

Abb. 3. Versuchsanlage für die Butanolsynthese

Infolge der milden Reaktionsbedingungen bilden sich nur etwa 0,2% flüssige Nebenprodukte. Der Anteil an C₄-Äthern und Aldehyden im Rohbutanol liegt insgesamt unter 0,1%. Das Verfahren nach Reppe ist besonders darin anderen Butanolsynthesen überlegen.

Die Verluste an Butylpyrrolidin und Eisenpentacarbonyl sind gering. Die Haltbarkeit der Katalysatorlösung ist gut. Man kann sie mindestens ein halbes Jahr ohne Regenerierung verwenden; wenn erforderlich, läßt sie sich auf einfache Weise regenerieren¹⁶⁾. Verunreinigungen der Ausgangsgase durch Schwefelverbindungen, Kohlendioxyd, Wasserstoff und Propan beeinflussen die Reaktion nicht.

In der BASF wird seit längerer Zeit mit gutem Erfolg in einem Versuchsbetrieb (Abb. 3) nach dem beschriebenen Verfahren gearbeitet. Als Niederdruckverfahren, das zudem keinerlei Korrosionsprobleme stellt, läßt es sich apparativ einfach gestalten und sicher betreiben. Der Energiebedarf ist gering, das Verfahren daher sehr wirtschaftlich.

Prof. Dr. W. Reppe hat die von ihm gefundene Alkoholsynthese mit einer Reihe von Mitarbeitern bis zur technischen Reife gebracht. Besonderen Anteil an der Entwicklung der Synthese hatten Dr. M. Heintzeler bei der Bearbeitung der Katalysatoren, ferner Dr. W. Pfab, Dr. H. Detzer und Dr. K. Dettke durch ihre physikalisch-chemischen und analytischen Untersuchungen. An der Erprobung und Entwicklung des Verfahrens waren besonders Dr. W. Büche, Dr. K. Eisfeld und Dr. H. Jenne beteiligt.

Eingegangen am 31. August 1960 [A 80]

¹⁶⁾ H. Kindler u. H. G. Trieschmann, DAS 1088038 (1959), BASF.

Über die Ganglioside des Gehirns

Von Prof. Dr. RICHARD KUHN*) gemeinsam mit Dipl.-Chem. H. EGGE sowie mit Dr. Dr. R. BROSSMER,
Dr. ADELINE GAUHE, Dr. P. KLESSE, W. LOCHINGER, E. RÖHM, H. TRIECKMANN
und DOROTHEA TSCHAMPEL

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie

Das Gangliosid aus Rinderhirn ließ sich chromatographisch in zwei kristallisierende Komponenten zerlegen. Das schneller wandernde Gangliosid (G₁) ist aus je 1 Mol Stearinsäure, Sphingosin, Glucose, Galaktose, Acetylgalaktosamin und Lactaminsäure (N-Acetyl-neuraminsäure) aufgebaut. Die Verknüpfungsweise der 6 Bausteine wird aus Ergebnissen der Permethylierung mit CH₃I und BaO + Ba(OH)₂ bzw. SrO + Sr(OH)₂ in Dimethylformamid und partieller Acetolysen abgeleitet. Dabei zeigt sich, daß ein aus der Kuhmilch schon früher isoliertes Trisaccharid auch Baustein des Gangliosids G₂ aus Rinderhirn ist. Aus Frauenmilch konnten neue saure Oligosaccharide gewonnen werden. Das Gangliosid G₁ ist komplizierter gebaut und vermutlich noch nicht einheitlich. — An physiologischen Eigenschaften der Ganglioside G₁ und G₂ werden besprochen: die Steigerung der Körpertemperatur; die Erhöhung der Resistenz gegenüber Coli-Infektionen; das Bindungsvermögen für Tetanustoxin; die Spaltbarkeit durch Influenzavirus und durch das receptor destroying enzyme (RDE).

Wir leben im Zeitalter der Elektronik. Elektronische Rechenmaschinen, Elektronengehirne, wie man auch sagt, sind in der Lage, blitzschnell Rechenoperationen durchzuführen, zu denen man mit Bleistift und Logarithmentafel kaum vorstellbare Zeiten benötigen würde. Mit der rapiden Entwicklung der Elektronik hat die Erforschung des menschlichen Gehirns nicht Schritt gehalten.

Eine elektronische Rechenmaschine vom Typ einer IBM-Maschine besteht im wesentlichen aus einem Zylinder, der z. B. 40 Ringe mit je 50 Speicherzellen trägt. Jede ein-

zelne dieser Speicherzellen vermag eine 10stellige Zahl aufzunehmen, das sind 40·50 = 2000 zehnstellige Zahlen. Demgegenüber beträgt die Zahl der Ganglienzellen im menschlichen Gehirn – sie ist noch von niemandem genau gezählt worden, aber man kann sie abschätzen – etwa 12–14 Milliarden. Diese Einheiten haben stofflich gar nichts mit denen der Rechenmaschinen gemeinsam. Auf alle Fälle sind aber die Ganglienzellen des Gehirns, wenn auch nicht alle, so doch ein großer Teil von ihnen, notwendig, um derartige elektronische Rechenmaschinen zu konstruieren. Und überdies muß das menschliche Gehirn diesen Rechenmaschinen ständig die sogenannte Programmierung zuschieben, das heißt das, was sie auf Grund ihrer Automatik in Blitzschnelle zahlenmäßig weiter verarbeiten können.

*) Nach einem Vortrag auf der X. Tagung der Nobelpreisträger in Lindau am 6. Juli 1960. Die hauptsächlichen Ergebnisse waren auch Inhalt der Robert-Gnehm-Vorlesung in Zürich am 24. Juni 1960.

Eine Fragestellung chemischer Art, die sich hier ergibt, kann man vielleicht folgendermaßen formulieren: Wenn jemand eine Rede hält, dann weiß er, vorausgesetzt daß er Chemiker ist, woraus das Magnetophonband besteht, das seine Worte aufnimmt: Es besteht aus einer Kunststofffolie, z. B. aus Polyvinylchlorid, und aus der ferromagnetischen γ -Modifikation des Eisenoxyds Fe_2O_3 . Er weiß aber nicht, welcher Art die Aufnahmeapparate im Gehirn seiner Zuhörer sind, mit denen sie Erinnerungen an seinen Vortrag mit nach Hause nehmen werden.

Was die Elektrophysiologie heute über die Tätigkeit des Gehirns lehrt, ist im wesentlichen, daß es sich um den Aufbau und Abbau von elektrischen Potentialen handelt. Das hat nur noch bei sehr weitem Blick etwas zu tun mit den elektrischen Vorgängen in den elektronischen Rechenmaschinen und den Magnetophonbändern. Wer einen derartigen Vergleich überhaupt als sinnvoll und zulässig ansieht, kann höchstens sagen, daß von denjenigen Stoffen, die wir im Gehirn finden, die sogen. Neutralstoffe (Fette, Steroide u. a.) weniger an diesen Erscheinungen unmittelbar beteiligt sein dürften als solche, die als Kationen, Anionen oder auch Zwitterionen auftreten.

Zur Spezifität von Gehirnlipoiden

Alle derartigen Betrachtungen machen eine wesentliche Einschränkung nötig. Diese ergibt sich aus Untersuchungen über die Spezifität von Verbindungen, die man im Gehirn findet und die nicht oder nicht nur für direkte sinnesphysiologische Erscheinungen, sondern für andersartige physiologische Vorgänge von Bedeutung sind. Nicht alles, was an chemischen Substanzen im Gehirn vorkommt, findet man nur in diesem. Und nicht alles, was man darin findet, ist nur für elektrophysiologische Vorgänge von Bedeutung.

Als Beispiel sei ein Problem der Blutgerinnung angeführt. Präparate von Kephalin (das seinen Namen dem Vorkommen im Gehirn verdankt) vermögen die Blutgerinnung zu beschleunigen, d. h. als Thrombokinase zu wirken. Zum Test wird ein Eiweißpräparat aus Gewebe (Lunge) verwendet. Man fand nun, daß Kephalinpräparate auch nach Umsetzung mit salpetriger Säure, wobei die NH_2 -Gruppe des Moleküls durch OH ersetzt wird, noch wirksam sind. Daraus schloß man, daß nicht das Kephalin als solches, sondern noch unbekannte Beimengungen Träger der Wirkung sein müssen. Mit P. Klesse¹⁾ konnte jedoch gezeigt werden, daß auch synthetische, kristalline Verbindungen von analogem Bau, die frei von Stickstoff sind, als Thrombokinase im angeführten Test zu wirken vermögen (Tab. 1). Ebensowenig wie der N-Gehalt ist die Zugehörigkeit der Glycerinphosphorsäure zur D- bzw. L-Reihe entscheidend; dafür erlischt die Wirksamkeit bei Hydrierung der Doppelbindungen der Fettsäurereste.

Substanz	R	*	R'	Aktivität
Lecithin	$CH_2-CH_2-\overset{\oplus}{N}(CH_3)_3$	L	verschieden	—
Kephalin	$CH_2-CH_2-\overset{\oplus}{NH}_3$	L	Oleoyl	++
$CH_2-O-PO(OH)OR'$	CH_2-CH_3	L	Oleoyl	++
CH_2-OR'	CH_2-CH_3	D	Oleoyl	++
CH_2-OR'	CH_2-CH_3	L	ElaidoYL	++
	CH_2-CH_3	L	Stearoyl	—

Tabelle I. Zur Spezifität von Gehirnlipoiden. Vergleich der Thrombokinase-Aktivität von Lecithin und Kephalin mit derjenigen synthetischer Analoga

¹⁾ R. Kuhn u. P. Klesse, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 312, 214 [1958].

Man erkennt, wie merkwürdig und unerwartet manche Spezifitätserscheinungen auf dem Gebiet der Phospholipoide sind.

Die Ganglioside G_1 und G_2

Verbindungen, die im Gehirn vorkommen und eine stark saure Natur besitzen, sind die Ganglioside. Ihre Geschichte beginnt mit einer Untersuchung von E. Klenk²⁾, der vor 25 Jahren aus dem Gehirn eines Kindes, das an infantiler, amaurotischer Idiotie vom Typ Tay-Sachs gestorben war, eine Substanz X isolierte, von der später G. Blix³⁾ gezeigt hat, daß sie in viel geringeren Mengen regelmäßig im Gehirn vorkommt. Diese Substanz hat später den Namen Gangliosid erhalten. E. Klenk hat im Laufe seiner Untersuchungen⁴⁾ auch die Bausteine des Gangliosids festgestellt. Er fand nach Hydrolyse 6 verschiedene Bausteine, nämlich Stearinäure, Sphingosin, Glucose, Galaktose, Galaktosamin und schließlich eine Ketosäure mit 9 Kohlenstoffatomen, die dem Gesamt molekül den stark sauren Charakter aufprägt. Diese gehört zur Gruppe der Sialinsäuren, von denen G. Blix erstmals einen Vertreter aus Speicheldrüsen kristallisiert gewonnen hat⁵⁾. Verbindungen dieser Art sind heute auch als Bausteine von Proteinen des Serums und von Mucopolysacchariden bekannt und keineswegs für das Gehirn spezifisch. Die N-haltige Ketosäure mit 9 C-Atomen wird heute mit verschiedenen, gleichbedeutenden Namen benannt als Schafsfialinsäure, als N-Acetyl-neuraminsäure oder als Lactaminsäure.

Die Aufgabe der Konstitutionsaufklärung wurde mit H. Egge in Angriff genommen. Zunächst hat sich herausgestellt, daß man das Gangliosid aus Rinderhirn chromatographisch (an Cellulosesäulen) in zwei Komponenten trennen kann. Die eine wandert im Papierchromatogramm etwa doppelt, die andere etwa halb so schnell wie Lactose. Das Gangliosid G_2 , das rascher wandert, ist chemisch einfacher gebaut und von H. Egge aus Methanol/Äthanol kristallisiert gewonnen worden. Es schmilzt unter Zersetzung bei 189–190 °C. Es gibt scharfe Debye-Scherrer-Linien. Das Gangliosid G_1 , das langsamer wandert⁶⁾, ist auch kristallin erhalten worden, aber die Debye-Scherrer-Linien sind nicht so scharf und es besteht offensichtlich noch aus verschiedenen, recht ähnlichen Komponenten, deren Trennung noch nicht restlos gelang.

Verbindungen, deren Bau an den der Ganglioside erinnert, die aber frei von Fettsäure und Sphingosin sind, wurden in unserem Institut aus Kuhmilch (Kuhcolostrum) und aus Frauenmilch isoliert und bereits eingehend untersucht.

Tabelle 2 zeigt, daß in der Frauenmilch (F) eine viel größere Zahl derartiger Verbindungen zu finden ist als in der Kuhmilch (K). Das an erster Stelle stehende Trisaccharid, das 1 Mol Glucose, 1 Mol Galaktose und 1 Mol Lactaminsäure enthält, ist mit R. Brossmer bereits ausführlich untersucht worden⁷⁾. Weitere sind im Laufe des letzten Jahres durch A. Gauhe dazugekommen: ein isomeres Trisaccha-

²⁾ E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 235, 24 [1935].

³⁾ G. Blix, Scand. Arch. Physiol. 80, 46 [1938]; G. Blix, L. Svennerholm u. I. Werner (Isolierung von Galaktosamin-HCl aus Gangliosid), Acta chem. scand. 4, 717 [1950].

⁴⁾ E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 268, 50 [1941]; 273, 76 [1942]; E. Klenk u. F. Rennkamp, ebenda 273, 253 [1942]; E. Klenk, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 1632 [1942]; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 288, 216 [1951]; Naturwissenschaften 40, 449 [1953]; E. Klenk u. W. Gielen, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 283 [1960].

⁵⁾ G. Blix, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 240, 43 [1936]; IV. Internat. Kongr. Biochemie, Wien. Pergamon Press, London 1959, Bd. 1, S. 94.

⁶⁾ Die im folgenden als Gangliosid G_1 bezeichnete Fraktion ist identisch mit derjenigen, die in einem Vortrag (R. Kuhn, Naturwissenschaften 46, 43 [1959]) als $G_{0,5}$ bezeichnet worden war.

⁷⁾ R. Kuhn u. R. Brossmer, Chem. Ber. 92, 1667 [1959].

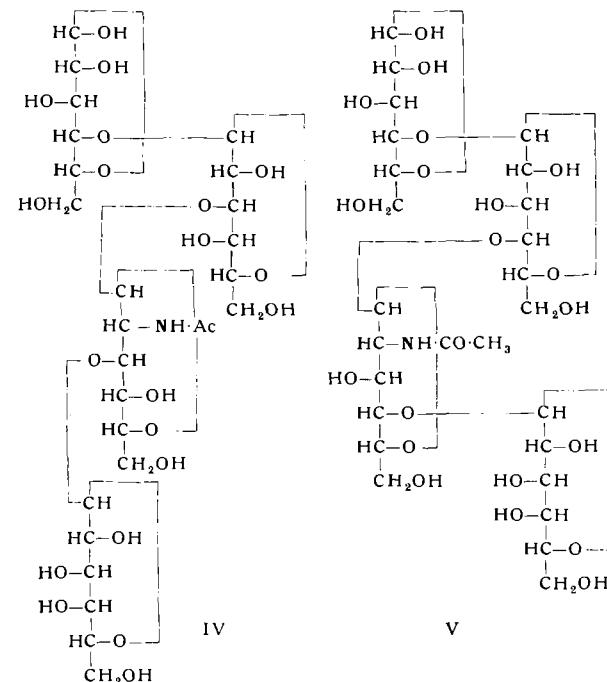
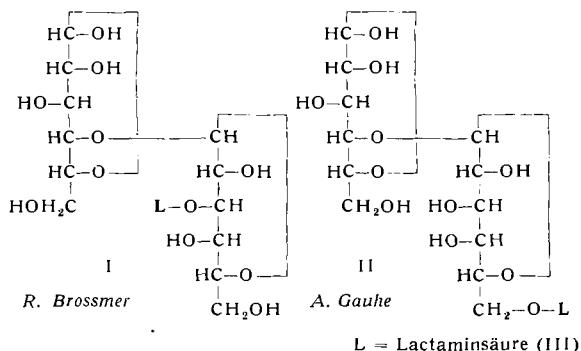
rid⁸), das die gleichen Bausteine aufweist und drei Oligosaccharide⁹), die je 5 Bausteine enthalten, nämlich je 1 Mol Glucose, 2 Mol Galaktose, 1 Mol N-Acetyl-glucosamin und 1 Mol Lactaminsäure; die Konstitution der letztgenannten Verbindungen ist bis auf die Verknüpfungsstelle der Lactaminsäure mit den neutralen Tetrasacchariden bereits geklärt.

Vorkommen in	Totalhydrolyse liefert				lactaminsäure-freier Baustein
	Gl	Gal	N-Ac	L	
K F	1	1	—	1	Lactose
F F	1	1	—	1	Lactose
F F	1	2	1	1	Lacto-N-tetraose
F F	1	2	1	1	Lacto-N-tetraose
F F	1	2	1	1	Lacto-N-neotetraose

Tabelle 2. Lactaminsäure-haltige Oligosaccharide aus Kuhmilch (K) und Frauenmilch (F)
Gl = Glucose, Gal = Galaktose, N-Ac = N-Acetyl- α -D-glucosamin, L = Lactaminsäure (N-Acetyl-neuraminsäure)

I ist die Formel der 3'-Lactaminsäure-lactose, die sowohl in der Kuhmilch als auch in der Frauenmilch vorkommt; die Konstitution II kommt der bisher nur in der Frauenmilch aufgefundenen 6'-Lactaminsäure-lactose zu.

Die beiden Tetrasaccharide, die mit Lactaminsäure (III) verknüpft in der Frauenmilch gefunden worden sind, entsprechen den Formeln IV und V. Die Formel der Lacto-N-tetraose (IV), die auch in freier Form angetroffen wird, hatten wir schon ermittelt. Die neue isomere Verbindung V bezeichnen wir als Lacto-N-neotetraose.



⁸) Vgl. Vortrag Zit. 6).

⁹) Unveröffentl.

Die beiden in ihrer Struktur so ähnlich erscheinenden Substanzen lassen sich im Reagenzglas leicht unterscheiden. Die Lacto-N-tetraose gibt nämlich die sog. *Morgan-Elson-Reaktion*: man erwärmt mit etwas verdünnter Soda-Lösung und gibt eine salzaure Lösung von p-Dimethylamino-benzaldehyd hinzu, worauf sich eine Purpurfärbung bildet. Die Lacto-N-neotetraose gibt diese Reaktion nicht. Der Unterschied beruht darauf, daß immer, wenn am N-haltigen Baustein die OH-Gruppe am C-Atom 4 blockiert ist, die Bildung des Farbstoffes ausbleibt, weil sich dann kein Acetaminofuran (Chromogen) bilden kann.

Bausteinanalyse

Die Hydrolysemethode ist für die Bausteinanalyse sialinsäure-haltiger Naturstoffe von Wichtigkeit. Wenn man nämlich Lactaminsäure-lactosen oder Ganglioside wie üblich durch Erwärmen mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure spaltet, dann bekommt man dicke Flocken von Huminstoffen, die auch andere Spaltstücke mitreißen. Man kann nach Versuchen mit E. Röhm die Huminbildung unterdrücken, wenn man die Hydrolyse mit einem größeren Volumen hochprozentiger (z.B. 96 proz.) Ameisensäure durchführt; dann bleiben die Lösungen klar und werden nur schwach bräunlich. Allerdings werden die Spaltstücke dabei zum großen Teil formyliert. Aber die Abspaltung der eingeführten Formylreste gelingt in einer zweiten Stufe schon mit sehr verdünnter Mineralsäure, was die Bruchstücke schont. Als Beispiel zeigt Tabelle 3 dieartige zweistufige Analysen der Lacto-N-tetraose, in der 1 Mol Glucosamin auf 2 Mol Galaktose und 1 Mol Glucose trifft.

Fragment	Ausbeute [%]			
1 Mol Glucosamin	96	99	97	91
2 Mol Galaktose ...	91	88	99	100
1 Mol Glucose	92	94	93	94

Tabelle 3. Baustein-Analyse der Lacto-N-tetraose
1. Hydrolyse: ca. 10 mg Subst., mit 5 cm³ 98-proz. Ameisensäure, 2. Hydrolyse: mit 0,5 cm³ n/2 HCl. — Je 4 h auf 100°C. Einzelwerte aus 4 Versuchen nach Papierchromatographie und Anfärbung mit alkal. Triphenyltetrazoliumchlorid

Mit Hilfe solcher und weiterer Bausteinanalysen hat sich gezeigt, daß das Gangliosid G₂ von den sechs angeführten Baustenen je 1 Mol enthält: 1 Mol Fettsäure, 1 Mol Sphingosin, 1 Mol Glucose, 1 Mol Galaktose, 1 Mol N-Acetylgalaktosamin und 1 Mol Lactaminsäure.

Methylierung und partielle Acetylyse

Es kam nun darauf an, die Verknüpfungsweise dieser Bausteine zu klären. Zu diesem Zweck bietet sich die klassische Methode der Permethylierung an, die auf Th. Purdie zurückgeht und von W. N. Haworth zur Konstitutionsermittlung der Disaccharide besonders ausgearbeitet wurde, wofür ihm 1937 der Nobelpreis für Chemie verliehen worden ist. Es hat sich herausgestellt, daß mit den üblichen Verfahren der Permethylierung die Konstitution der Ganglioside nicht erschlossen werden kann, auch nicht mit den verbesserten Varianten¹⁰), die wir für unsere Untersuchungen auf dem Gebiet der Frauenmilch ausgearbeitet hatten. Erstens sind diese Substanzen infolge ihrer Verzweigungen schwer methylierbar (unsere ersten Methylierungsversuche ergaben nur eine Aufnahme von 3-4% Methoxyl, während ca. 25% OCH₃ berechnet waren). Zwei-

¹⁰) R. Kuhn, H. Trischmann u. J. Löw, Angew. Chem. 67, 32 [1955]; R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Seeliger, Liebigs Ann. Chem. 611, 236 [1957].

tens treten bei alkalischer Reaktion Spaltungen des Moleküls ein. Das ist enttäuschend gewesen und war der Anlaß, die Methoden der Methylierung mit *H. Trischmann* sorgfältiger zu studieren. Wir methylieren heute mit Gemischen von Strontiumoxyd und Strontiumhydroxyd bzw. BaO und Ba(OH)₂ in Dimethylformamid als Lösungsmittel mit Methyljodid. SrO allein wirkt überhaupt nicht, und Sr(OH)₂ allein ganz schlecht. Mit Gemischen beider ist es möglich im erforderlichen Temperaturbereich die Methylierung durchzuführen. Dabei gibt es (die ersten Analysen wurden mit Lactose durchgeführt) gewisse Induktionsperioden (Abb. 1). Bei tiefer Temperatur (4 °C) springt die Methylierung viele Stunden lang überhaupt nicht an, führt dann allerdings ziemlich rasch zu hohen Methoxylwerten, während bei 40 °C unter denselben Bedingungen die Permethylierung in weniger als 1/2 Stunde praktisch beendet ist (Abb. 2). Auch das Volumen des Dimethylformamids, das

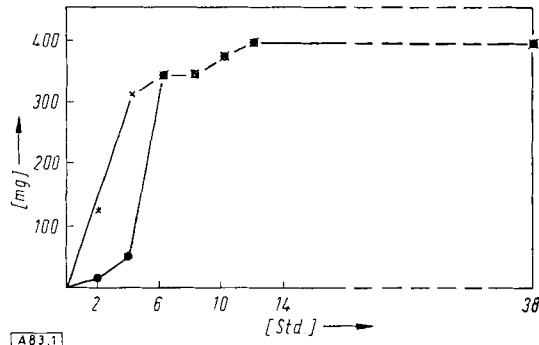


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Methylierung bei 20 °C
Je 340 mg Lactose + 10 cm³ Dimethylformamid + 2 cm³ CH₃J
—●— 2 g BaO + 80 mg Ba(OH)₂ · 8 H₂O, —×— 1,5 g SrO +
600 mg Sr(OH)₂ · 8 H₂O. Ordinate: mg CHCl₃-lösliche Methylierungs-
produkte, deren OCH₃-Gehalt nach Erreichung des Maximums dem
der Octamethyl-lactose entspricht

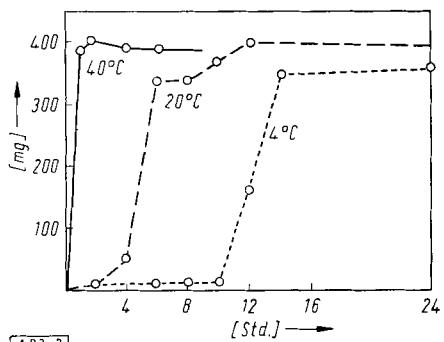


Abb. 2. Einfluß der Temperatur. Je 340 mg Lactose + 10 cm³ Dimethylformamid + 2 cm³ CH₃J + 2 g BaO + 80 mg Ba(OH)₂ · 8 H₂O. Ordinate: wie Abb. 1

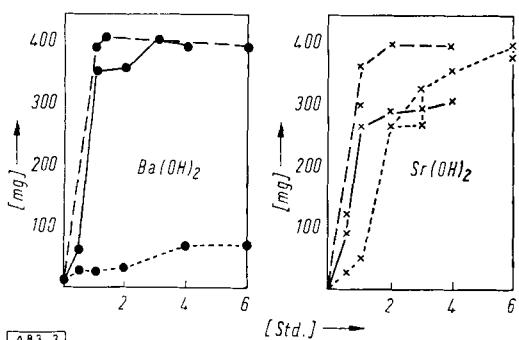


Abb. 3. Einfluß des Dimethylformamid-Volumens. Je 340 mg Lactose + 2 cm³ CH₃J + 2 g BaO + 80 mg Ba(OH)₂ · 8 H₂O bzw. 1,5 g SrO + 600 mg Sr(OH)₂ · 8 H₂O. ——— 5 cm³ Dimethylformamid,
— 10 cm³ Dimethylformamid, 20 cm³ Dimethylformamid. Ordinate: wie Abb. 1

man als Lösungsmittel verwendet, ist von Bedeutung (Abb. 3). Bei Variation des Verhältnisses Oxyd:Hydroxyd ergibt sich Abb. 4.

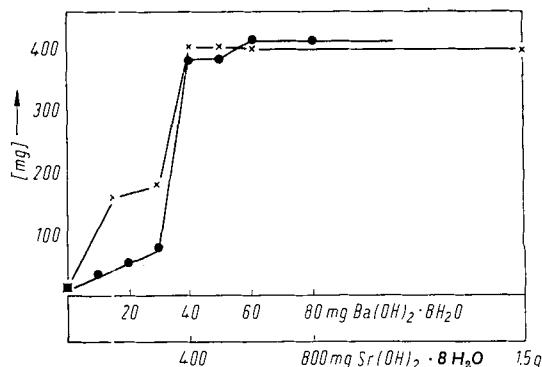


Abb. 4

Abb. 4. Steigende Mengen von Ba(OH)₂ und Sr(OH)₂. Je 340 mg Lactose + 10 cm³ Dimethylformamid + 2 cm³ CH₃J, —●— je 2 g BaO, —×— je 1,5 g SrO. Ordinate: wie Abb. 1

Auf Grund dieser Erfahrungen ist es möglich geworden, einen gewissen Einblick in die Verknüpfungsweise der Bausteine des Gangliosids G₂ zu gewinnen. Bei vorsichtiger Methylierung treten nach Hydrolyse 2,6-Trimethyl-glucose und 2,4,6-Trimethyl-galaktose auf. Einwandfrei schlüssig sind diese Ergebnisse aber nicht, weil die Ausgangsprodukte noch nicht den theoretischen Methoxylgehalt hatten und weil bei energischer Methylierung 2,3,6-Trimethyl-glucose und 2,3,4,6-Tetramethyl-galaktose auftraten, anscheinend infolge von Spaltungsreaktionen unter den alkalischen Bedingungen. Eine vollständige Sequenzanalyse ist uns bis heute auf diesem klassischen Wege nicht gelungen.

Es war aber möglich auf einem anderen Weg noch bestehende Zweifel zu beseitigen, und zwar durch partielle Acetylolyse¹¹⁾. Dazu wird das Gangliosid zunächst mit Acetanhydrid acetyliert, wobei alle OH-Gruppen erfaßt werden. Dann löst man das peracetylierte Produkt in einem Gemisch von Eisessig und Acetanhydrid und gibt etwas konz. Schwefelsäure hinzu. Darauf beginnt ein langsamer Abbau, ähnlich dem von Cellulose zu Octaacetylcellobiose. Wenn man die Reaktion nach geeigneten Zeiten unterbricht und entacetyliert, kann man größere Bruchstücke des Moleküls in die Hand bekommen. Einige davon, die frei von Fettsäure und Sphingosin sind, sind auch kristallisiert erhalten worden. Die Ergebnisse der Acetylolyse zeigt Tabelle 4.

R _L	Oligosaccharid	Bausteine
0,25	Tetrasaccharid	L, Ac-Gal, Gal, Gl <
0,48	Trisaccharid	Ac-Gal, Gal, Gl <
0,41	Trisaccharid	L, Gal, Gl < *)
1,00	Disaccharid	Gal, Gl < **)
1,22	Disaccharid	Ac-Gal, Gl <

Tabelle 4. Durch partielle Acetylolyse aus dem Gangliosid G₂ erhaltenes Oligosaccharide. R_L = R-Wert (aufsteigend) bezogen auf Lactose in Pyridin/Eisessig/Essigester/Wasser = 5:1:5:3
Ac-Gal = N-Acetyl-D-galaktosamin, L = Lactaminsäure

*) = 3'-Lactaminsäure-lactose (Formel I)

**) = Lactose

Für alle durch Acetylolyse aus dem Gangliosid G₂ erhaltenen Oligosaccharide wird hier die Wanderungsgeschwindigkeit in Papierchromatogrammen angegeben (weitere Oligosaccharide treten nicht auf). Das langsamste, ein Tetrasaccharid, das auch kristallin gewonnen wurde, ist aus Acetyl-galaktosamin, Lactaminsäure, Galaktose und Glu-

¹¹⁾ H. Masamune, H. Sinohara u. T. Okuyama, Tohoku J. exp. Med., 68, 165 [1958].

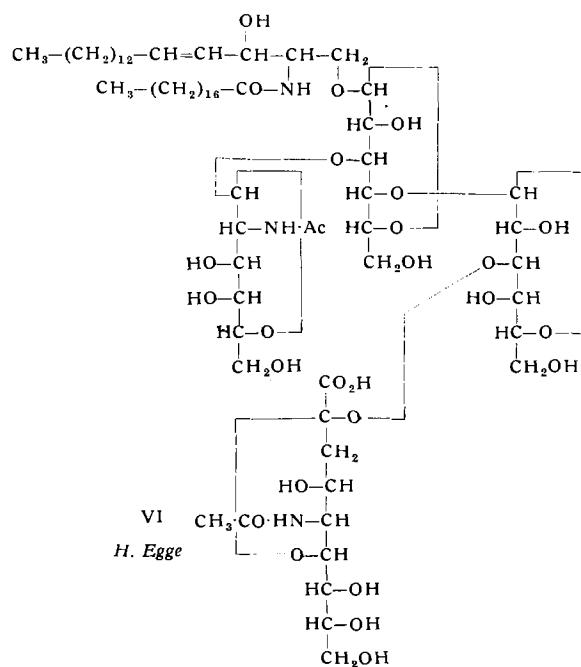
cose aufgebaut. Alle vier zuckerartigen Bausteine sind hier noch miteinander verknüpft und nur die fettlöslichen sind abgespalten worden. $\text{Gl} <$ bedeutet, daß Glucose das reduzierende Ende darstellt: wenn man das Tetrasaccharid zunächst reduziert, z.B. mit Natriumborhydrid, und anschließend mit Säure spaltet, so findet man keine Glucose mehr. Bei der Acetylyse treten ferner zwei Trisaccharide auf, in denen wiederum Glucose das reduzierende Ende darstellt. Das eine dieser Trisaccharide hat sich identifizieren lassen mit einem Trisaccharid, das wir bereits aus der Milch (in der es in freiem Zustand vorkommt) gewonnen hatten und dessen Konstitution durch Permethylierung gesichert ist. Dann folgen (Tab. 4) zwei Disaccharide. Das eine ist identisch mit Lactose. Das zweite ist aus N-Acetyl-galaktosamin und Glucose aufgebaut, wobei wiederum die Glucose das reduzierende Stück darstellt. Aus diesen Abbauprodukten kann man bereits mit Sicherheit schließen, daß der Zuckerbereich des Moleküls verzweigt sein muß: Acetyl-galaktosamin und Galaktose sind beide mit der Glucose verknüpft.

Die Gesamtheit der bis heute vorliegenden Erfahrungen stützt sich auf die Verarbeitung von etwa 350 kg Rinderhirn, die chromatographisch auf die Ganglioside G_1 und G_2 aufgearbeitet wurden. Tabelle 5 zeigt die Ausbeuten, die wir aus 100 kg Rinderhirn erhielten.

100 kg Rinderhirn (mit ca. 0,1 % Gesamtgangliosid)
je ca. 30 g Gangliosid G_1 und G_2 (chromatogr. getrennt)
ca. 0,3 g Tetrasaccharid: L, Ac-Gal, Gal, $\text{Gl} <$
ca. 0,15 g Trisaccharid: L, Gal, $\text{Gl} <$
Verhältnis $G_1 : G_2 = \text{meist ca. } 5 : 4$

Tabelle 5. Ausbeuten an Gangliosiden aus Rinderhirn und an den durch Acetylyse erhaltenen Oligosacchariden

Die angeführten methylierten Spaltstücke und Produkte der partiellen Acetylysen führen zum Formelbild VI für das Gangliosid G_2 , das die bisher bekannten Tatsachen am einfachsten zusammenzufassen erlaubt.



Dieses Formelbild erklärt auch unsere Feststellung, daß durch Perjodsäure weder die Glucose noch die Galaktose zerstört wird: keiner dieser beiden Reste zeigt zwei benachbarte OH-Gruppen. Das aus Glucose, Galaktose und Lactaminsäure aufgebaute Teilstück, das wir auch isoliert haben, ist identisch mit dem Trisaccharid I, das wir von der Milch her schon kennen. Die Ausbeute daran war allerdings

so klein, daß es unmöglich gewesen wäre, mit dem Tri-saccharid, das aus dem Gangliosid G_2 gewonnen wurde, die Struktur durch Permethylierung zu klären. Aber wir hatten ja hierfür aus der Kuhmilch viel größere Mengen davon. Der Formel VI entsprechend ist G_2 eine starke Säure vom Molekulargewicht 1383. Diesen Wert ± 20 findet man auch als Äquivalentgewicht, wenn man mit Phenolrot oder elektrometrisch titriert. Der Bauplan des Gangliosids G_2 entspricht somit einerseits dem der Cerebroside, die vor allem in der weißen Hirnsubstanz vorkommen und aus Fett-säure + Sphingosin + Hexose aufgebaut sind; andererseits entspricht er dem, den wir von der Milch her kennen. Beide Bauprinzipien sind hier miteinander verknüpft, wobei noch das N-Acetyl-galaktosamin hinzukommt.

Es sei daran erinnert, daß die Frauenmilch eine viel größere Mannigfaltigkeit saurer Oligosaccharide enthält als die Kuhmilch. Daraus ergibt sich die Frage, ob nicht auch im Gehirn des Menschen, im Molekularbereich der Ganglioside, eine größere Mannigfaltigkeit von sauren Oligosacchariden zu finden sein wird. Neuerdings hat J. Date¹²⁾ festgestellt, daß die von uns aus Frauenmilch isolierten neutralen (sialinsäure-freien) Oligosaccharide auch schon während der Schwangerschaft vom 7. Monat ab im Harn nachzuweisen sind. Sie sind also keineswegs für die Milch der Frau spezifisch.

Das Gangliosid G_1 ist erheblich komplizierter gebaut als G_2 . Es hat ein größeres Molekulargewicht, enthält mehr Lactaminsäurereste, mehr Galaktose-Reste und seine Einheitlichkeit ist noch nicht gesichert^{12a)}.

Physiologische Eigenschaften

Die folgenden Versuche sind, teils an unserem Institut, teils an anderen Instituten, mit Hilfe der kristallisierten Gangliosidpräparate in den letzten Monaten durchgeführt worden.

An erster Stelle ist anzuführen, daß beide Ganglioside durch Influenzavirus, und zwar durch verschiedene Stämme, gespalten werden, wobei Lactaminsäure freigesetzt wird. Das langsamer wandernde Gangliosid G_1 wird viel schneller gespalten als das schneller wandernde Gangliosid G_2 . Diese Spaltbarkeit zeigt, daß die Ganglioside für Influenzavirus Rezeptoren im Sinne von Paul Ehrlich sind. Ähnlich ist das Verhalten gegenüber einem Enzym, das man aus Choleravibionen gewinnen kann und das unter dem Namen RDE (receptor destroying enzyme) bekannt ist. Auch dieses greift beide Ganglioside hydrolytisch an, aber mit verschiedener Geschwindigkeit. Für die aus Milch isolierten, Lactaminsäure enthaltenden Verbindungen sind die Ergebnisse entsprechender Spaltungsversuche in Tabelle 6 verzeichnet.

Substrat	RDE	Infl.
Gangliosid G_1	+++	+++
Gangliosid G_2	+	+
3'-Lactaminsäure-lactose	++	+++
6'-Lactaminsäure-lactose	+	+
α -Lactaminsäure-lacto-N-tetraose	+	+
β -Lactaminsäure-lacto-N-tetraose	+	(-)
α -Lactaminsäure-lacto-N-neotetraose ..	+	+

Tabelle 6. Spaltbarkeit der Ganglioside und der aus Milch isolierten sauren Oligosaccharide (vgl. Tab. 2) durch das receptor destroying enzyme und durch Influenzavirus (Stamm PR 8)

¹²⁾ J. Date, Privatmitteilung.

^{12a)} Zusatz bei der Korrektur (10. Okt. 1960): Inzwischen konnte das Gangliosid G_1 durch weitere Chromatographie an Cellulosesäulen in 3 Komponenten zerlegt werden, die alle aus Methanol/Chloroform kristallisiert erhalten wurden. Bezogen auf die am schnellsten wandernde Komponente $G_{1a} = 1$ betragen die RP-Werte (in Butanol/Pyridin/Wasser = 6:5:4, aufsteigend): $G_{1b} = 0.55$ und $G_{1c} = 0.25$.

Von erheblichem Interesse verspricht das Verhalten der Ganglioside gegenüber verschiedenen Toxinen zu werden. 1898 hat A. Wassermann¹³), nach dem die bekannte Reaktion auf Syphilis benannt worden ist, festgestellt, daß Tetanustoxin von Gehirnsubstanz gebunden wird. 1906 hat dann K. Landsteiner¹⁴), der Entdecker der Blutgruppen-substanzen, sich bemüht, diejenigen Substanzen aus dem Gehirn anzureichern, die das Gift des Wundstarrkrampf-Erregers zu binden vermögen. In den letzten Jahren sind diese Bestrebungen erfolgreich fortgeführt worden in Oxford durch Prof. W. E. van Heyningen¹⁵), dem wir unsere Gangliosidpräparate zur Verfügung gestellt haben. Er fand, daß beide kristallisierten Ganglioside Tetanustoxin spezifisch binden¹⁶). Tetanustoxin gehört zu den wirksamsten Giften; 10^{-7} mg sind die letale Dosis für eine Maus. Man hat schon lange vermutet, daß es für derartige Toxine sehr spezifische Angriffspunkte geben müsse, um die hohe Wirksamkeit zu erklären. Die Abb. 5, ein Diagramm von Prof. van Heyningen, zeigt, wie in der analytischen Ultrazentrifuge einerseits das Gangliosid, andererseits das Tetanus-toxin wandert und wie das Hirnlipoid vom Toxin „mitgenommen“ wird.

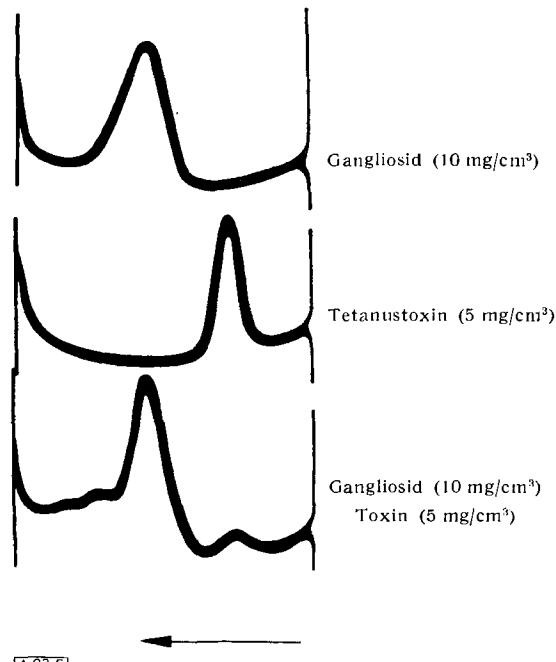


Abb. 5. Bindung der krist. Ganglioside durch Tetanustoxin. Ultrazentrifuge, 42040 U/min, 20°C; nach W. E. van Heyningen.

Welcher Art die Kombination zwischen Gangliosid und Toxin ist, weiß man noch nicht; es scheint nicht, wie bei der Einwirkung von Influenzavirus, zur Abspaltung von Sialinsäure zu kommen; offenbar ist ein anderer Mechanismus im Spiel. Man kann aber sagen, daß das saure Trisaccharid der Milch, welches als solches schon Rezeptor für Influenzavirus und RDE ist, überdies auch ein Rezeptor für das Tetanustoxin wird, wenn noch Fettsäure, Sphingosin und N-Acetyl-galaktosamin in das Molekül eintreten. Versuche mit Botulinustoxin sind noch nicht ausgeführt worden; sie erfordern besondere Sicherheitsmaßnahmen.

Weitere Prüfungsergebnisse verdanken wir Prof. O. Westphal¹⁷) in Freiburg/Brsg. Er hat festgestellt, daß beide Prä-

¹³⁾ A. Wassermann u. T. Takaki, Berl. klin. Wochschr. 35, 5 [1898].
¹⁴⁾ K. Landsteiner u. A. Botteri, Zbl. Bakt. (Orig.) 42, 562 [1906].

¹⁵⁾ W. E. van Heyningen, J. gen. Microbiol. 20, 310 [1959].

¹⁶⁾ Privatmitteilungen.

¹⁷⁾ Privatmitteilungen. a) Pyrogenität: Die minimale Pyrogen-Dosis, die bei 5 Kaninchen eine Temperatursteigerung von $0,6^{\circ}\text{C}$ hervorruft, lag für G_1 und G_2 bei 150–200 γ/kg . — b) Unspezi-

parate (G_1 und G_2) bei Mäusen eine Resistenzsteigerung gegenüber *Coli*-Bakterien hervorrufen, derart, daß die Mäuse das 100- bis 200-fache der tödlichen Dosis von *Coli*-Keimen (Typ Standard Rowland aus London) vertragen. Überdies hat O. Westphal an Kaninchen festgestellt, daß die kristallisierten Ganglioside die Körpertemperatur erhöhen, daß sie ähnlich wie fiebererzeugende Stoffe wirken.

Für die künstliche Erzeugung von Fieber ist 1927 ein Nobelpreis verliehen worden, an einen Mediziner. Als dieser bereits in Schweden war, im Zug nach Stockholm, stieg in dasselbe Abteil eine Dame ein, die gegenüber von ihm Platz nahm. Im Gespräch ergab sich bald, daß auch sie zur Entgegnahme eines Nobelpreises nach Stockholm fuhr, des Literaturpreises. Es war die Dichterin Grazia Deledda. Sie war in Sardinien geboren und hatte viel auch in sardischer Sprache geschrieben. Unter ihren Romanen war einer, der von einem jungen Mann handelt, der geisteskrank war und in die macedonischen Sumpfe verschlagen wurde. Dort bekam er hohes Fieber und davon wurde er gesund. Auf die Gegenfrage der Dichterin, wofür der Nobelpreis für Medizin verliehen worden sei, antwortete Hofrat Julius Wagner-Jauregg: für die Malaria-Therapie der Paralyse. Man erkennt daran, wie nahe die Beziehungen der Geisteswissenschaften zu den Naturwissenschaften und der Medizin mitunter sind.

Seit jener Zeit hat man über das Fieber und seine künstliche Erzeugung in vielen Ländern intensiv weitergearbeitet. O. Westphal¹⁸⁾ ist es gelungen, die Endotoxine, die Pyrogene fiebererzeugender Bakterien, in hoher Reinheit darzustellen. Es sind sehr hochmolekulare Verbindungen, deren Konstitution wir noch lange nicht in allen Einzelheiten kennen. Jetzt zeigt sich, daß relativ einfache, kristallisierte Verbindungen bekannter Konstitution ebenfalls Fieber zu erzeugen vermögen. Das allein ist nicht besonders bemerkenswert; es gibt noch viele andere Stoffe, die gleichartig wirken. Aber die Ganglioside, welche die Körpertemperatur steigern, sind körpereigene Stoffe. Das ist deshalb von Interesse, weil seit Jahren der Verdacht besteht, daß die Endotoxine der Bakterien, die Fieber in viel geringeren Dosierungen hervorrufen, nicht direkt wirken; daß sie erst körpereigene (sog. endogene) Stoffe in Freiheit setzen, die dann ihrerseits auf die Wärmeregulierung des Körpers einwirken. Aus diesem Grunde ist es nicht ausgeschlossen, daß ein weiteres Studium der Ganglioside und verwandter Verbindungen zur Klärung der Frage nach den endogenen (körpereigenen) fiebererzeugenden Stoffen beitragen wird. -- Versuche auf dem Gebiet der Blutsenkung sowie Versuche an den Synapsen sind im Gang.

Man mag erkannt haben, wie verschiedenartig und unerwartet manche der physiologischen Eigenschaften sind, die hier ein und dasselbe Molekül aufweist. Die Arbeiten über die Konstitution der Ganglioside dürften aber auch für die menschliche Genetik noch aufschlußreich werden, denn der Ausgangspunkt ist ja die Entdeckung jener Substanz X im Gehirn eines Kindes gewesen, das an infantiler, amaurotischer Idiotie gestorben war. Die amaurotische Idiotie vom Typ Tay-Sachs ist eine relativ seltene Erbkrankheit, von der bis heute nur etwas über 100 Fälle in der Weltliteratur beschrieben sind; über 90% davon in jüdischen Fa-

fischen Infektresistenz: Die Zahlen bedeuten die Zehnerpotenzen im Vergleich zur Keimzahl der Kontrollen, d.h. +2,0 bedeutet, daß die Versuchstiere die 10²-fache Menge Keime im Vergleich zu den Kontrollen vertragen.

	4	8	24	48	Std.
Gangliosid 1	1 γ	+1,0	+1,6	-0,1	+0,1
	50 γ	+1,4	+2,4	0	+0,4
Gangliosid 2	1 γ	+1,0	+1,5	-0,2	-0,4
	50 γ	+1,2	+2,0	+0,9	+1,2

Als Versuchstiere dienten Mäuse, die mit dem *Coli*-Stamm *E. Coli* 145 von Dr. D. Rowley (London) infiziert wurden.

¹⁸⁾ O. Westphal, Naturwissenschaften 46, 50 [1959]; A. M. Staub, R. Tinelli, O. Liederitz u. O. Westphal, Ann. de l'Institut Pasteur 96, 303 [1959].

milien^{19, 20}). Ob die bei Gangliosid-Speicherkrankheiten auftretenden Ganglioside identisch sind mit denjenigen, die wir bisher aus Rinderhirn kennen, weiß man nicht.

Die letzte Frage wäre, wieweit Untersuchungen der angedeuteten Art überhaupt dazu beitragen können, elektrophysiologische und sinnesphysiologische Erscheinungen besser zu verstehen. Auf diese Frage wäre folgende Antwort zu geben: Man stelle sich vor, daß es irgendwo in der Welt Chemiker gäbe, die noch nie von einem Magnetophonband etwas erfahren haben; diese kämen plötzlich in den Besitz eines solchen, und sie würden ausfindig machen wollen, woraus es besteht. Vielleicht gelänge es ihnen auch zu erfahren, wozu ein solches Band dient, nämlich die menschliche Sprache, Musik und andere Laute zu speichern und wiederzugeben. Diese Chemiker würden feststellen,

¹⁹⁾ P. B. Diezel: Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipoide. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957.

²⁰⁾ Yi-Yung-David-Hsia: Inborn Errors of Metabolism, Hsia Publishers, Chicago 1959.

daß es sich um einen Kunststoff handelt, der aus lauter $-CH_2-CHCl-$ -Gruppen besteht, die Anorganiker würden die Formel des Fe_2O_3 wiedererkennen, die Kristallographen die genaue räumliche Anordnung der Eisen- und Sauerstoffatome festlegen, die Physiker schließlich würden erklären können, wieso die nachgewiesenen Kristallflitter ferromagnetisch sind. Aber all diese physikalisch-chemisch-analytische Arbeit zusammen würde nur besagen, woraus das Magnetophonband besteht. Sie würde noch nicht erklären, wie es eigentlich funktioniert. In einem ähnlichen Sinne haben wir wohl auch alle rein chemischen Untersuchungen auf dem Gebiet der Gehirnlipide zu bewerten, die so mühsam sind. Sie sind nur ein Schritt auf einem Weg, der noch viele weitere Schritte erfordert, zu denen die Physiologen, die Elektrophysiologen und andere beitragen werden. Was wir anstreben ist, das Stoffliche zu klären, um ein besseres Verständnis des Physiologischen, des Funktionellen, anzubauen.

Eingegangen am 2. September 1960 [A 83]

Synthesen in der Vitamin-A-Reihe

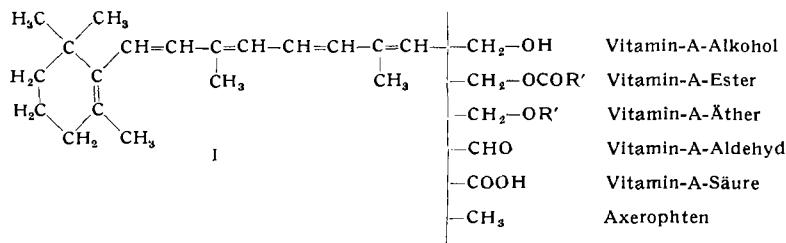
Von Dr.-Ing. HORST POMMER

Hauptlaboratorium der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik AG, Ludwigshafen am Rhein

Als der Verfasser vor fast 8 Jahren von dem damaligen Leiter der Forschung der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik, Prof. Dr. W. Reppe, den Auftrag erhielt, eine neue Vitamin-A-Synthese zu entwickeln, lag eine Fülle meist nicht zum Ziel führender Arbeiten auf diesem Gebiet vor und die ausgezeichnete, technische Synthese des Vitamin A von O. Isler schien die einzige brauchbare zu bleiben. Ohne neue präparative Erkenntnisse wäre es, zumindest auf neuen Pfaden, nicht möglich gewesen, die Aufgabe zu bewältigen. Erst eine neue Reaktion, die Wittigsche Olefinsynthese, gab das Werkzeug für Arbeiten, in deren Verlauf zahlreiche neue Synthesen des Vitamins A und seiner biologisch wirksamen Derivate gefunden wurden und die mit der Ausarbeitung eines technischen Verfahrens zur Darstellung des Vitamins A einen vorläufigen Abschluß erreicht haben.

Neue Synthesen des Vitamins A wurden in den letzten 10 Jahren überwiegend in Industrielaboratorien ausgearbeitet. Sie sind daher zumeist nur in Form von Patentanmeldungen bekanntgemacht worden. Einen Überblick geben zusammenfassende Darstellungen¹⁾. Unsere Arbeiten begannen Ende 1952. Sie haben jetzt mit einem neuen technischen Verfahren zur Synthese des Vitamins A einen gewissen Abschluß erreicht.

Zum besseren Verständnis sei zunächst die Konstitution des Vitamins A beschrieben: man kann es sich aus 4 Isoprenresten aufgebaut denken. Charakteristisch sind der Trimethylcyclohexen-Ring und die Polyen-Seitenkette. In der Natur kommt das Vitamin A als Alkohol, meist verestert, vor. Vitamin-A-Aldehyd, das Retinol, spielt eine hervorragende Rolle beim Sehvorgang. Kunstprodukte sind die biologisch ebenfalls wirksamen Vitamin-A-Äther, die Vitamin-A-Säure und ihre Ester sowie das Desoxy-Vitamin A, das sog. Axerophthen. Auf das Vitamin A₂, das in den Leibern von Süßwasserfischen vorkommt und einen Trimethylcyclohexadien-Ring aufweist, soll nicht weiter eingegangen werden.



¹⁾ O. Isler, Chimia [Zürich] 4, 103 [1950]; E. Vogel u. H. Knobloch: Chemie und Technik der Vitamine. 3. Aufl., Ferdinand Enke, Stuttgart 1950, Bd. 1, S. 18; J. G. Baxter: Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe. J. Springer, Wien 1952, Bd. 9, S. 41; I. Heilbron u. B. C. L. Weedon, Bull. Soc. chim. France 1958, 83.

Synthese-Möglichkeiten

Will man eine chemische Verbindung synthetisieren, so muß man das Molekül zunächst in Bruchstücke zerlegen, die für eine Rekombination geeignet erscheinen. Das folgende Schema zeigt, welche Zersetzung des Vitamin-A-Moleküls wir für unsere Synthesen — soweit sie hier beschrieben werden — gewählt haben. Zur Rekombination

