsburg, E. Lederer, R. Ryhage, S. Ställberg-Stenhagen u. E. Stenhagen, Nature [London] 183, 1117 [1959].

14) E. Stenhagen, S. Ställberg-Stenhagen, R. Ryhage, L. Ahlquist u. E. v. Sydow, Ark. Kemi 14, 211, 247, 259 [1959].

15) H. Demarteau-Ginsburg, A. Ginsburg u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 12, 587 [1953].

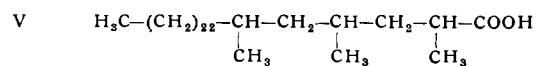
$-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ und — anstelle der β -Glykol-Gruppe des Phthiocerols — die Anordnung $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ enthält. Phthiodiolon, $\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{O}_3$, besitzt zwei Hydroxyl-Gruppen und eine Carbonyl-Gruppe. Es kann zu einem Triol reduziert werden, das mit dem identisch zu sein scheint, welches bei der Demethylierung des Phthiocerols entsteht, vom Phthiotriol, $\text{C}_{35}\text{H}_{72}\text{O}_3$, jedoch verschieden ist. Die Struktur des Phthiotriols konnte noch nicht ermittelt werden.

Verbindungen mit mehreren Methyl-Verzweigungen: Anderson und Chargaff¹⁶⁾ hatten eine flüssige, rechtsdrehende Säure isoliert, die sie Phthionsäure nannten und der sie die Formel $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_2$ zuschrieben. Neuere Arbeiten von Polgar¹⁷⁾ und Cason^{18, 19)} zeigten aber, daß Phthionsäure ein Gemisch homologer, ungesättigter Fettsäuren mit 23 bis 31 C-Atomen ist. Eine dieser Fettsäuren (C_{27}) wurde genauer untersucht. Sie ist heute unter dem Namen C_{27} -Phthiensäure (Cason¹⁸⁾, Stenhagen²⁰⁾) oder Mycolipensäure (Polgar¹⁷⁾) bekannt. Die analytischen Arbeiten von Polgar führten zur Strukturaufklärung dieser Säure (IV); die Formel wurde durch Synthesen bestätigt²⁰⁾.

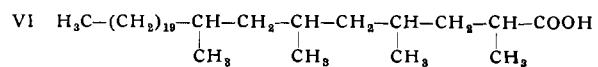


Die Einwände von Cason und Mitarb.²¹⁾ gegen diese Formel scheinen eine andere Säure zu betreffen, welche die C_{27} -Phthiensäure begleitet.

Neben den α, β -ungesättigten Phthiensäuren hatte schon Anderson²²⁾ eine linksdrehende, gesättigte Säure mit höherem Molekulargewicht isoliert, die er Mycocerosinsäure nannte. Die Struktur (V) mit der Summenformel $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$ hatten zuerst Polgar²³⁾ und dann auch Asselineau, Ryhage und Stenhagen²⁴⁾ vorgeschlagen. Polgar nannte die Säure Mycoceransäure.



Vor kurzem synthetisierten Asselineau und Mitarb.²⁵⁾ die $(-)$ -2D,4D,6D-Trimethyl-nonacosansäure (VI), die aber nicht mit der natürlichen Mycocerosinsäure identisch ist. Eine Untersuchung der Massenspektren der natürlichen und synthetischen Säuren ergab, daß in den humanen Stämmen Test und Canetti normale Säuren mit 22, 24, 26 und 28 Kohlenstoff-Atomen, 2,4,6-Trimethylsäuren mit 25, 27 und 29 Kohlenstoff-Atomen und 2,4,6,8-Tetramethylsäuren mit 30, 32 und 34 Kohlenstoff-Atomen enthalten sind. Die C_{32} -Mycocerosinsäure ist demnach eine 2,4,6,8-Tetramethyl-octacosansäure (VI).

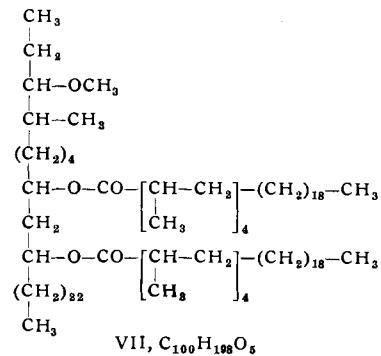


Nach diesen Ergebnissen ist es naheliegend anzunehmen, daß die methyl-verzweigten Säuren in vivo durch C-Methylierung von Poly- β -ketosäuren synthetisiert werden²⁶⁾.

Der größte Teil der Mycocerosinsäure liegt im Tuberkel-Bakterium mit Phthiocerol verestert als Phthioceryl-dimycocerosat (VII) vor; diese Verbindung ist charakteristisch für humane und bovine Stämme von *M. tuberculosis*^{27, 28)}.

- ¹⁶⁾ R. J. Anderson u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 85, 77 [1929].
- ¹⁷⁾ J. D. Chanley u. N. Polgar, Nature [London] 166, 693 [1950].
- ¹⁸⁾ J. Cason, N. K. Freeman u. G. Sumrell, J. biol. Chemistry 192, 415 [1951]; J. Cason u. G. Sumrell, ebenda 192, 405 [1951].
- ¹⁹⁾ J. Cason u. G. J. Fonken, J. biol. Chemistry 220, 391 [1952].
- ²⁰⁾ C. Asselineau, J. Asselineau, u. S. Stälberg-Stenhagen, Acta chem. scand. 10, 478, 1035 [1956].
- ²¹⁾ J. Cason, H. R. Urscheler u. C. F. Allen, J. org. Chemistry 22, 1284 [1957].
- ²²⁾ R. J. Anderson, vgl.^{2).}
- ²³⁾ N. Polgar, J. chem. Soc. [London] 1954, 1011. N. Polgar u. G. S. Marks, ebenda 1955, 3851.
- ²⁴⁾ J. Asselineau, R. Ryhage u. E. Stenhagen, Acta chem. scand. 11, 196 [1957].
- ²⁵⁾ C. Asselineau, J. Asselineau, R. Ryhage, S. Stälberg-Stenhagen u. E. Stenhagen, Acta chem. scand. 13, 822 [1959].
- ²⁶⁾ A. J. Birch, Progr. Chim. Subst. Org. Nat. 14, 186 [1957].
- ²⁷⁾ H. Noll, J. biol. Chemistry 224, 149 [1957].
- ²⁸⁾ D. W. Smith, H. M. Randall, M. Gastambide-Odier u. A. L. Koekoek, Ann. New York Acad. Sci. 69, 145 [1957].

Die Phthien- und Mycocerosinsäuren sind für die Tuberkel-Bildung verantwortlich (vgl. weiter unten).



Substanzen mit langen Seitenketten

Mycolsäuren der Tuberkel-Bakterien²⁹⁾

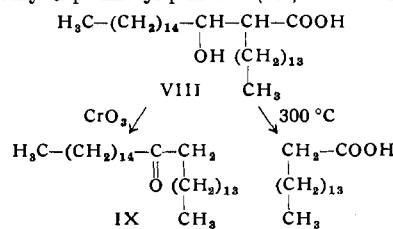
Stodola, Lesuk und Anderson³⁰⁾ beschrieben 1938 eine Mycolsäure, die aus einem humanen Tuberkel-Bakterium isoliert worden war. Sie schmilzt bei 55°C , hat die spezifische Drehung $[\alpha]_D = + 2,5^\circ$ und die Summenformel $\text{C}_{88}\text{H}_{178}\text{O}_4$. Sie enthält eine Carboxyl-, eine Hydroxyl- und eine Methoxyl-Gruppe; durch Pyrolyse entsteht aus ihr die normale Hexacosansäure.

Zusammen mit Asselineau^{31, 32)} begannen wir 1947 mit Struktur-Untersuchungen an den Mycolsäuren. Wir konnten zunächst zeigen, daß man durch Chromatographie an Aluminiumoxyd mehrere Hydroxsäuren erhält, die sich durch Schmelzpunkt sowie Zahl und Art der funktionellen Gruppen unterscheiden. Diese Säuren besitzen alle die Gruppierung $\text{R}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{C}_{24}\text{H}_{49})-\text{COOH}$, die bei der Pyrolyse zu den Verbindungen $\text{R}-\text{CHO}$ und $\text{C}_{24}\text{H}_{49}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ führt. Der Rest R bedeutet $\text{C}_{60}\text{H}_{121}$. Er enthält drei Kohlenstoff-Ketten und zusätzlich entweder eine Hydroxyl-, eine Methoxyl- oder eine Keto-Gruppe. (Einzelheiten zur Chemie der Mycolsäuren findet man unter^{33, 34)}).

Mycolsäuren der Diphtherie-Bakterien

Gemeinsam mit Pudles zeigten wir, daß in den Lipoiden der Diphtherie-Bakterien (*Corynebacterium diphtheriae*) zwei C_{32} -Säuren enthalten sind: Corynomycolsäure (VIII) ($\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_3$, $\text{Fp} = 71^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = + 7,5^\circ$ ^{35, 36)}, und die flüssige Corynomycolsäure (XIII) ($\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_3$, $[\alpha]_D = + 9^\circ$ ^{37, 38)}).

Die Struktur der Corynomycolsäure (VIII) folgt aus der Pyrolyse zu Palmitinsäure, aus der Chromsäureoxydation, bei der Palmiton (IX) erhalten wird, und aus der Oxydation des Methylesters zu Methyl- α -palmitoyl-plamitat (XI, $\text{R} = \text{OCH}_3$).



²⁹⁾ Mycolsäuren nennen wir solche Säuren, die in α -Stellung eine lange aliphatische Kette und in β -Stellung eine Hydroxyl-Gruppe besitzen³¹⁾.

³⁰⁾ A. Lesuk u. R. J. Anderson, J. biol. Chemistry 126, 505 [1938]; 136, 603 [1940]; F. H. Stodola, A. Lesuk u. R. J. Anderson, ebenda 126, 505 [1938].

³¹⁾ J. Asselineau u. E. Lederer, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 228, 1892 [1949].

³²⁾ J. Asselineau u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 7, 126 [1951].

³³⁾ J. Asselineau u. E. Lederer, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 10, 170 [1953].

³⁴⁾ a) J. Asselineau u. E. Lederer: Experimental Tuberculosis, A Ciba Foundation Symposium, J. & A. Churchill, London 1955, S. 14. — b) E. Lederer in: Colloquium on Chemotherapy of Tuberculosis, Medical Research Council of Ireland, Dublin 1952, S. 1. — c) E. Lederer, Vortrag vor dem 2. Intern. Kongr. für Biochemie, Paris 1952.

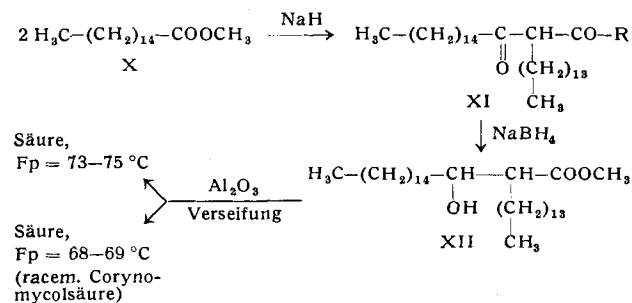
³⁵⁾ E. Lederer u. J. Pudles, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 1003 [1951].

³⁶⁾ E. Lederer, J. Pudles, S. Barbezat u. J. J. Trillat, Bull. Soc. chim. France 1952, 93.

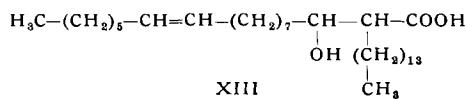
³⁷⁾ J. Pudles u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 11, 163 [1953].

³⁸⁾ J. Pudles u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. France 1954, 919.

Diese Struktur konnten wir durch Synthese bestätigen^{39, 40}: Zwei Moleküle Methyl-palmitat (X) werden nach Hansley⁴¹) in Gegenwart von Natriumhydrid zu Methyl- α -palmitoyl-palmitat (XI, R = OCH₃) kondensiert. Die Reduktion des β -Ketoesters mit NaBH₄ führt zu zwei Diastereomeren (XII), die man an Aluminiumoxyd trennen kann. Nach der Verseifung erhält man zwei Säuren (Fp = 75 °C und 69 °C). Die tiefer schmelzende Säure ist das Racemat der Corynomycolsäure (VIII).



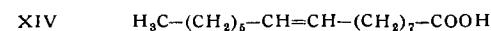
Die Struktur der Corynomycoleinsäure (XIII) folgt aus der Pyrolyse, die auch hier Palmitinsäure ergibt, aus der Hydrierung zu Corynomycolsäure (VIII) und aus der Ozon-Spaltung, bei der Önansäure entsteht. Außerdem gelang die Synthese⁴².



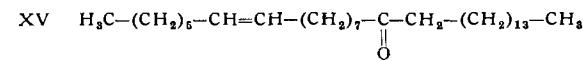
Biosynthese der Mycolsäuren in Diphtherie-Bakterien

Es fällt auf, daß man unter den niederen Fettsäuren der Diphtherie-Bakterien vor allem Palmitin- und Palmitoleinsäure (XIV) findet. Wir machen uns daher für die Biosynthese der Mycolsäuren in Diphtherie-Bakterien folgende Arbeitshypothese:

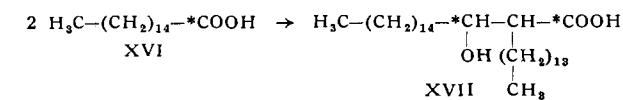
Zwei Moleküle Palmitinsäure (wahrscheinlich als Palmitoyl-CoA) kondensieren sich zu α -Palmitoyl-palmitat (XI, R = S-CoA). Reduktion der Ketogruppe ergäbe dann die Corynomycolsäure (VIII). Wird der β -Ketoester verseift – in vivo oder auf der Aluminiumoxyd-Säule – so erhält man durch Decarboxylierung der freien β -Ketosäure Palmiton (IX), das auch nach Chromatographie der Neutralteile der Bakterien-Lipoide gefunden wurde⁴³. Kondensiert sich aber ein Molekül Palmitoleinsäure (XIV)



mit einem Molekül Palmitinsäure, dann entsteht — nach Reduktion der Ketogruppe — die Corynomycolensäure (XIII), und nach der Verseifung des β -Ketoesters das Δ^7 -Palmitenon (XV). Dieses Keton konnte ebenfalls im Unverseifbaren der Lipoide aus *C. diphtheriae* nachgewiesen werden⁴³.



Inzwischen gelang es uns, diese Hypothese zu beweisen: Wir inkubierten 1-¹⁴C-Palmitinsäure (XVI) mit wachsenden Diphtherie-Bakterien. Die aus ihnen isolierte Corynomycolsäure war stark radioaktiv. Traf unsere Hypothese zu, so mußte die Radioaktivität in den Kohlenstoff-Atomen 1 und 3 lokalisiert sein (XVII), was tatsächlich der Fall war. Die Chromsäureoxydation lieferte Kohlen-



³⁹) E. Lederer, V. Portelance u. K. Serck-Hanssen, Bull. Soc. chim. France 1952, 413.

⁴⁰⁾ J. Polonsky u. E. Lederer, ebenda 1954, 504.

⁴¹⁾ V. L. Hansley, Amer. Pat. 2218026 [1940] u. 2158071 [1936].
⁴²⁾ J. Radice u. E. Ladouce, Bull. Soc. chim. France 1954, 919.

42) J. Pudles u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. France 1954, 919.
43) J. Pudles, Vortrag vor dem VI. Intern. Kongr. für Mikrobiologie.

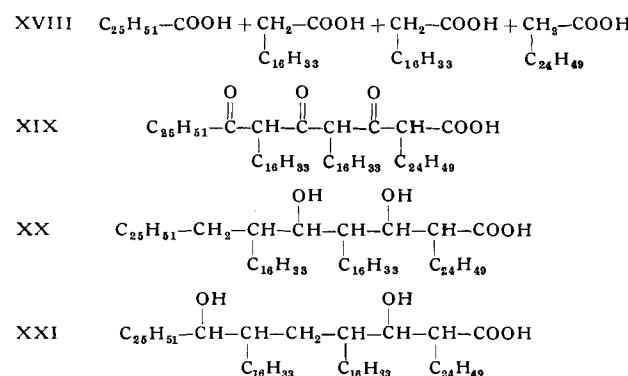
⁴³⁾ J. Pudles, Vortrag vor dem VI. Intern. Kongr. für Mikrobiologie, Rom 1953.

dioxyd, das die Hälfte der Radioaktivität enthielt, während das zurückbleibende Palmiton ausschließlich in der Carbonyl-Gruppe markiert war^{44).}

Damit ist eine dritte Möglichkeit der Fettsäure-Biosynthese gefunden worden, die neben der klassischen Biosynthese normaler Fettsäuren und der — allerdings noch hypothetischen — methylverzweigter Fettsäuren existiert und zu Mycolsäuren mit langen Seitenketten führt.

Hypothese zur Biosynthese der Mycolsäuren in Mycobakterien

Erweitern wir das obige Schema auf die Biosynthese der Mycolsäuren in Mycobakterien, dann können wir annehmen, daß vier Fettsäure-Moleküle — zwei Moleküle Hexacosansäure und zwei Moleküle Stearinäure, $2 \times C_{28} + 2 \times C_{18} = C_{88}$ (XVIII) — sich zu einer sicher hypothetischen Triketosäure (XIX) kondensieren. Die Reduktion der Carbonyl- zu Hydroxyl-Gruppen und die Eliminierung des Sauerstoffs in 5- oder 7-Stellung ergäbe dann die 3.7- oder die 3.5-Dihydroxysäuren (XX und XXI).



Diese noch nicht streng bewiesenen Formeln (XX und XXI) geben zur Zeit das beste Bild für die Struktur der Mycolsäuren aus humanen und bovinen Stämmen und stehen im Einklang mit den meisten experimentellen Ergebnissen^{44b)}. Die Mycolonsäuren (3-Hydroxy-x-oxo-mycolansäuren⁴⁵⁾) könnten unvollständig reduzierte Zwischenstufen sein.

Mycolsäure-Arten

Alle bisher untersuchten Mycobakterien-Stämme synthetisieren mehrere Mycolsäuren. Tabelle I gibt eine Liste der Mycolsäuren aus humanen Stämmen von *M. tuberculosis*. Bovine Stämme enthalten Mycolsäuren, die denen aus humanen Stämmen chemisch sehr ähnlich sind; Dihydroxy- und Mycolonsäuren kommen allerdings häufiger vor^{33). Saprophytische Mycobakterien und *M. avium* enthalten Mycolsäuren, die bei der Pyrolyse statt Hexacosansäure nur Tetracosansäure, $C_{24}H_{48}O_2$, liefern. Dies weist auf die allgemeine Formel $R-CH(OH)-CH(C_{22}H_{45})-COOH$.}

Wir haben uns gefragt, warum diese Stämme Mycolsäuren mit kürzeren Ketten synthetisieren. Falls das erwähnte Schema der Biosynthese richtig ist, wird man annehmen, daß die saprophytischen Stämme keine Hexacosansäure bilden, weil bei ihnen Tetracosansäure das letzte Glied der gesättigten Fettsäuren ist, deren Biosynthese möglich ist. Aus *M. tuberculosis* kann man tatsächlich freie Hexacosansäure relativ einfach in reiner Form isolie-

⁴⁴⁾ M. Gastambide-Odier u. E. Lederer, Nature [London] 184, 1563 [1959], sowie unveröffentl. Versuche.

^{44a)} J. Asselineau, unveröffentl.

⁴⁵) J. Asselineau und Lederer^{34a}) haben für Mycolsäuren folgende Nomenklatur vorgeschlagen: Die nicht-substituierte Säure $C_{87}H_{174}O_4$, ohne $-OH$ und $-OCH_3$ heißt Mycolansäure. Die funktionellen Gruppen werden in der üblichen Weise bezeichnet (z. B. 3-Hydroxymycolansäure für $C_{87}H_{174}O_8$). Dazu fügt man dann in eckigen Klammern die Nummer, welche die Säure bei der Elution erhielt, und den Namen des Bakterienstammes, aus dem sie isoliert wurde. Die α -Mycolsäure des Test-Stammes würde danach 3-Hydroxy-x-methoxy-mycolansäure [1-Test] heißen.

Name	Elutions-Nr.*) u. Stamm	Fp [°C]	Summen- formel*)
3-Hydroxy-mycolansäure ..	[I-R ₁] ¹⁾	57–59	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₃
3-Hydroxy-mycolansäure ..	[2-Canetti] ²⁾	62–64	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₃
3-Hydroxy-x-methoxy- mycolansäure	[1-Test] ³⁾	55–56	C ₈₈ H ₁₇₆ O ₄
3.x-Dihydroxy-mycolansäure	[2-R ₁] ⁴⁾	56–58	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₄
3-Hydroxy-x-oxo- mycolansäure	[3-R ₁]	68–73	C ₈₇ H ₁₇₂ O ₄
3-Hydroxy-x-methoxy- mycolansäure	[2-Test]	71–73	C ₈₈ H ₁₇₆ O ₄
3.x-Dihydroxy-mycolansäure	[3-H37Rv] ⁵⁾	70–72	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₄
3.x-Dihydroxy-mycolansäure	[5-Canetti]	81–82	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₄
x-Methoxy-mycolansäure ..	[3-Test] ⁶⁾	59–60	C ₈₈ H ₁₇₆ O ₃
3-Hydroxy-mycolansäure ..	[4-Test] ⁷⁾	56–57	C ₈₇ H ₁₇₄ O ₃

¹⁾ auch 1-Canetti. — ²⁾ auch 1-H37 Ra, — ³⁾ auch 1-Aeschbacher, 1-H37 Rv, 1-H37 Rv streptomycin-resistant (= s. r.) — ⁴⁾ auch 2-H37 Rv, 2-H37 Rv s. r. — ⁵⁾ auch 3-H37 Ra, 3-H37 Rv, 3-H37 Rv s. r. — ⁶⁾ früher δ-Mycolsäure Test genannt. — ⁷⁾ früher γ-Mycolsäure Test genannt, auch 4-H37 Rv, 4-H37 Rv s. r.

* Die Mycolsäuren sind — soweit möglich — nach ihrer Elutions-Nummer geordnet. Die Summenformeln sind auf $\pm 5 \text{ CH}_2$ genau.

Tabelle 1. Aus humanen Stämmen von *M. tuberculosis* isolierte Mycolsäuren^{34a)}

ren, während die entsprechenden Fraktionen aus *M. phlei* und *M. smegmatis* nur Tetracosansäure enthalten. Einen weiteren Beweis brachten Untersuchungen der höheren Fettsäuren in den Fetten von *M. phlei* und *M. smegmatis*. Durch Chromatographie konnte auch hier keine Hexacosansäure, sondern nur Tetracosansäure nachgewiesen werden⁴⁰⁾ (vgl. Tabelle 2).

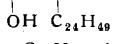
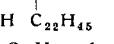
Humane und bovine Stämme	Aviäre und saprophytische Stämme
Pyrolyse $\rightarrow \text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_2$ beweist die Struktur	Pyrolyse $\rightarrow \text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ beweist die Struktur
R—CH—CH—COOH 	R—CH—CH—COOH 
R $\sim \text{C}_{60}\text{H}_{120}$, kann außerdem eine Hydroxyl-, eine Methoxyl- oder eine Carbonylgruppe enthalten	R $\sim \text{C}_{58}\text{H}_{116}$, kann außerdem noch eine Hydroxylgruppe enthalten
In diesen Stämmen findet man freie Hexacosansäure	In diesen Stämmen findet man freie Tetracosansäure und Mycol-dicarbonsäuren.

Tabelle 2. Mycolsäuren aus verschiedenen Mycobakterien-Arten

Lipoid-Fraktionen aus Mycobakterien

Der Hauptteil der verzweigten Fettsäuren liegt in den Bakterien in veresterter Form vor. Man kann drei große Gruppen von Estern unterscheiden: Fette, Phospholipoide und Wachse. Die Arbeitsmethoden Andersons und seiner Schule²⁾ erlauben eine Aufteilung der Lipoide in mehrere Fraktionen:

Lebende Bakterien liefern mit einer Mischung aus gleichen Teilen Alkohol und Äther einen Extrakt, aus dem man mit Aceton Fette (löslich in kaltem Aceton), Phosphatide (unlöslich in siedendem Aceton) und A-Wachse (löslich in warmem, unlöslich in kaltem Aceton) erhält.

Der Bakterienrückstand wird mit Chloroform ausgezogen und der Extrakt mit Methanol und Aceton in B-Wachse (die „weichen Wachse“ Andersons, löslich in einem Äther-Methanol-Gemisch), C-Wachse (löslich in warmem Aceton) und D-Wachse (unlöslich in siedendem Aceton) zerlegt. Der Bakterienrückstand enthält noch weitere, gebundene Lipide.

Je nach Art der Extraktion und verwendetem Bakterienstamm ändert sich die Zusammensetzung der Rohfraktionen. Wir fassen im folgenden unsere Kenntnisse über die Bestandteile dieser Fraktionen zusammen (Einzelheiten findet man unter^{33, 47)}):

⁴⁶⁾ M. Barbier u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 14, 246 [1954].

⁴⁷⁾ J. Asselineau u. E. Lederer in K. Bloch: Metabolism of Lipids. Wiley & Sons, New York 1960, im Druck.

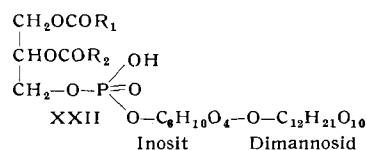
Fette

Nach Anderson²⁾ bestehen die Fette hauptsächlich aus Trehalose-Estern und nicht aus Glyceriden (vgl. auch Aebi und Mitarb.⁴⁸⁾). Im Säureteil findet man: gewöhnliche Fettsäuren, Tuberculostearinsäure, Mycocerosinsäure und — bei virulenten Stämmen — Phthiensäuren (*Asselineau*⁴⁹), *Cason* und Mitarb.⁵⁰⁾). In neueren Arbeiten konnten *Cason* und Mitarb.⁵¹⁾ mit Hilfe der Gaschromatographie zeigen, daß die Lipoide der Tuberkele-Bakterien mehrere Fettsäuren mit weniger als 20 C-Atomen enthalten, vor allem die normalen Säuren C₁₄–C₁₉ und wenigstens je ein verzweigtes Isomer aus dem gleichen Bereich. Eine verzweigte C₁₈-Säure konnten sie mit 10-Methyl-heptadecansäure identifizieren. Eine einfach ungesättigte C₁₈-Fraktion war mit Ölsäure identisch. Kürzlich konnten Noll⁵²⁾ sowie *Asselineau* und *Moron*⁵³⁾ Glyceride neben den Trehalose-Estern nachweisen. Kleine Mengen Anis-säure und Phenyläthyl-alkohol verleihen den Fetten der Tuberkele-Bakterien einen charakteristischen Geruch (*Asselineau*⁴⁹). Die starke Färbung röhrt von Carotinoiden und Naphthochinonen der Vitamin-K-Gruppe her⁵⁴⁾.

Phospholipoide

Anderson und Mitarb.²⁾ konnten zeigen, daß die Phospholipoide der Mycobakterien Inosit und Mannose enthalten, außerdem fanden sie etwas Stickstoff. K. Bloch⁵⁵⁾ und Pangborn⁵⁶⁾ isolierten aber auch stickstoff-freie Phosphatide. Anderson und Mitarb. fanden in den Phosphatiden u. a. eine Inosit-mono-phosphorsäure, eine Inosit-glycerin-di-phosphorsäure und „Manninositose“, die bei der Hydrolyse 2 Moleküle Mannose und 1 Molekül Inosit liefert. Die Papierchromatographie der Phosphatid-Fraktionen zeigt die Abwesenheit von Cholin und Colamin und die Gegenwart von Aminosäuren, besonders von Ornithin⁵⁷⁾. Wir glauben heute, daß der Gehalt an Aminosäuren aus einer Verunreinigung mit Lipo-peptiden sehr ähnlicher Löslichkeit herührt, denn kürzlich konnten nicht-phosphorylierte Lipo-peptide aus *Nocardia asteroides* isoliert werden⁵⁸⁾.

Mit neuen Reinigungs- und Extraktionsmethoden erhielten Vilkas und Lederer⁵⁹⁾ stickstoff-freie Phospholipoid-Fraktionen aus Tuberkele-Bakterien, die hauptsächlich aus einem Phosphatidyl-inositol-dimannosid (XXII) bestehen. Je nach Kulturmedium kann ein Teil der Mannose durch Glucose ersetzt sein (Vilkas⁶⁰⁾).



Kürzlich berichtete Pangborn⁶¹⁾ über ein Lipo-polysaccharid aus Tuberkele-Bakterien mit 10,5 % Inositol, 50 % Mannose und 1,7 % Phosphor. Dies entspricht der Zusammensetzung eines

⁴⁸⁾ A. Aebi, J. Asselineau u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 661 [1953].

⁴⁹⁾ J. Asselineau, Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 1397 [1956].

⁵⁰⁾ J. Cason, C. F. Allen, W. De Acetis u. G. J. Fonken, J. Biol. Chemistry 202, 893 [1946].

⁵¹⁾ J. Cason u. P. Tavs, J. Biol. Chemistry 234, 1401 [1959]; C. L. Agre u. J. Cason, ebenda 234, 2555 [1959].

⁵²⁾ H. Noll u. E. Jackim, J. Biol. Chemistry 232, 903 [1958].

⁵³⁾ J. Asselineau u. J. Moron, Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 899 [1958].

⁵⁴⁾ H. Noll, J. Biol. Chemistry 232, 919 [1958].

⁵⁵⁾ K. Bloch, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 244, 1 [1936]; K. Bloch, Biochem. Z. 285, 372 [1936].

⁵⁶⁾ M. C. Pangborn, Discuss. Faraday Soc. 6, 110 [1949].

⁵⁷⁾ T. Gendre u. E. Lederer: Biochemistry of Nitrogen. Suomalais-Ulkkakunta Tiedeakademia, Helsinki 1955, S. 313.

⁵⁸⁾ M. Guinand, G. Michel u. E. Lederer, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 246, 848 [1958].

⁵⁹⁾ E. Vilkas u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 111 [1956].

⁶⁰⁾ E. Vilkas, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 245, 588 [1957].

⁶¹⁾ M. C. Pangborn, Feder. Proc. 17, 1016 [1958].

Phosphatidyl-inosit-pentamannosids, und *Nojima*⁶²⁾) isolierte aus den D-Wachsen des Stammes *BCG*⁶³⁾ eine Phosphatid-Fraktion ähnlicher Zusammensetzung. Allerdings konnte *Vilkas*⁶⁴⁾ zeigen, daß das Phosphatid von *BCG* ein Gemisch mehrerer Substanzen ist. Sie fand ein Phosphatidyl-inosit ohne Zucker-Anteil, ein Phosphatidyl-inosit-pentaglucosid, ein Phosphatidyl-inosit-monomannosid und ein Phosphatidyl-inosit-dimannosid. Im Dimannosid sind die beiden D-Mannose-Moleküle 1 → 6- α -glykosidisch verknüpft⁶⁵⁾.

Anderson hatte gefunden, daß die gebundenen Phthiensäuren hauptsächlich in der Phosphatid-Fraktion enthalten sind. Die in unserem Laboratorium von *Vilkas* untersuchten Phosphatide enthalten dagegen nur Palmitin-, Stearin- und Tuberculostearinsäure. *Asselineau* konnte nachweisen, daß die Fettsäuren eines Phosphatides aus dem avirulenten Stamm Ra zu ungefähr 50 % aus Palmitinsäure und zu 25 % aus Tuberculostearinsäure bestehen.

Wachse

Die A-Wachse setzen sich vor allem aus Glyceriden, verestertem Phthiocerol und freier Mycolsäure zusammen. Die B-Wachse sind noch nicht genauer untersucht worden; sie bestehen hauptsächlich aus Glyceriden. Die C-Wachse humarer Stämme enthalten insbesondere Phthiocerol-dimycocerosat (VII), Glyceride^{66–68)} und den Cord-Faktor. Unter den Glyceriden der C-Wachse humarer und boviner Stämme ist ein α -Monomycolat des Glycerins erwähnenswert^{66–68)}.

Cord-Faktor

Die interessanteste Substanz der C-Wachse ist zweifellos der Cord-Faktor (vgl.^{69, 70)}). *Robert Koch*⁷¹⁾ wies schon darauf hin, daß manche Tuberkel-Bakterienstämme sich im Kulturmedium zu zopfähnlichen, gewundenen Fäden („serpentine cords“) aneinanderlagern. *Middlebrook*, *Dubos* und *Pierce*⁷²⁾ konnten zeigen, daß diese Cordbildung für virulente und abgeschwächte Stämme wie z. B. *BCG* charakteristisch ist, während avirulente Stämme von *M. tuberculosis* nur unregelmäßige Anhäufungen bilden. Es war zu vermuten, daß die Cordbildung von einer Substanz verursacht wird, welche die virulenten Bakterien ausscheiden. *H. Bloch* zeigte 1950, daß ein Petroläther-Extrakt aus lebenden virulenten Bakterien eine toxische Lipoid-Fraktion enthält. Die extrahierten Bakterien bleiben zwar am Leben, lagern sich aber nicht mehr zu zopfähnlichen Gebilden zusammen und zeigen außerdem eine verminderde Virulenz⁷³⁾. Das toxische Lipoid aus cordbildenden Stämmen erhielt den Namen Cord-Faktor, mit dem allerdings nur ausgesagt werden soll, daß dieses Lipoid aus cordbildenden Stämmen isoliert wurde, nicht aber, daß es für die Cordbildung verantwortlich ist.

Die biologische Aktivität des Cord-Faktors wird in folgendem Beispiel deutlich: 3 bis 5 Dosen von je 5 µg reinen Cord-Faktors in Bayol-Lösung, in Abständen von einigen Tagen intraperitoneal Mäusen injiziert, töten mindestens die Hälfte der Tiere nach 1 bis 3 Wochen. Eine einzige intravenöse Injektion von 10 bis 25 µg hat die gleiche Wirkung. Bei der Autopsie findet man Lungenblutungen.

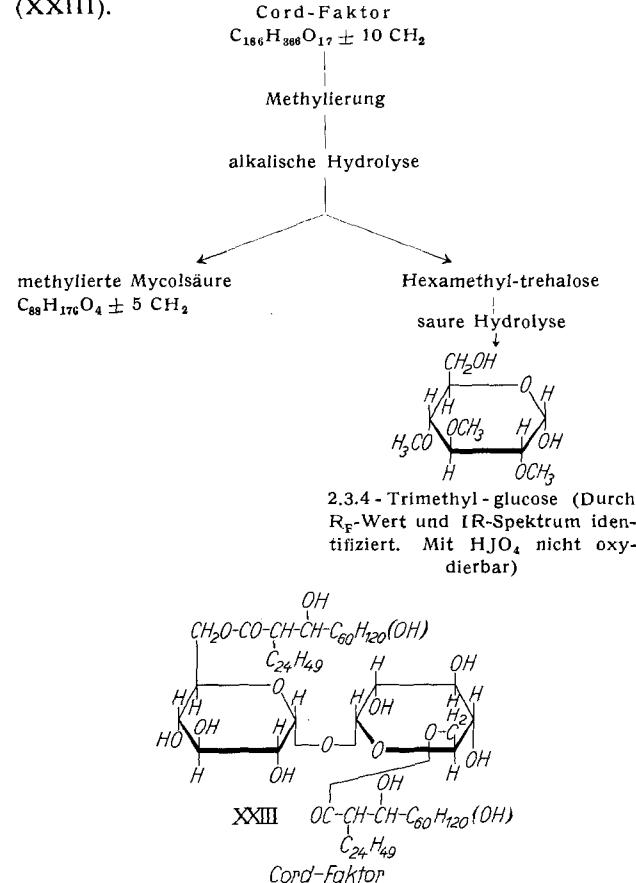
Die Injektion des Cord-Faktors hat außerdem einen schnellen Gewichtsverlust zur Folge⁷⁴⁾.

Spitznagel und *Dubos*⁷⁵⁾ beschrieben ein toxisches Lipoid aus Tuberkel-Bakterien, das mit dem Cord-Faktor nicht identisch war. Wir konnten zeigen, daß es sich um ein Gemisch inaktiver Glyceride mit dem Cord-Faktor handelte und nehmen daher heute an, daß der Cord-Faktor das einzige toxische Lipoid der Tuberkel-Bakterien ist⁶⁶⁾.

Isolierung und chemische Konstitution des Cord-Faktors

Bloßes Waschen der Bakterien mit Petroläther bringt nur geringe Ausbeuten an toxischem Lipoid. Wir versuchten daher, den Cord-Faktor in einer der Lipoid-Fraktionen zu lokalisieren. Es zeigte sich, daß besonders die C-Wachse aktiv sind⁷⁶⁾. Wiederholte Chromatographie an Magnesiumsilicat, Kiesel säure und Silicagel führte schließlich zu reinen Substanzen, die, je nach Stamm, zwischen 36 und 42 °C schmelzen, $[\alpha]_D = +30^{\circ}$ ⁷⁷⁾.

Der Cord-Faktor hat die Bruttoformel $C_{186}H_{366}O_{17} \pm 10 \text{ CH}_2$. Bei der Verseifung erhält man ein Molekül Trehalose, $C_{12}H_{24}O_{11}$, und zwei Moleküle Mycolsäure. Durch Methylierung und anschließende alkalische Hydrolyse erhält man Hexamethyl-trehalose, deren saure Hydrolyse eine einzige Trimethyl-D-glucose liefert. Der Cord-Faktor ist also symmetrisch gebaut, d. h. in beiden Glucos-Molekülen sitzt die Mycolsäure am gleichen C-Atom. Chromatographische und spektroskopische Untersuchung der Trimethyl-D-glucose zeigte, daß es sich um 2,3,4-Trimethyl-D-glucose handelt. Der Cord-Faktor ist also ein Trehalose-6,6'-dimycolat (XXIII).



2,3,4 - Trimethyl - glucose (Durch R_F -Wert und IR-Spektrum identifiziert. Mit HJO_4 nicht oxydierbar)

- ⁶²⁾ S. Nojima, J. Biochemistry [Tokyo] 46, 499, 607 [1959].
- ⁶³⁾ BCG = *Bacillus Calmette Guerin*, ein Stamm eines bovinen Tuberkel-Bakteriums, der zur Vakzination verwendet wird und für 2–3 Jahre eine gewisse Immunität gibt (Anm. des Übersetzers).
- ⁶⁴⁾ E. Vilkas, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 248, 604 [1959].
- ⁶⁵⁾ E. Vilkas u. E. Lederer, unveröffentl.
- ⁶⁶⁾ H. Bloch, J. Defaye, E. Lederer u. H. Noll, Biochim. biophysica Acta 23, 312 [1957].
- ⁶⁷⁾ J. Defaye u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 1301 [1956]; 39, 1659 [1957].
- ⁶⁸⁾ T. Tsumita, Jap. J. med. Sci. Biol. 9, 205 [1956].
- ⁶⁹⁾ E. Lederer in: Arthur-Stoll-Festschrift, Birkhäuser, Basel 1957, S. 384.
- ⁷⁰⁾ H. Noll, Adv. Tuberc. Res. 7, 149 [1956].
- ⁷¹⁾ R. Koch, Mitt. kaiserl. Gesundheitsamt, 2, 1 [1884].
- ⁷²⁾ G. Middlebrook, R. J. Dubos u. C. Pierce, J. exp. Medicine 76, 175 [1947].
- ⁷³⁾ H. Bloch, J. exp. Medicine 91, 197 [1950].

⁷⁴⁾ H. Bloch, J. exp. Medicine 92, 507 [1950]; H. Bloch: Experimental Tuberculosis, A Ciba Foundation Symposium. J. & A. Churchill, London 1955, S. 131; H. Bloch u. H. Noll, Trans. Nat. Tuberc. Ass. N.Y. 49, 94 [1953]; H. Bloch u. H. Noll, Brit. J. exp. Pathol. 36, 8 [1955].

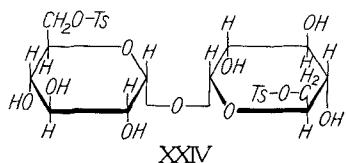
⁷⁵⁾ J. K. Spitznagel u. R. J. Dubos, J. exp. Medicine 101, 291 [1955].

⁷⁶⁾ H. Noll u. H. Bloch, Amer. Rev. Tuberc. 67, 828 [1953]; J. Asselineau, H. Bloch u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 15, 136 [1954].

⁷⁷⁾ H. Noll u. H. Bloch, J. biol. Chemistry 214, 251 [1955]; J. Asselineau u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 17, 161 [1955].

Synthese des Cord-Faktors

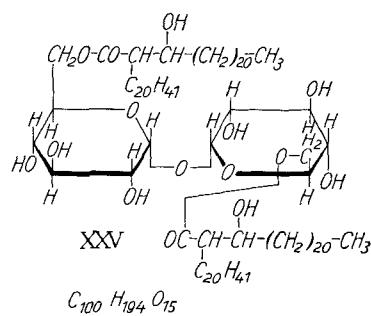
Diese Struktur des Cord-Faktors ist durch Synthese bestätigt worden⁷⁸⁾: Veresterung von Trehalose mit dem Chlorid der Mycolsäure, die zuvor in 3-Stellung acetyliert wurde, führt zu einem Gemisch von 6-Mono-, 6,6'-Di- und 6,6'.2-Trimycolsäure-ester, das durch Chromatographie an Kieselsäure trennbar ist. Die Ausbeute an 6,6'-Dimycocolat beträgt nur etwa 20%, außerdem ist diese Methode zur Synthese von Estern mit Dihydroxy-mycolsäuren nur wenig geeignet, denn während der Acetylierung spaltet sich leicht Wasser ab. Ein anderes Verfahren besteht darin, Kalium-mycolat mit 6,6'-Ditosyl-2,3,4,2',3',4'-hexaacetyl-trehalose reagieren zu lassen. Das 6,6'-Dimycocoloyl-2,3,4,2',3',4'-hexaacetat der Trehalose kann dann zum 6,6'-Dimycocolat entacetyliert werden⁷⁹⁾. Leider werden während der Entacetylierung die Mycolsäure-Reste zum Teil ebenfalls abgespalten. Brochéré-Ferréol und Polonsky⁸⁰⁾ haben eine bessere Methode beschrieben, bei der die Entacetylierung vermieden wird, da man einfach 6,6'-Ditosyl-trehalose (XXIV) mit Kalium-mycolat erwärmt.



XXIV

Synthetischer und natürlicher Cord-Faktor⁷⁸⁾ haben die gleichen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Ein niederes Homologes, $C_{100}H_{194}O_{15}$ (XXV), bei dessen Herstellung eine synthetische Mycolsäure, $C_{44}H_{88}O_3$, verwendet wurde, hat praktisch die gleichen biologischen Wirkungen wie die natürliche Verbindung.

Kato und Mitarb.⁸¹⁾ konnten die toxischen Eigenschaften des Cord-Faktors zumindestens teilweise auf eine Aktivitätsverminderung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase und der Milchsäure-, Äpfelsäure- und α -Glycerinphosphat-Dehydrogenase nach in-vivo-Injektion zurückführen. Der Cord-Faktor könnte durch Blockierung eines



$C_{100}H_{194}O_{15}$

Cofaktors, der für die Wirkung dieser Enzyme nötig ist, die Stoffwechsel-Störung verursachen. Über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Aktivität natürlicher und synthetischer Cord-Faktoren haben wir bereits zusammenfassend berichtet⁸⁰⁾.

⁷⁸⁾ T. Gendre u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. France 1956, 1478.

⁷⁹⁾ J. Polonsky, G. Ferréol, R. Toubiana u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. France 1956, 1471.

⁸⁰⁾ G. Brochéré-Ferréol u. J. Polonsky, Bull. Soc. chim. France 1958, 714.

⁸¹⁾ M. Kato, K. Miki, K. Matsunaga u. Y. Yamamura, Amer. Rev. Tuberc. 77, 482 [1958]; M. Kato, M. Kusunose, K. Miki u. Y. Yamamura, Amer. Rev. Resp. Diseases 80, 240 [1959].

D-Wachse

Die D-Wachse haben interessante biologische Eigenschaften (vgl. weiter unten). Man unterscheidet D-Wachse aus humanen und bovinen Stämmen; sie sind chemisch und biologisch verschieden.

Die schwierige Reinigung hatte es bisher nicht erlaubt, die D-Wachse humaner Stämme chemisch näher zu untersuchen; erst kürzlich konnten wir eine chromatographische Methode ausarbeiten, mit der sich die D-Wachse von einem beträchtlichen Anteil (bis zu 25%) begleitender Phosphatide befreien lassen (vgl. auch Nojima⁸²⁾). Die so gereinigten D-Wachse sind farblose Pulver, die oberhalb 200 °C schmelzen und eine relativ starke Rechtsdrehung aufweisen, $[\alpha]_D = +22^\circ$. Sie sind unlöslich in Wasser, siedendem Aceton und in Methanol, wenig löslich in Petroläther. In Äther, Chloroform und Benzol sind sie löslich.

In Arbeiten mit Asselineau, Buc und Jollès⁸³⁾ konnten wir zeigen, daß Molekulargewicht und chemische Zusammensetzung der D-Wachse je nach Stamm variieren. Die D-Wachse der Stämme *Test* und *H 37 Ra* haben ein Molekulargewicht von etwa 30000, diejenigen der Stämme *Canetti* und *Brévannes* von etwa 50000. Die Hälfte dieser Wachse besteht aus Mycolsäuren, die andere Hälfte ist ein stickstoff-haltiges Polysaccharid, in dem D-Arabinose, D-Mannose, D-Galaktose und Glucosamin, begleitet von etwas Galaktosamin gefunden wurden. Dieses Polysaccharid trägt ein Peptid, das ein Heptapeptid zu sein scheint und sich aus 2 Molekülen Glutaminsäure, 2 Molekülen meso- α,ϵ -Diamino-pimelinsäure und 3 Molekülen Alanin zusammensetzt.

2 meso-DAP 2 L-Ala 1 D-Ala 2 D-Glu	Amid-Bindung	Hexosamin	Glycosid-Bindung	Polysaccharid: etwa 170 Moleküle Arabinose Galaktose Mannose Glucosamin Galaktosamin Mol.-Gew. 26000	Ester-Bindung	Mycolsäuren etwa 22 Moleküle Mol.-Gew. 27000
---	--------------	-----------	------------------	---	---------------	---

Abb. 1. Chemische Struktur des D-Wachses aus dem virulenten humanen Stamm *Brévannes* von *Mycobacterium tuberculosis*.

setzt. Diese Zusammensetzung ist für die Stämme *Brévannes*, *Test* und *H 37 Ra* gültig. Bemerkenswert ist, daß die ganze Glutaminsäure und eines der drei Alanin-Moleküle in der D-Form vorliegen (unveröffentlichte Ergebnisse von E. E. Snell und M. Ikawa). Abb. 1 zeigt schematisch die Struktur des D-Wachses aus dem Stamm *Brévannes*.

Alle D-Wachse humaner Stämme, die bis jetzt untersucht wurden, enthalten die gleichen drei Aminosäuren. Die D-Wachse boviner und saprophytischer Stämme besitzen keine Aminosäuren.

Wahrscheinlich besteht zwischen der Virulenz eines humanen Stammes und der produzierten Menge an D-Wachs ein Zusammenhang, denn virulente Stämme enthalten 6–8%, abgeschwächte oder avirulente Stämme dagegen nur 2–3% D-Wachs⁸⁴⁾.

Chemie der Lipoide und Taxonomie

Smith und Mitarb.⁸⁵⁾ konnten durch IR-Spektroskopie der chromatographisch gereinigten Lipoid-Fraktionen mindestens drei Substanz-Gruppen charakterisieren, die jeweils für einen Mycobakterien-Typ spezifisch sind. Für diese Verbindungen wurde der Name Mycoside vorge-

⁸²⁾ S. Nojima, J. Biochemistry [Tokyo] 46, 499, 607 [1959].

⁸³⁾ J. Asselineau, H. Buc, P. Jollès u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. 40, 714 [1958].

⁸⁴⁾ J. Asselineau u. E. Lederer, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 230, 142 [1950].

⁸⁵⁾ D. W. Smith, H. M. Randall, M. M. Gastambide-Odier u. A. L. Koevoet, Ann. New York Acad. Sci. 69, 145 [1957].

schlagen^{85a}). Die Substanz G_A — oder Mycosid A — findet sich nur in atypischen photochromogenen Stämmen, die Substanz G_B — oder Mycosid B — nur in bovinen Stämmen und die Substanz Jav — oder Mycosid C — allein in aviären Stämmen.

Die Mycoside sind Glycolipoide und enthalten O-Methyl-6-desoxy-hexosen. Das Mycosid C (oder Jav), spezifisch für *M. avium*, ist ein Peptido-glyco-lipoid, es enthält ein Pentapeptid mit 1 Molekül D-Phe, 2 Molekülen allo-Thr und 2 Molekülen D-Ala⁸⁶). Bemerkenswert ist auch hier die Gegenwart von D-Aminosäuren (unveröffentlichte Untersuchungen mit *E. E. Snell* und *M. Ikawa*).

In Tabelle 3 sind analytische Ergebnisse zusammengefaßt. Sie erlauben, Bakterienstämme durch die Gegenwart oder Abwesenheit bestimmter Substanzen zu charakterisieren.

3. Biologische Wirkung der Lipoide aus Mycobakterien

Tuberkel-Bildung

Die Bildung von Tuberkeln nach einer tuberkulösen Infektion scheint wenig spezifisch zu sein. Tatsächlich können viele Fremdkörper wie unlösliche Proteine, Lecithin, Paraffin usw. Gewebsreaktionen auslösen, die sich histologisch kaum von den lokalen Veränderungen nach Tuberkel-Infektion unterscheiden. Zu den Lipoid-Bestandteilen des Bakteriums, die zur Bildung tuberkulöser Granulome führen können, gehören: die Phosphatid-Faktion, die verzweigten Fettsäuren (*Sabin*⁸⁷), die Mycolsäuren (*Gerstl*, *Tennant* und *Pelzman*⁸⁸) und die D-Wachse (*Delaunay*, *Asselineau* und *Lederer*⁸⁹). Es existiert eine umfangreiche Literatur über histologische Reaktionen, die durch verzweigte Fettsäuren verursacht werden (vgl. *Ungar* und *Mitarb.*⁹⁰, *Asselineau*⁹¹). Berücksichtigt man, daß die D-Wachse bis zu 8 % des Bakterien-Trockengewichtes ausmachen können (gegen 1 % für die Phosphatide), so scheint es, daß diese Wachse bei der Tuberkelbildung eine relativ wichtige Rolle spielen.

^{85a)} O. W. Smith, H. M. Randell, A. P. MacLennan u. E. Lederer, Nature [London] [1960], im Druck.

⁸⁸ A. P. MacLennan, F. Bigler, T. Gendre, P. Jollès u. E. Lederer, unveröffentl.

⁸⁷ F. R. Sabin, Amer. Rev. Tuberc. 44, 415 [1941].

⁸⁹ B. Gerstl, R. Tennant u. O. Pelzman, Amer. J. Pathol. 21, 1007 [1945].

⁹⁰ A. Delaunay, J. Asselineau u. E. Lederer, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 145, 650 [1951].

⁹¹ J. Ungar, C. E. Coulthard u. L. Dickenson, Brit. J. exp. Pathol. 29, 322 [1948].

⁹¹ J. Asselineau, Progr. Explor. Tuberc. 5, 1 [1952].

Tuberkulin-Allergie

Tuberkulin ist nach *Seibert*⁹²) ein Protein oder ein Protein-Gemisch, das aus dem Kulturmedium der Tuberkelbakterien isolierbar ist. Injiziert man einem gesunden Tier Tuberkulin und verabfolgt ihm nach einigen Wochen wieder etwas Tuberkulin durch Scarifizierung (Hautritzung), so läßt sich keine typische Hautreaktion erkennen. Das Tuberkulin allein ist demnach nicht für die Tuberkulin-Allergie verantwortlich.

1939 konnte *Choucroun*⁹³) mit ihrem PmKo⁹⁴) eine Sensibilisierung erreichen. *Raffel*⁹⁵) zeigte dann, daß die „gereinigten Wachse“ *Andersons* (C-Wachs + D-Wachs) eine charakteristische Allergie erzeugen können, wenn sie gleichzeitig mit Tuberkulin einem Tier injiziert werden. Injiziert man zusammen mit einem „gereinigten Wachs“ ein anderes Antigen, z. B. Ovalbumin oder Picrylchlorid, dann entwickelt sich eine Allergie gegen dieses Antigen. Im Laufe der letzten Jahre untersuchte *Raffel* unsere Wachs-Präparate, um Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und sensibilisierender Wirkung zu finden. Diese zum Teil unveröffentlichten Arbeiten ergaben, daß alle Mycolsäure-Zucker-Ester diese Aktivität aufweisen; besonders groß ist sie beim Cord-Faktor und bei den D-Wachsen boviner und humarer Stämme. Eine Aktivität von Phthiocerol-Derivaten oder des Methyl-mycolats (in einer vorläufigen Veröffentlichung bereits mitgeteilt⁹⁶)) konnte nicht bestätigt werden.

Adjuvans-Wirkung

Vor allem aus Arbeiten von *Freund*⁹⁷) ist bekannt geworden, daß abgetötete Tuberkel-Bakterien in Paraffinöl-Suspension einen Adjuvans-Effekt aufweisen, das heißt: injiziert man einem Tier die Bakterien-Suspension zusammen mit einem Antigen, so beobachtet man ein starkes Ansteigen der Antikörper-Bildung. *White*, *Bernstock*, *Johns* und *Lederer*⁹⁸) bewiesen, daß die D-Wachse für diese Aktivität verantwortlich sind und daß nur die D-Wachse humarer Stämme, also nur die, welche die drei Aminosäuren Ala, Glu und Diamino-pimelinsäure enthalten, aktiv sind.

⁹² F. B. Seibert, Adv. Tuberc. Res. 3, 1 [1950].

⁹³ N. Choucroun, Amer. Rev. Tuberc. 59, 710 [1949].

⁹⁴) „PmKo“ ist ein Paraffinöl-Extrakt der Bakterien. Er ist chemisch den D-Wachsen sehr ähnlich.

⁹⁵ S. Raffel, Experientia 6, 410 [1950].

⁹⁶ S. Raffel, J. Asselineau u. E. Lederer: Experimental Tuberculosis, A Ciba Foundation Symposium. J. & A. Churchill, London 1955, S. 174.

⁹⁷ J. Freund, Adv. Tuberc. Res. 7, 130 [1956].

⁹⁸ R. G. White, L. Bernstock, R. G. S. Johns u. E. Lederer, Immunology 1, 54 [1958].

	<i>M. tuberculosis</i>				<i>M. avium</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. phlei</i>		atypische Mycobakterien		
	var. hominis virulent H 37 Rv	var. hominis avirulent H 37 Ra	var. bovis	abgeschwächt			Pasteur	I. C. I.	photochromogen	scotochromogen	nichtchromogen
2-Octadecanol, 2-Eicosanol	—	—	—	—	+	?	?	+	—	—	—
Phthiocerol	+	+	+	+	?	—	—	—	—	—	—
Phthiocerol-di-mycocerosat	+	+	+	?	—	—	—	—	—	—	—
Mycocerosinsäure	+	+	+	?	—	—	—	—	—	—	—
Phthiensäure	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Mycolsäuren	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Fettsäuren nach der Pyrolyse der Mycolsäuren ..	C ₂₆	C ₂₆	C ₂₆	C ₂₆	C ₂₄ + C ₂₆	C ₂₄	C ₂₂ + C ₂₄	—	—	—	—
Mycolonsäuren ..	selten	—	+	+	—	+	—	+	+	—	—
Cord-Faktor ..	+	?	+	+	—	—	—	+	+	—	—
D-Wachs:											
ungefährer Fp [°C] ...	200	200	und 40	und 40	50	—	50	50	—	—	—
Gehalt an Aminosäuren	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Mycosid A ..	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
Mycosid B ..	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Mycosid C ..	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+

Tabelle 3. Vorkommen charakteristischer Lipoid-Bestandteile in Mycobakterien (nach Asselineau u. Lederer⁴⁷).

Die aminosäure-freien D-Wachse boviner Stämme sind inaktiv. Außerdem können die D-Wachse zur Erzeugung von allergischer Enzephalomyelitis beim Kaninchen verwendet werden (Arbeiten von Waksman⁹⁹), Colover¹⁰⁰) und White¹⁰¹).

Immunisierung

In der Literatur findet man mehrere Hinweise, daß sich durch Injektion bestimmter Lipoid-Fraktionen, Immunisierungen erreichen lassen, die denen von BCG verursachten vergleichbar sind. Hier wären vor allem die Arbeiten von Boquet und Nègre¹⁰²) über das „Methyl-Antigen“¹⁰³) und die von Choucroun⁹⁸) über das „PmKo“⁹⁴) zu erwähnen. Die Versuche von Boquet und Nègre¹⁰²) wurden kürzlich von Weiss und Dubos¹⁰⁴) wiederholt und abgeändert.

Weiss und Dubos zeigten, daß man unter bestimmten Um-

⁹⁹) B. H. Waksman u. R. D. Adams, J. Infect. Diseases 93, 21 [1953].

¹⁰⁰) J. Colover, Brain 77, 435 [1954]; J. Colover u. R. Conder, Nature [London] 177, 749 [1956]; J. Colover, ebenda 182, 104 [1958].

¹⁰¹) R. G. White u. A. H. E. Marshall, Immunology 1, 111 [1958].

¹⁰²) A. Boquet u. L. Nègre, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 86, 581 [1922]; L. Nègre: Les lipoides dans le bacille tuberculeux et la tuberculose, Masson, Paris 1950; Prévention et traitement spécifique de la tuberculose par le B. C. G. et l'antigène méthylique, Masson, Paris 1956.

¹⁰³) „Methyl-Antigen“ ist ein methylalkoholischer Extrakt aus zuvor entfetteten Tuberkel-Bakterien.

¹⁰⁴) D. W. Weiss u. R. J. Dubos, J. exp. Medicine 103, 73 [1956].

ständen mit Methanol Fraktionen extrahieren kann, die immunisierende Eigenschaften haben. Vor kurzem fand Dubos¹⁰⁵), daß Lipo-polysaccharide (Endotoxine) gram-negativer Bakterien diese Immunität, die allerdings nicht sehr spezifisch zu sein scheint, beträchtlich erhöhen. Lipo-polysaccharide allein zeigen die gleiche Wirkung.

Die immunisierende Wirkung des „PmKo“ scheint von anderen Autoren nicht bestätigt worden zu sein. Nach unveröffentlichten Untersuchungen von H. Bloch und Raffel immunisieren D-Wachse, die dem „PmKo“ chemisch ähnlich sind, nicht.

Wahrscheinlich muß ein Lipoid und eine bis jetzt noch unbekannte Substanz gleichzeitig anwesend sein, wenn eine Immunität auftreten soll, die sich mit jener vom BCG hervorgerufenen vergleichen läßt.

Die Arbeiten unseres Laboratoriums, über die hier berichtet wurde, erhielten die großzügige Unterstützung der „Fondation Waksman pour le Développement des Recherches Microbiologiques en France“. Für die Herstellung großer Mengen Bakterienkulturen danken wir vor allem Prof. J. Tréfouel und Dr. J. Bretey vom Institut Pasteur.

Übersetzt von Dipl.-Chem. G. Scheuerbrandt, Freiburg/Brsq.

Eingegangen am 6. November 1959 [A 11]

¹⁰⁵) R. J. Dubos, unveröffentl.

Polymere Blausäure

Von Dr. TH. VÖLKER*

Forschungslaboratorium der Firma Röhm & Haas G. m. b. H., Darmstadt

Polymerer Cyanwasserstoff, üblicherweise als polymere Blausäure oder Azulminsäure bezeichnet, entsteht durch anionische Polymerisation von HCN in wäßriger Lösung. Die Reaktion verläuft über dimere Blausäure (Iminoacetonitril). Gleichzeitig findet zwischen γ -ständigen Nitril-Gruppen Ringschluß statt, wodurch das kettenförmige Polymer stabilisiert wird. Die Bruttozusammensetzung der polymeren Blausäure weicht von der Formel $(HCN)_x$ durch einen mehr oder minder großen Sauerstoff-Gehalt ab. Der Sauerstoff stammt aus Reaktionen mit dem Lösungsmittel. Die Beobachtung, daß polymere Blausäure Metallsalze, insbesondere Edelmetallsalze, in hoher Konzentration reversibel anzulagern vermag, macht sie zu einer technisch interessanten Verbindung.

Die Existenz der polymeren Blausäure ist lange bekannt, und die ersten Erwähnungen in der Literatur^{1,2}) liegen über 150 Jahre zurück. Einem Vorschlag von Boulay³) folgend, wird die polymere Blausäure meist als Azulminsäure bezeichnet. Man geht kaum fehl in der Annahme, daß polymere Blausäure das erste synthetisch gewonnene organische Polymere ist. Obwohl sie Gegenstand eingehender Untersuchungen war, vermittelten die bis in die jüngste Zeit erschienenen Arbeiten lediglich einen Überblick der verschiedenen Darstellungs-Möglichkeiten, nicht jedoch die Kenntnis des Bildungsmechanismus und der Struktur.

Polymere Blausäure ist ein Konglomerat braun-schwarzer, amorph erscheinender Flocken, die sich ohne Eingriff in den chemischen Aufbau in keinem Lösungsmittel quantitativ lösen. Mit wäßrigem Alkali bildet sie unter Abspaltung von Ammoniak tief braun gefärbte Lösungen. In konzentrierten Säuren ist Azulminsäure je nach Herstellungssart mehr oder minder partiell löslich, mit konzentrierter Salpetersäure reagiert sie unter Bildung nitroser Gase; in anderen verdünnten Mineralsäuren ist sie ohne erkennbare Veränderung nur in sehr geringem Umfang löslich.

*) Auszugswise vorgetragen auf der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Berlin, Oktober 1957.

¹) J. L. Proust, Gehlen's J. Chem. Physik 3, 384 [1807]; Ann. Chim. Physique (1) 60, 233 [1806].

²) J. L. Gay-Lussac, Ann. Chim. Physique (1) 95, 158 [1815].

³) P. Boulay, J. Pharmac. Chim. (2) 16, 180 [1830]; Ann. Chim. Physique (2) 43, 282 [1830].

Darstellung

Zur Darstellung von Azulminsäure kann man Cyanwasserstoff auf verschiedene Weise polymerisieren. So tritt beim Erhitzen von Cyanwasserstoff oder auch bei längerer Lagerung — insbesondere hochkonzentrierter Lösungen — mitunter spontan Polymerisation⁴⁾ ein. Bei Bestrahlung von Blausäure mit Licht^{5,6)} oder energiereichen Strahlen⁷⁾, bei der Elektrolyse wäßriger Kaliumcyanid-Lösungen⁸⁾ oder auch durch Einwirkung von elektrischen Entladungen verschiedener Art auf Blausäure⁹⁾ wird die Bildung von Azulminsäure ausgelöst. Am einfachsten und am leichtesten zu beherrschen ist die alkali-induzierte Polymerisation¹⁰⁻¹⁵⁾ in 10- bis 40-proz. Lösung. Die Polymerisation wird durch

⁴) E. Polazzi, Boll. chim. farmac. 46, 237; Chem. Zbl. 1907, I, 1403.

⁵) E. Rousseau, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 184, 683 [1927].

⁶) A. Andant u. E. Rousseau, Science [New York] 62, 422 [1925].

⁷) S. C. Lind, D. C. Bardwell u. J. H. Perry, J. Amer. chem. Soc. 48, 1556 [1926].

⁸) H. Schmidt u. H. Meinert, Z. anorg. allg. Chem. 293, 214 [1957].

⁹) M. Kondo, J. chem. Soc. [Japan] 75, 79, 82, 156 [1954].

¹⁰) A. Gautier, Ann. Chim. Physique (4) 17, 156 [1869].

¹¹) H. Lescoeur u. A. Rigaut, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 2162 [1879].

¹²) R. Wippermann, Ber. dtsch. chem. Ges. 7, 767 [1874].

¹³) W. Lewcock, Pharmac. J. 47, 50 [1918].

¹⁴) A. Michael u. H. Hilbert, Liebigs Ann. Chem. 364, 64 [1909].

¹⁵) R. L. Webb, S. Frank u. W. C. Schneider, J. Amer. chem. Soc. 77, 3491 [1955].