

## Schluß

In 34 Jahren Vitamin-D-Forschung wurden vor allem durch Windaus und seine Schule viele und entscheidende Fortschritte errungen und in den letzten 10 Jahren auf diesem Fundament weitere Erkenntnisse erarbeitet. Aber noch immer gibt es offene Fragen und lockende Ziele, z. B. der Aufbau des wesentlich anderen Trien-Chromophors des Praecalciferols bzw. des Tachysterins. Andererseits haben französische Forscher in den letzten Jahren die Existenz

eines neuen, in der pflanzlichen und tierischen Welt weit verbreiteten antirachitischen Faktors behauptet. Wenngleich eine Bestätigung dieser Angaben noch aussteht, bzw. unsere eigenen Nachprüfungen von der rein chemischen Seite her negativ verlaufen sind, so müssen die Angaben der französischen Autoren Raoul und Baron im Hinblick auf ihre Bedeutung im Bereich der antirachitischen Vitamine doch weiter geprüft werden.

Eingegangen am 25. Juli 1960 [A 64]

## 3.6-Didesoxy-hexosen - Chemie und Biologie

Von Prof. Dr. O. WESTPHAL und Dr. O. LÜDERITZ

Wander-Forschungsinstitut, Freiburg/Brsg.

Professor Dr. Richard Kuhn zum 60. Geburtstage gewidmet

In den letzten Jahren wurde, hauptsächlich bei Bakterien, eine neue Klasse von Desoxyzuckern aufgefunden und — gemeinsam mit den Arbeitskreisen von A. M. Staub und E. Lederer — als 3.6-Didesoxyhexosen aufgeklärt. Von den theoretisch möglichen acht Stereoisomeren sind bislang wenigstens fünf natürliche Vertreter, darunter zwei Paare von optischen Antipoden, bekannt. Ihre Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese sowie Nachweisverfahren werden beschrieben. In Zusammenarbeit mit F. Kauffmann wurden umfangreiche Zuckerbaustein-Analysen von Polysacchariden (O-Antigenen) bei Salmonellen u. a. durchgeführt; 3.6-Didesoxy-hexosen treten häufig auf und sind charakteristisch für bestimmte Serogruppen. Als Bausteine spezifischer Polysaccharide in der bakteriellen Zellwand besitzen die jeweils terminal gebundenen 3.6-Didesoxy-hexosen vielfach immunologische Funktion als determinante (spezifitäts-bestimmende) Endgruppen (mit A. M. Staub und R. Tinelli). Dies wurde u. a. durch Darstellung eines künstlichen Antigens mit Colitose (3-Desoxy-L-fucose) als determinanter Gruppe demonstriert. Die Immunisierung geeigneter Tiere führte nicht nur zu Antikörpern gegen Colitose, sondern auch gegen einige pathogene Bakterien, welche colitose-haltige Zellwand-Polysaccharide bilden (E. coli O 111 u. a.). Einige biochemische und genetische Aspekte im Zusammenhang mit 3.6-didesoxyhexose-haltigen bakteriellen Zellwand-Polysacchariden werden erörtert und diskutiert.

### Einleitung

Bei der Baustein-Analyse der Polysaccharide (Lipopolysaccharide<sup>1,2)</sup>) gram-negativer Bakterien, insbesondere von Enterobacteriaceen, wurde in den letzten Jahren eine bislang unbekannte Klasse von Desoxyzuckern entdeckt. 1952 beschrieben A. M. Staub<sup>3)</sup> und O. Westphal<sup>4)</sup> das Vorkommen chromatographisch rasch wandernder Aldosen in Hydrolysaten der somatischen Polysaccharid-Antigene (O-Antigene<sup>1,2)</sup>) von Typhus- und anderen *Salmonella*-Bakterien. Westphal, Lüderitz und Mitarbeiter<sup>5)</sup> konnten 1953 zwei derartige Zucker — Abequose und Tyvelose — isolieren und mit speziell entwickelten Sulfonylhodiazid-Reagentien<sup>6)</sup> in kristallisierte Derivate verwandeln. Die Analyse zeigte, daß es sich um stereoisomere Didesoxy-aldo-hexosen (Desoxy-methylpentosen) der Formel C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> handelt<sup>5)</sup>. 1957 beschrieben E. Lederer und Mitarbeiter<sup>7)</sup> eine Didesoxy-hexose als Baustein der Zellmembran von Ascariden-Eiern — Ascarylose —, welche sich chromatographisch und chemisch genau wie Tyvelose verhielt.

Die Struktur der neuen Zucker wurde gemeinsam mit den Arbeitskreisen von E. Lederer und A. M. Staub ermittelt<sup>8)</sup>. Es ergab sich, daß die neuen Zucker 3.6-Didesoxy-aldo-

hexosen<sup>8-10)</sup> und daß Tyvelose und Ascarylose optische Antipoden sind<sup>10)</sup>. — 1958 wurden noch zwei weitere isomere 3.6-Didesoxy-hexosen entdeckt: Paratose<sup>11)</sup> als Baustein des spezifischen Polysaccharids von *Paratyphus A*-Bakterien und Colitose<sup>12)</sup> im Polysaccharid-Antigen eines *Enteritis*-Erregers, *Escherichia coli* O 111. Abequose und Colitose erwiesen sich wiederum als optische Antipoden<sup>10,12)</sup>. Kürzlich hat D. A. L. Davies<sup>13)</sup> Ascarylose im Polysaccharid-Antigen von *Pasteurella pseudotuberculosis* Typ V gefunden.

3.6-Didesoxy-hexosen mit ihren drei Asymmetrie-Zentren im Molekül können theoretisch acht Stereoisomere (vier Paare von Antipoden) bilden; von diesen sind in den letzten Jahren wenigstens fünf Vertreter in Bakterien aufgefunden worden (Tabelle 1 s. S. 882).

Die stereochemische Zuordnung aller bislang aufgefundenen 3.6-Didesoxyhexosen gelang durch Synthese einzelner Vertreter und deren Vergleich mit den natürlichen Desoxyzuckern. Abequose<sup>14)</sup>, Paratose<sup>15,16)</sup> und Tyve-

<sup>1)</sup> O. Westphal u. O. Lüderitz, Angew. Chem. 66, 407 [1954].

<sup>2)</sup> O. Westphal, Ann. Inst. Pasteur 98, 789 [1960].

<sup>3)</sup> G. Poni u. A. M. Staub, Bull. Soc. chim. biol. [Paris] 34, 1132 [1952].

<sup>4)</sup> O. Westphal, Angew. Chem. 64, 314 [1952].

<sup>5)</sup> O. Westphal, O. Lüderitz, I. Fromme u. N. Joseph, Angew. Chem. 65, 555 [1953].

<sup>6)</sup> O. Westphal, H. Feier, O. Lüderitz u. I. Fromme, Biochem. Z. 326, 139 [1954].

<sup>7)</sup> C. Fouquey, J. Polonsky u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. biol. [Paris] 39, 101 [1957].

<sup>8)</sup> C. Fouquey, E. Lederer, O. Lüderitz, J. Polonsky, A. M. Staub, S. Stirm, R. Tinelli u. O. Westphal, C. r. hebdo. Séances Acad. Sci. Paris 246, 2417 [1958].

<sup>9)</sup> I. Fromme, K. Himmelsbach, O. Lüderitz u. O. Westphal, Angew. Chem. 69, 643 [1957].

<sup>10)</sup> C. Fouquey, J. Polonsky u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. biol. [Paris] 40, 315 [1958].

<sup>11)</sup> D. A. L. Davies, I. Fromme, O. Lüderitz, A. M. Staub u. O. Westphal, Nature [London] 181, 822 [1958].

<sup>12)</sup> O. Lüderitz, A. M. Staub, S. Stirm u. O. Westphal, Biochem. Z. 330, 193 [1958].

<sup>13)</sup> A. P. Mac Lennan u. D. A. L. Davies, Aldoheptoses and other novel sugars produced by bacteria. Colloque internat. sur la Biochimie des Glycides Paris (18.-21. 7. 1960). Bull. Soc. chim. France, im Druck.

<sup>14)</sup> O. Westphal u. S. Stirm, Liebigs Ann. Chem. 620, 8 [1959].

<sup>15)</sup> C. Fouquey, J. Polonsky, E. Lederer, O. Westphal u. O. Lüderitz, Nature [London] 182, 944 [1958].

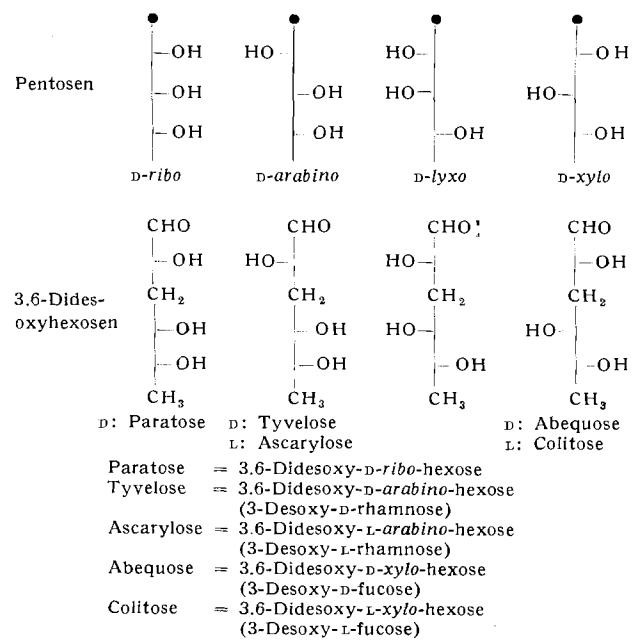
<sup>16)</sup> C. Fouquey, J. Polonsky u. E. Lederer, Bull. Soc. chim. France 1959, 803.

Jahr	3.6-Didesoxyhexose	Isoliert aus	Lit.
1952/53	Abequose	Lipopolysaccharid von <i>S. abortus equi</i>	<sup>5)</sup>
1952/53	Tyvelose	Lipopolysaccharid bzw. Polysaccharid von <i>S. typhi</i>	<sup>3, 5)</sup>
1957	Ascaryllose	Glykolipoid der Eimembran von <i>Parascaris equorum</i>	<sup>7)</sup>
		Lipopolysaccharid von <i>P. pseudotuberculosis Typ V</i>	<sup>13)</sup>
1958	Paratose	Lipopolysaccharid von <i>S. paratyphi A</i>	<sup>11)</sup>
1958	Colitose	Lipopolysaccharid v. <i>E. coli O 111</i>	<sup>12)</sup>

Tabelle 1. Die natürlichen 3.6-Didesoxy-hexosen

lose<sup>16)</sup> wurden zuerst aus bekannten Hexose-Derivaten synthetisiert. Das Antipoden-Paar Abequose/Colitose konnte in einer Totalsynthese mit *E. Rüde*<sup>17)</sup> erhalten und mit einem optisch aktiven Hydrazinderivat weitgehend in die optischen Antipoden gespalten werden. Auf Grund dieser Untersuchungen ergab sich für die bekannten natürlichen 3.6-Didesoxy-hexosen die folgende Zuordnung: Abequose und Colitose leiten sich von D- bzw. L-Galaktose ab, Tyvelose und Ascaryllose von D- und L-Mannose, und Paratose von D-Glucose (Schema 1); nicht aufgefunden wurden bislang die beiden Antipoden vom Talose-Typ.

Von der Internationalen Nomenklatur-Kommission auf dem Gebiet der Zucker (Leiter: Prof. Dr. W. L. Wolfrom, Columbus, Ohio/USA) ist festgelegt worden (Regel 6), daß bei Desoxyzuckern vorhandene Desoxy-Gruppen ( $-\text{CH}_2-$ ) bei der stereochemischen Strukturbezeichnung sozusagen wegfallen, so daß 3-Desoxy- ebenso wie 3.6-Didesoxy-hexosen stereochemisch auf die entsprechenden Pentosen mit der gleichen Folge von drei asymmetrischen C-Atomen bezogen werden. Die derart theoretisch zugehörige Pentose wird als Präfix der Desoxy-hexose vorangestellt. In Schema 1 ist diese Nomenklatur neben gebräuchlichen Trivialnamen aufgeführt.



Schema 1. Konfiguration und Nomenklatur der 3.6-Didesoxyhexosen. ♦ = C-Atom 1

Über die Chemie der 3.6-Didesoxy-hexosen hat O. Lüderitz<sup>17a)</sup> kürzlich zusammenfassend berichtet.

In der Folge hat sich gezeigt, daß 3.6-Didesoxy-hexosen in Bakterien weitverbreitet vorkommen und daß sie als Bausteine der spezifischen Polysaccharide in den Zellwänden

<sup>17)</sup> E. Rüde u. O. Westphal, unveröffentl.

<sup>17a)</sup> O. Lüderitz, Die Chemie der 3.6-Didesoxy-hexosen. Colloque internat. sur la Biochimie des Glycides, Paris (18.–21. 7. 1960). Bull. Soc. chim. France, im Druck.

den<sup>18, 19)</sup> biologisch wichtige Funktionen ausüben. Sie sind jeweils terminal, d. h. an Kettenenden, in den stark verzweigt gebauten Polysaccharid-Molekülen gebunden<sup>1, 2)</sup> und beeinflussen durch ihre An- oder Abwesenheit den lyophil-lipophilen Charakter der bakteriellen Zelloberfläche (siehe z. B.<sup>20)</sup>). Von besonderem Interesse ist der Befund von A. M. Staub und R. Tinelli, daß einige 3.6-Didesoxy-hexosen in den polysaccharidischen Bakterien-Antigenen (O-Antigenen) eine immunspezifisch determinante Funktion ausüben; sie bilden vielfach die determinanten Endgruppen welche für die serologische Spezifität der betreffenden Antigene verantwortlich sind<sup>21, 22)</sup> (siehe auch<sup>23)</sup>). A. M. Staub und Mitarbeiter<sup>21, 22)</sup> zeigten, daß einzelne 3.6-Didesoxy-hexosen die Immunreaktion (Präcipitation) von Bakterien-Polysaccharid mit entsprechendem Antiserum spezifisch hemmen (siehe auch<sup>24)</sup>). Als weiteren Beweis der immunologisch determinanten Funktion von 3.6-Didesoxy-hexosen haben Lüderitz, Westphal, Staub und Le Minor<sup>25)</sup> kürzlich künstliche Antigene mit Colitose als determinanter Gruppe dargestellt (Colitosephenylazoproteine). Die Immunisierung geeigneter Tiere ergab colitose-spezifische Antiseren, welche mit *E. coli O 111*-Bakterien und serologisch verwandten Keimen der *Salmonella*-Gruppe (z. B. *S. adelaide* mit O 35-Antigen) stark kreuzreagieren.

3.6-Didesoxy-hexosen bilden somit nicht nur eine neue Klasse natürlicher Polysaccharid-Bausteine, besonders von Bakterien, sie haben als sterisch bevorzugt gebundene Bausteine der bakteriellen Zellwand auch biologisch besondere Bedeutung.

### Isolierung, Reindarstellung und Charakterisierung

Zur Gewinnung der 3.6-Didesoxy-hexosen geht man am besten von den gereinigten protein-freien Lipopolysacchariden der Bakterien<sup>1, 2)</sup> aus, welche man z. B. mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens<sup>26)</sup> direkt aus den Bakterien isolieren kann (siehe auch<sup>20)</sup>).

Die aus flüssigen Kulturen abgeschleuderten Bakterien werden mit einer auf 60–65 °C erwärmten, homogenen Mischung von Phenol und Wasser (1:1) 5–30 min extrahiert. Beim Abkühlen des Ansatzes bilden sich zwei Schichten, die sich durch Zentrifugation leicht trennen lassen; man erhält eine obere wässrige Schicht und eine untere phenolische Phase, daneben einen Bodensatz der phenolwasser-unlöslichen Anteile. Die wässrige Phase enthält die bakterielle Lipopolysaccharid-Fraktion neben Nucleinsäure. Nach Dialyse und Einengen der kolloidal-wässrigen Lösung wird durch Ultrazentrifugation<sup>27)</sup> das sedimentierende Lipopolysaccharid von der nicht-sedimentierenden Nucleinsäure getrennt. Die Ausbeute an Lipopolysaccharid beträgt ≈ 2–4 % der bakteriellen Trockensubstanz.

Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse von Lipopolysacchariden, welche eine 3.6-Didesoxy-hexose enthalten, ergab, daß die Didesoxyhexose sehr rasch und vor allen anderen Zuckerbausteinen freigesetzt wird (siehe Bild 3 in<sup>1</sup>), S. 415). Daraus haben wir geschlossen, daß diese Zucker endständig in den betreffenden Polysacchariden

<sup>18)</sup> C. S. Cummins, Internat. Rev. Cytol. 5, 25 [1956]; J. F. Wilkinson, Bact. Rev. 22, 46 [1958].

<sup>19)</sup> Siehe auch E. Kröger, O. Lüderitz u. O. Westphal, Naturwissenschaften 46, 428 [1959].

<sup>20)</sup> F. Kauffmann, O. Lüderitz, H. Stierlin u. O. Westphal, Zbl. Bakt. I. Orig. 178, 442 [1960].

<sup>21)</sup> A. M. Staub u. R. Tinelli, Bull. Soc. chim. biol. [Paris] 39, Suppl. I, 65 [1957].

<sup>22)</sup> A. M. Staub, R. Tinelli, O. Lüderitz u. O. Westphal, Ann. Inst. Pasteur 96, 303 [1959].

<sup>23)</sup> O. Westphal, Naturwissenschaften 46, 50 [1959].

<sup>24)</sup> A. M. Staub, Ann. Inst. Pasteur 98, 814 [1960].

<sup>25)</sup> O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub u. L. Le Minor, Nature [London] '87 [1960], im Druck.

<sup>26)</sup> O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforsch. 7b, 148 [1952].

<sup>27)</sup> O. Westphal, O. Lüderitz, E. Eichenberger u. W. Keiderling, Z. Naturforsch. 7b, 536 [1952].

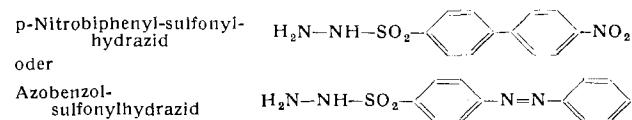
gebunden sind. Die leichte Spaltbarkeit der Glycosidbindung haben 3.6-Didesoxy-hexosen mit den Glycosiden synthetischer 3-Desoxy-hexosen gemein<sup>28)</sup>.

Infolge ihres lipophilen Charakters und der entsprechend großen Wanderungsgeschwindigkeit in Lösungsmitteln wie Pyridin-Butanol-Wasser (4:6:3), Eisessig-Butanol-Wasser (1:4:5) oder Aceton-Wasser (95:5) lassen sich 3.6-Didesoxy-hexosen papierchromatographisch neben Hexosen, Pentosen und 6-Desoxyhexosen (z. B. Rhamnose, Fucose) gut nachweisen und von diesen auch präparativ trennen. Aboquose/Colitose (3-Desoxy-D- und -L-fucose) können auf Grund ihres relativ niedrigen  $R_f$ -Wertes von den übrigen drei Antipoden-Paaren, deren  $R_f$ -Werte nahe beieinander liegen (siehe Tabelle 2), differenziert werden. Didesoxyhexosen ergeben mit Anilin-Phthalsäure hell-gelbbraune Färbungen. Zum Anfärben sind ferner geeignet p-Anisidin-hydrochlorid und besonders das Reagens Vanillin-Perchlorsäure<sup>29)</sup>, das mit einigen Desoxyzuckern differente Färbungen und mit normalen Aldosen keine Färbungen ergibt.

Ähnlich wie 2- und 3-Desoxy-hexosen sind 3.6-Didesoxyhexosen säurelabil und werden durch Erhitzen in stärkeren Mineralsäuren relativ rasch verändert. Deshalb ist es angezeigt, zu ihrer Freisetzung aus Polysacchariden möglichst kurze Hydrolysenzeiten einzuhalten. Erhitzen der bakteriellen (Lipo)-polysaccharide in 1 n Schwefelsäure auf 100 °C setzt vorhandene 3.6-Didesoxy-hexosen bereits nach 3–5 Minuten quantitativ in Freiheit, während die übrigen Zuckerausteine zu diesem Zeitpunkt noch als Oligosaccharide vorliegen. Nach Neutralisation mit Ba(OH)<sub>2</sub> und Einengen wird das Partialhydrolysat an der Cellulose-Säule mit 95-proz. Aceton als Elutionsmittel chromatographiert. Dabei fällt die betreffende 3.6-Didesoxy-hexose als farbloses Öl an. Nach Destillation im Hochvakuum (0,5 mm Hg, 100–110 °C) erhält man die Substanz in reiner Form.

Tyvelose und Ascarylose kristallisieren in farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt 97–99 °C<sup>16)</sup>. Die übrigen 3.6-Didesoxy-hexosen liegen als farblose Öle vor, welche bislang keine Kristallisationstendenz zeigten. Sie sind leicht löslich in Wasser, niederen Alkoholen und Aceton, mäßig löslich in Äther. Aus Hydrolysaten kann man sie prinzipiell aussäubern. — In bakteriellen Lipopolysacchariden liegen die Didesoxy-hexosen im allgemeinen in Quantitäten von ≈ 10–15% vor (siehe z. B.<sup>30)</sup>). In Bakterien sind sie demnach zu ≈ 0,2–0,6% des Trockengewichtes enthalten. Relativ große Kulturansätze waren nötig, um genügend Material für chemische und andere Untersuchungen zu gewinnen.

Die geringe Kristallisationsneigung der 3.6-Didesoxy-hexosen veranlaßte uns, gemeinsam mit H. Feier<sup>6,30)</sup> nach Reagentien zu suchen, welche eine Überführung — auch kleiner Substanzmengen — in kristallisierte Derivate gestatten. Schließlich fanden wir, daß für Desoxy-zucker gewisse Sulfonylhydrazide mit „schweren“ organischen Resten besonders geeignet sind<sup>6</sup>), wie



Das zuletzt genannte Reagens ergibt orange-farbene Sulfonylhydrazone, welche sich auch zur Chromatographie eignen. Wegen des schweren Restes ist die erhaltene Menge an Sulfonylhydrazone relativ groß, so daß im allgemeinen wenige Milligramm Desoxyzucker bereits genügend Material für die Analyse ergeben. Die Schmelzpunkte der Sulfonylhydrazone sind allerdings wenig charakteristisch; sie können in Abhängigkeit vom Umkristallisationsmittel (Methanol oder Acetonitril u. a.) verschieden sein, ohne daß Kristall-Lösungsmittel vorliegt<sup>31)</sup>.

3.6-Didesoxy-hexose-sulfonylhydrazone erwiesen sich als geeignet, die stets gleiche Formel ( $C_6H_{12}O_4$ ) aller bislang aus Bakterien isolierten Didesoxy-zucker mikroanalytisch

<sup>28)</sup> B. Lindberg u. O. Theander, Acta chem. scand. 13, 1226 [1956].  
<sup>29)</sup> A. P. MacLennan, H. M. Randall u. D. W. Smith, Analyt. Chem. 31, 2020 [1959].

<sup>30)</sup> Siehe z. B. J. Fromme, O. Lüderitz, A. Nowotny u. O. Westphal, Pharm. Acta Helv. 33, 391 [1958].

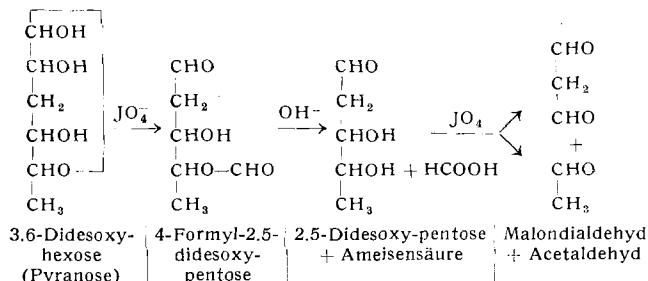
<sup>31)</sup> H. Feier, Dissert., Universität Freiburg/Brsg. 1953/54.

zu bestimmen<sup>5, 7, 8, 10–12)</sup>. — 3.6-Didesoxy-hexosen lassen sich mit Natriumborhydrid glatt zu den entsprechenden 3.6-Didesoxy-hexiten reduzieren<sup>8, 10, 12, 15, 16)</sup>, welche aus wäßrigem Aceton schön kristallisieren und charakteristische Schmelzpunkte sowie relativ hohe spezifische Drehungswerte zeigen (Tabelle 2). Die Hexite sind daher zur chemischen Charakterisierung und Differenzierung der 3.6-Didesoxy-hexosen besonders geeignet.

## Strukturanalyse

Die Aldehyd-Gruppe der 3.6-Didesoxy-hexosen läßt sich quantitativ mit Hypojodit oxydieren und entsprechend nach Willstätter-Schudel titrieren<sup>5)</sup>. Die quantitative Mikro-Acetylierung nach Dewalt und Glenn<sup>32)</sup> ergibt drei OH-Gruppen pro Aldehyd-Gruppe<sup>5)</sup>. Chromsäure-Oxydation nach Kuhn-Roth<sup>33)</sup> liefert ein Äquivalent Essigsäure, was das Vorliegen einer endständigen (C)—CH<sub>3</sub>-Gruppe anzeigen. Die zweite Desoxy-Gruppierung an C-3 der Didesoxyhexosen wurde hauptsächlich mit Hilfe der Perjodatoxydation<sup>9)</sup> ermittelt.

Bei Zimmertemperatur wird nach kurzer Zeit 1 Mol Perjodat verbraucht, nach weiteren 200 Stunden ist ein zweites Mol reduziert. Danach steigt der Perjodatverbrauch langsam weiter an. Gleichzeitig entstehen 0,6 Mol Acetaldehyd und 1 Mol Ameisensäure; Formaldehyd tritt nicht auf (siehe Schema 2).



Schema 2. Perjodat-Abbau von 3.6-Didesoxy-hexosen<sup>9)</sup>

Die Oxydation der Didesoxy-hexosen mit 1 Mol Perjodat in Wasser<sup>8)</sup> (20 °C, 4 Std.) führt zu einem Abbauprodukt, welches isoliert werden kann und das eine Aldehyd-Gruppe neben einer OH-Gruppe aufweist. Das Abbauprodukt enthält 1 Äquivalent Ameisensäure, die jedoch erst nach Alkalibehandlung (oder mit stärkerer Säure) quantitativ freigesetzt wird. Einen wesentlichen Hinweis auf die Konstitution des Spaltproduktes erbrachte dessen positive Farbreaktion nach Webb<sup>34)</sup>, welche für 2-Desoxy-aldosen charakteristisch ist und von Webb und Levy<sup>35)</sup> zur quantitativen Bestimmung von 2-Desoxy-D-ribose bzw. Desoxyribonucleinsäure ausgearbeitet wurde. Das Abbauprodukt konnte so als Formylester einer 2.5-Didesoxy-pentose aufgeklärt werden, welches durch Spaltung der C(1)—C(2)-Bindung in der ursprünglichen 3.6-Didesoxy-hexose entsteht.

Alle 3.6-Didesoxy-hexosen ergeben nach Perjodat-Oxydation eine intensiv positive Webb-Reaktion.

Gorin und Jones<sup>36)</sup> haben den analogen Perjodat-Abbau von synthetischer 3-Desoxy-D-glucose über 4-Formyl-2-desoxy-ribose zu 2-Desoxy-D-ribose in präparativem Maßstab ausgeführt. Wir fanden, daß bei der Oxydation von 3-Desoxy-D-galaktose mit 1 Mol Perjodat der Formylester von 2-Desoxy-D-xylose entsteht, der stark Webb-positiv

<sup>32)</sup> C. W. Dewalt u. R. A. Glenn, Analyt. Chem. 24, 1789 [1952].

<sup>33)</sup> Siehe F. Pregl u. H. Roth: Quant. organ. Mikroanalyse. 5. Aufl., Springer-Verlag, Wien 1947, S. 248.

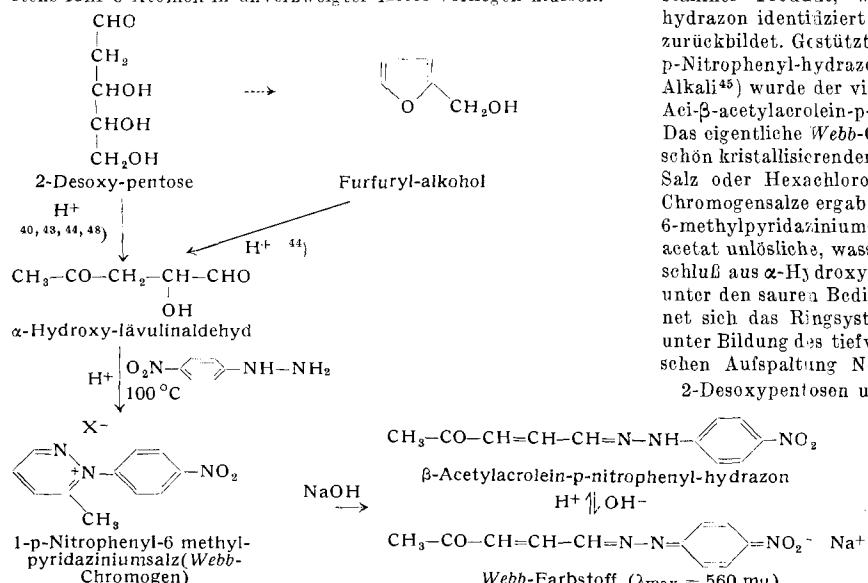
<sup>34)</sup> J. M. Webb u. H. B. Levy in D. Glick: Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publ., Inc., New York 1958, Bd. 6, S. 1.

<sup>35)</sup> J. M. Webb u. H. B. Levy, J. biol. Chemistry 213, 107 [1955].

<sup>36)</sup> P. A. J. Gorin u. I. K. N. Jones, Nature [London] 172, 1051 [1953].

reagiert. Diese Art von partiellm oxydativem Abbau mit anschließendem positivem *Webb*-Test ist ein spezifischer Nachweis für 3-Desoxy-aldohexosen<sup>37)</sup>.

Bei der *Webb*-Reaktion wird der betreffende 2-Desoxy-zucker mit 5-proz. Trichloressigsäure bei Gegenwart von p-Nitrophenylhydrazin erhitzt. Nach Extraktion mit Butylacetat wird die wäßrige Lösung mit Alkali versetzt, worauf sofort eine tiefblaue, an Permanganat erinnernde Färbung eintritt. Mit K. Himmelstach<sup>38)</sup> konnten wir zeigen, daß 2-Desoxy-tetrosen *Webb*-negativ sind und daß für eine positive *Webb*-Reaktion 2-Desoxy-zucker mit wenigstens fünf C-Atomen in unverzweigter Kette vorliegen müssen.



Schema 3. Zum Mechanismus der *Webb*-Reaktion<sup>34, 35)</sup> bei 2-Desoxypentosen<sup>38, 31)</sup>

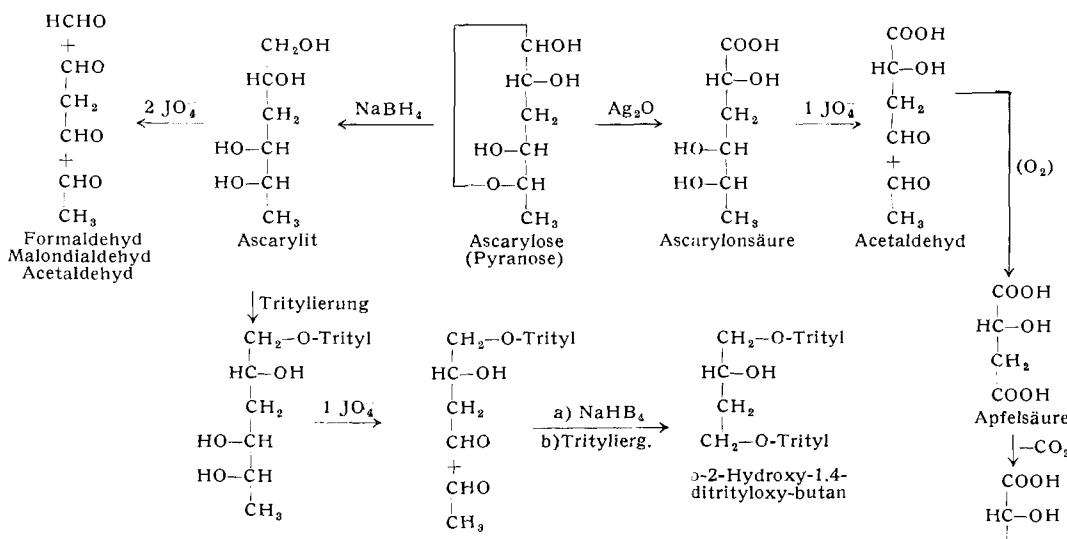
Einblick in den Mechanismus der *Webb*-Reaktion<sup>33)</sup> erbrachte die Übertragung einer Untersuchung von W. G. Overend und M. Stacey<sup>40)</sup> über den Verlauf der Diphenylamin-Reaktion für 2-Desoxypentosen nach Dische<sup>41)</sup>. Es zeigte sich (Schema 3), daß als Zwischenprodukt vor der Chromogenbildung bei beiden Reaktionen  $\alpha$ -Hydroxy-lävulinaldehyd auftritt (bis vor kurzem fälschlich als  $\delta$ -Hydroxy-lävulinaldehyd bezeichnet<sup>42)</sup>; von G. K. Lewis<sup>43)</sup> und L. Birkofe<sup>44)</sup> jedoch richtiggestellt). Bei der *Webb*-

Reaktion erleiden 2-Desoxy-pentosen eine hydrolytische Umwandlung in den genannten Aldehyd. Substanzen, welche unter sauren Bedingungen in  $\alpha$ -Hydroxy-lävulinaldehyd oder sein Wasserabspaltungs-Produkt  $\beta$ -Acetylacrolein ( $\text{CH}_3\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ ) übergehen können, wie Furfurylalkohol u. a. (Schema 3), sind häufig noch stärker *Webb*-positiv als 2-Desoxypentosen.

Sehr wahrscheinlich ist Furfurylalkohol Intermediärprodukt bei der Hydrolyse von 2-Desoxy-pentosen zu  $\alpha$ -Hydroxy-lävulinaldehyd (Schema 3); doch liegt eine sichere Bestätigung noch nicht vor. Aus Furfurylalkohol ließ sich der violette Farbstoff in größerer Menge gewinnen. Durch Ansäuerung entsteht daraus ein gelbes kristallines Produkt, welches als  $\beta$ -Acetylacrolein-p-nitrophenylhydrazone identifiziert wurde, das mit Alkali den *Webb*-Farbstoff zurückbildet. Gestützt auf zahlreiche Analogien im Verhalten von p-Nitrophenylhydrazonen  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigter Aldehyde gegenüber Alkali<sup>45)</sup> wurde der violette *Webb*-Farbstoff als das Alkalisch von  $\text{Ac}-\beta$ -Acetylacrolein-p-nitrophenylhydrazone (Schema 3) erkannt. Das eigentliche *Webb*-Chromogen erhielten wir<sup>39)</sup> in Form stabiler, schön kristallisierender Komplexsalze durch Fällung mit Reinecke-Salz oder Hexachloroplatinsäure. Das eingehende Studium der Chromogensalze ergab, daß es sich dabei um 1-(p-Nitrophenyl)-6-methylpyridazinium-Salze (Schema 3) handelt. Das in Butylacetat unlösliche, wasserlösliche Chromogen entsteht durch Ringschluß aus  $\alpha$ -H<sub>3</sub> hydroxy-lävulinaldehyd und p-Nitrophenylhydrazin unter den sauren Bedingungen der *Webb*-Reaktion. Mit Alkali öffnet sich das Ringsystem des N-phenylierten Pyridaziniumsalzes unter Bildung des tiefvioletten *Webb*-Farbstoffs, ähnlich der Zinke-schen Aufspaltung N-phenylierter Pyridinium-Verbindungen<sup>46)</sup>.

2-Desoxypentosen und 2,5-Didesoxypentosen ergeben das gleiche Chromogen. Die frühere Annahme, daß die positive *Webb*-Reaktion von 2,5-Didesoxypentosen und 2-Methylfuran (Sylvan) über Lävulinaldehyd verlaufe, ist hinfällig. Lävulinaldehyd ist *Webb*-negativ. Die *Webb*-Reaktion von Sylvan untersuchen wir noch weiter<sup>47)</sup>. Das Chromogen von 2-Desoxy-glucose und Digitoxose ist von jenem aus 2-Desoxypentosen dagegen sicher verschieden.

Die Konstitution der Ascarylose wurde von E. Lederer und Mitarbeitern<sup>10)</sup> noch auf folgendem Wege ermittelt (Schema 4): Perjodatoxydation des Ascarylits liefert 1 Mol Formaldehyd und 1 Mol Acetaldehyd. Ascarylonsäure ergibt unter gleichen Bedingungen außer 1 Mol Acetaldehyd ein Gemisch chloroform-extrahierbarer Abbauprodukte,



Schema 4. Perjodat-Abbau von Ascarylit und Ascarylonsäure (nach<sup>10</sup>)).

<sup>37)</sup> I. Fromme, O. Lüderitz, H. Stierlin u. O. Westphal, Biochem. Z. 330, 47 [1958].

<sup>38)</sup> O. Westphal und K. Himmelstach, Angew. Chem. 69, 140 [1957].

<sup>39)</sup> K. Himmelstach, Dissert., Universität Freiburg/Brsig. 1960.

<sup>40)</sup> W. G. Overend u. M. Stacey, Adv. Carbohydr. Chem. 8, 56 [1953].

<sup>41)</sup> Z. Dische, Mikrochemie 8, 4 [1930].

<sup>42)</sup> Siehe R. Pummerer u. Mitarb., Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 999 [1923]; 68, 480 [1935].

<sup>43)</sup> G. K. Lewis, J. chem. Soc. [London] 1957, 531.

<sup>44)</sup> L. Birkofe u. F. Beckmann, Liebigs Ann. Chem. 620, 21 [1959].

unter denen Äpfelsäure und Milchsäure papierchromatographisch identifiziert werden konnten (Schema 4). Schließlich wurde 1-Trityl-ascarylitol (Fp 144–146 °C) mit 1 Mol Perjodat umgesetzt. Das mit Äther extrahierbare amorphe

<sup>45)</sup> Siehe F. Bohlmann, Chem. Ber. 84, 490 [1951]; daselbst Lit.

<sup>46)</sup> Siehe R. C. Elderfield: Heterocyclic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., London-New York 1950, Bd. I, S. 424.

<sup>47)</sup> K. Himmelstach u. O. Westphal, unveröffentl.

<sup>48)</sup> M. Stacey u. Mitarb., Nature [London] 157, 740 [1946]; J. chem. Soc. [London] 1949, 1222; 1950, 1027.

Produkt wurde mit Natriumborhydrid reduziert und die entstandene primäre Alkoholgruppe wiederum trityliert. Diese Verbindung (Fp 178–180 °C;  $[\alpha]_D = -4^\circ$ ) wurde durch Vergleich mit synthetischem L-2-Hydroxy-1,4-ditryloxy-butan als das D-Isomere identifiziert (Schema 4). Damit war die Konstitution der Ascarylose als 3,6-Didesoxyhexose mit C-2 in D-Konfiguration bewiesen<sup>10, 16</sup>.

### Nachweis und quantitative Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von 3,6-Didesoxy-hexosen in Chromatogrammen kann man, wie bei anderen Zuckern, die kombinierte Methode von Baar<sup>49</sup> und Wilson<sup>50</sup> benutzen. Testzucker und Hydrolysat werden in verschiedenen Mengen auf einem Filterbogen chromatographiert (Whatman Nr. 1, Pyridin-Butanol-Wasser 4:6:3), mit Anilinphthalat nach Baar angefärbt, die Flecke anschließend nach Wilson eluiert und colorimetriert (25–150 µg Zucker, Fehler ± 5%).

Unter den Bedingungen der Dische-Reaktion<sup>51</sup>) ergeben 3,6-Didesoxy-hexosen mit Schwefelsäure uncharakteristische braune Zersetzungprodukte, die nicht mit Cystein reagieren. Aus dem gleichen Grunde sind die üblichen Nachweisreaktionen für Zucker, bei denen starke Schwefelsäure benutzt wird (z. B. Molisch- oder Anthron-Reaktion), ungeeignet. Die für 2-Desoxyzucker ausgearbeiteten spezifischen Reaktionen (nach Dische<sup>41</sup>) Keller-Kilian<sup>52</sup>) oder Webb<sup>53</sup>) werden von intakten 3,6-Didesoxy-hexosen nicht gegeben.

Zwei wichtige Bestimmungen von 3,6-Didesoxy-hexosen basieren auf dem Nachweis bestimmter Perjodat-Abbauprodukte (siehe Schema 2): nämlich (a) von 2,5-Didesoxypentosen mit Hilfe der Webb-Reaktion (Schema 3) und (b) von Malondialdehyd mit der Thiobarbitursäure-Reaktion.

Die kombinierte Perjodat-Webb-Reaktion<sup>57</sup>) läßt sich am besten mit den aus Polysaccharid-Hydrolysaten chromatographisch isolierten 3,6-Didesoxy-hexosen durchführen, wobei minimal 10–20 µg Zucker einzusetzen sind. Freie 2-Desoxy-zucker wie andere bekannte Zucker stören den Test nicht, da sie unter den Bedingungen der Oxydation mit

ben<sup>54</sup>), erwies sich die Reaktion auch zur quantitativen Bestimmung von 2-Keto-3-desoxygluconsäure<sup>55</sup>), 2-Keto-3-desoxyheptonsäure<sup>56</sup>) und von Sialinsäuren<sup>57</sup>) als geeignet. Neuerdings hat M. A. Cynkin und G. Ashwell<sup>58</sup>) die Bedingungen angegeben, unter denen 3- bzw. 3,6-Didesoxyhexosen in Mengen von 0,2–6 µg bestimmt werden können. Die Reaktion läßt sich prinzipiell auch auf Papierchromatogrammen ausführen<sup>58, 59</sup>).

Bei der Reaktion zwischen Malondialdehyd (und anderen 1,3-Dioxo-Verbindungen) mit Thiobarbitursäure bildet sich ein roter Farbstoff mit Absorptionsmaximum bei 532 mµ, der nach H. Schmidt<sup>60</sup>) die Konstitution eines Trimethin-Farbstoffes besitzt.

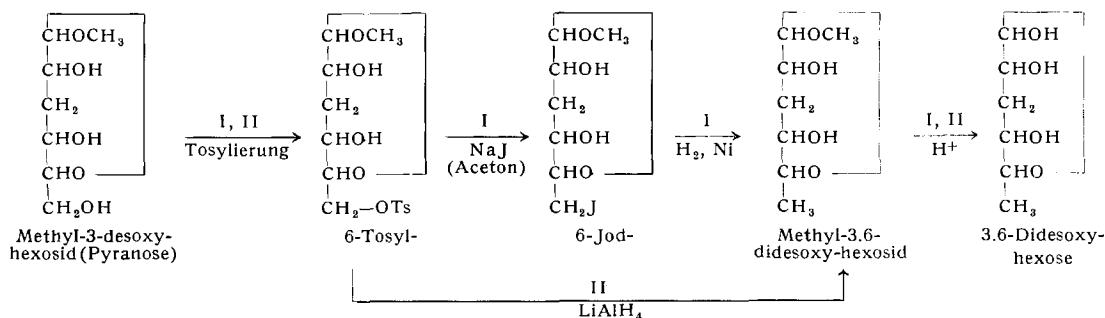
Wichtig ist, daß die Perjodat-Thiobarbitursäure-Reaktion auch zur quantitativen Bestimmung von 3,6-Didesoxyhexosen direkt in bakteriellen (Lipo)-polysacchariden angewandt werden kann<sup>58</sup>).

Beispiel: 100 µg bakterielles Polysaccharid (oder Lipopolysaccharid) werden 25 min in 0,5 ml 0,25 n Schwefelsäure bei 100 °C gehalten (Hydrolyse mit quantitativer Freisetzung der Didesoxyhexose). Dann fügt man 0,5 ml 0,025 m Perjodsäure hinzu und erwärmt 25 min auf 55 °C (maximale Bildung von Malondialdehyd). Nach Zugabe von 1 ml 2-proz. NaAsO<sub>3</sub>-Lösung (zur Reduktion überschüssiger Perjodsäure) läßt man einige Minuten bei Zimmertemperatur stehen, fügt dann 4 ml 3-proz. Barbiturat-Lösung hinzu und hält 12 Minuten auf 100 °C. Der rote Farbstoff wird bei 530 mµ colorimetriert. — Die besten Werte erhält man nach unseren Erfahrungen mit 5–25 µg 3,6-Didesoxy-hexose bzw. der etwa 10-fachen Menge an bakteriellem (Lipo)-polysaccharid.

### Synthesen

Zur Synthese von 3,6-Didesoxy-hexosen (siehe Schema 1) kann man von Hexose-Derivaten ausgehen. Es wurden (a) 3-Desoxy-hexosen oder (b) 6-Desoxy-hexosen als Ausgangsmaterial verwendet, wobei bislang von den vier theoretisch möglichen Antipoden-Paaren drei D- und ein L-Isomeres dargestellt wurden.

Die Überführung der primären Alkohol-Gruppe von 3-Desoxy-hexosen in –CH<sub>3</sub> erfolgt durch Tosylierung in 6-Stellung und direkte Hydrierung, oder auf dem Umweg über



Schema 5. Überführung von 3-Desoxy-hexosen in 3,6-Didesoxyhexosen

überschüssigem Perjodat rasch abgebaut werden, während der aus 3,6-Didesoxy-hexosen primär entstehende Formylester einer 2,5-Didesoxy-pentose (siehe Schema 2) bei neutraler oder schwach saurer Reaktion relativ stabil ist und von Perjodat nicht angegriffen wird. Diese Reaktion ist ein spezifischer Test auf die Desoxygruppierung an C-3 in Aldohexosen und daher auch zur ersten Charakterisierung chromatographisch rasch wandernder Aldosen geeignet.

Wegen ihrer Empfindlichkeit und einfachen Handhabung besitzt die Perjodat-Thiobarbitursäure-Reaktion besonderes Interesse als quantitative Bestimmungsmethode.

Zuerst von L. D. Saslaw und V. S. Waravdecar<sup>53</sup>) zur Bestimmung von 2-Desoxy-ribose angewandt und ausführlich beschrieben.

<sup>49)</sup> S. Baar, Biochem. J. 58, 175 [1954].

<sup>50)</sup> C. M. Wilson, Analyt. Chem. 31, 1199 [1959].

<sup>51)</sup> Z. Dische, L. B. Shettles u. M. Osnas, Arch. Biochem. Biophysics 22, 169 [1949].

<sup>52)</sup> Siehe T. Reichstein, Helv. chim. Acta 31, 888 [1948].

<sup>53)</sup> L. D. Saslaw u. V. S. Waravdecar, Biochim. biophysica Acta 24, 439 [1957].

die 6-Jod-Verbindung, die ihrerseits hydriert wird (Prinzip siehe Schema 5). 6-Desoxy-hexosen werden in solche Epoxide übergeführt, welche bei der Hydrierung eine Desoxy-Gruppe (–CH<sub>2</sub>–) in 3-Stellung ergeben (Beispiel siehe Schema 6). Bei der Schließung und Hydrierung des Epoxid-Ringes sind natürlich die sterischen Verhältnisse zu beachten! Für beide Synthese-Arten (Schema 5 und 6) sind Beispiele bekannt. Die synthetischen Produkte wurden mit den natürlichen 3,6-Didesoxyhexosen verglichen (siehe Tabelle 2).

<sup>54)</sup> V. S. Waravdecar u. L. D. Saslaw, J. biol. Chemistry 234, 1945 [1959].

<sup>55)</sup> G. Ashwell, A. J. Wahba u. J. Hickman, Biochim. biophysica Acta 30, 186 [1958].

<sup>56)</sup> A. Weissbach u. J. Hurwitz, J. biol. Chemistry 234, 705 [1959].

<sup>57)</sup> L. Warren, J. biol. Chemistry 234, 1971 [1959].

<sup>58)</sup> M. A. Cynkin u. G. Ashwell, Nature [London] 186, 155 [1960].

<sup>59)</sup> L. Warren, Nature [London] 186, 237 [1960].

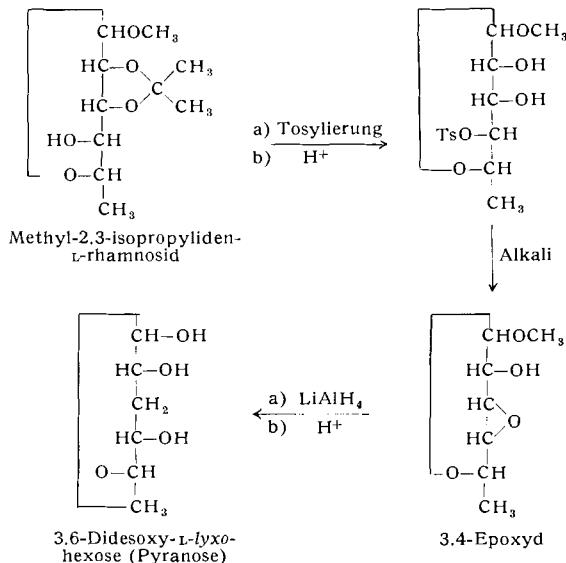
<sup>60)</sup> H. Schmidt, Naturwissenschaften 46, 379 [1959]; siehe auch K. Täufel u. R. Zimmermann, ebenda 47, 133 [1960].

3,6-Didesoxy-*D*-xylo-hexose = Abequose<sup>14)</sup>. — Methyl-3-desoxy-*D*-galaktosid<sup>61)</sup> wurde tosyliert. Das 6-Mono-tosylat (70 % des öligen Reaktionsproduktes) wurde ohne weitere Reinigung mit Natrium-jodid in Aceton bei 105 °C in die 6-Jodoverbindung übergeführt. Hydrierung mit Rancy-Nickel in Methanol-Kalialage und anschließende Hydrolyse des Glycosids führte zur 3,6-Didesoxy-*D*-xylo-hexose (Schema 5), die sich nach chromatographischer Reinigung an der Cellulose-Säule als identisch mit Abequose erwies<sup>8,14)</sup>. Damit war auch die sterische Konfiguration der Colitose, des optischen Antipoden von Abequose, als 3,6-Didesoxy-L-xylo-hexose bewiesen<sup>8,12)</sup>.

3,6-Didesoxy-*D*-arabinohexose = Tyvelose<sup>16)</sup>. — Methyl-3-desoxy-*D*-mannosid<sup>62)</sup> wurde tosyliert und die gereinigte 6-Tosyl-Verbindung direkt mit LiAlH<sub>4</sub> hydriert. Die Hydrolyse des Glycosids ergab 3,6-Didesoxy-*D*-arabinohexose (Schema 5), die mit Tyvelose identisch ist. Ascarlose, der optische Antipode von Tyvelose ist somit 3,6-Didesoxy-L-arabinohexose<sup>8,16)</sup>.

3,6-Didesoxy-*D*-ribohexose = Paratose<sup>15,16)</sup>. — Diese wurde analog der Tyvelose aus 3-Desoxy-*D*-glucose<sup>63)</sup> synthetisiert (Schema 5) und erwies sich als mit Paratose identisch.

3,6-Didesoxy-L-lyxo-hexose<sup>16,64)</sup>. — L-Rhamnose wurde in Methyl-2,3-isopropyliden-L-rhamnosid überführt und dieses in 4-Stellung tosyliert (Schema 6). Nach Abspaltung des Isopropyliden-Restes wurde mit Natriumhydroxyd in das 3,4-Epoxyd verwandelt, dessen Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> zu Methyl-3,6-didesoxy-L-lyxo-hexosid führte. Die freie 3,6-Didesoxy-hexose erhält man durch kurze saure Hydrolyse. Die Konstitution als 3-Desoxy-zucker wurde durch Perjodat-Abbau und Webb-Test gesichert<sup>16)</sup>. Das gleiche Produkt erhielten G. Charalambous und E. Percival<sup>64)</sup> durch Hydrierung von 2-Anhydro-6-desoxymethyl-L-talosid, welches aus L-Fucose zugänglich ist. Die beiden 3,6-Didesoxy-*D*- und -L-lyxo-hexosen sind bislang in der Natur nicht aufgefunden worden.



Schema 6. Synthese von 3,6-Didesoxy-L-lyxo-hexose (nach<sup>16,64)</sup>)

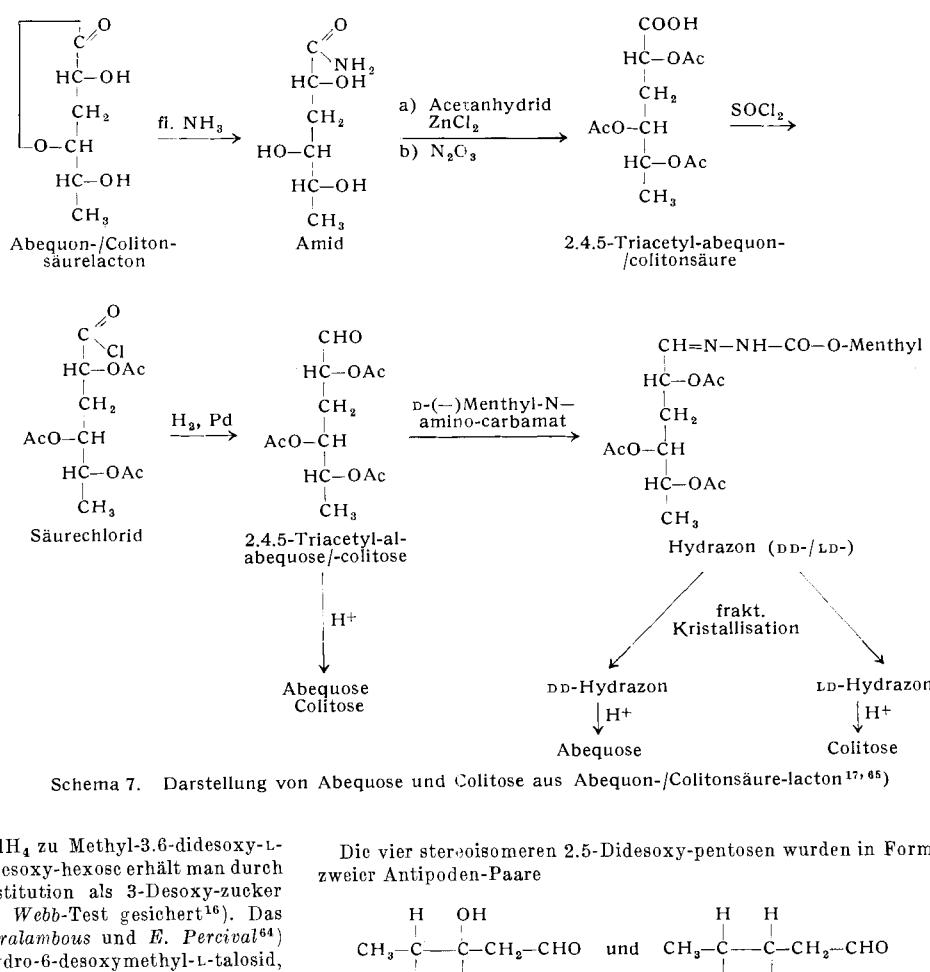
<sup>61)</sup> F. Weygand u. H. Wolz, Chem. Ber. 85, 259 [1952].

<sup>62)</sup> G. N. Richards, J. chem. Soc. [London] 1954, 4511.

<sup>63)</sup> D. A. Prins, Helv. chim. Acta 29, 1 [1946].

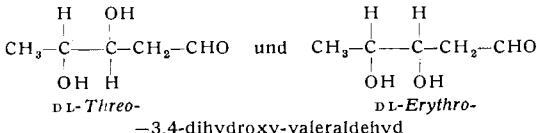
<sup>64)</sup> G. Charalambous u. E. Percival, J. chem. Soc. [London] 1954, 2443.

Eine andere von E. Rüde und O. Westphal<sup>17,65)</sup> ausgearbeitete Synthese geht von 2,5-Didesoxy-pentosen aus, welche durch Cyanhydrinsynthese zu 3,6-Didesoxy-hexosen aufgebaut werden können.



Schema 7. Darstellung von Abequose und Colitose aus Abequon-/Colitonsäure-lacton<sup>17,65)</sup>

Die vier stereoisomeren 2,5-Didesoxy-pentosen wurden in Form zweier Antipoden-Paare



aus dem großtechnisch zugänglichen Methoxypentenin<sup>66)</sup>  $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{CH}(\text{OCH}_3)$  ähnlich der von F. Weygand und H. Leube<sup>67)</sup> beschriebenen Synthese von 2-Desoxy-DL-ribose und -xylose erhalten. 2,5-Didesoxy-DL-threo-pentose wurde dann durch Cyanhydrinreaktion in die Nitrile der 3,6-Didesoxy-DL-lyzo- und DL-lyxo-hexensäuren übergeführt. Hydrierung nach R. Kuhn und Mitarb.<sup>68)</sup> mit Palladium in saurer Lösung ergab ein Gemisch von 3,6-Didesoxy-DL-lyzo- und -DL-lyxo-hexose, welche sich chromatographisch gut in die DL-lyzo- und DL-lyxo-Paare trennen ließen (DL-lyxo = Abequose/Colitose; siehe Schema 1).

Eine Antipoden-Trennung racemischer Abequose/Colitose wurde bislang nicht versucht. Man kann jedoch<sup>65)</sup> das oben beschriebene Nitril-Gemisch (DL-lyxo- und DL-lyxo-) zu den Säuren verseifen, die Lacton mit Phenylhydrazin in die Phenylhydrazide verwandeln und die DL-lyxo- und DL-lyxo-Racemate von einander durch Kristallisation trennen. Von den mit Kupfersulfat regenerierten Säuren wurde das 3,6-Didesoxy-DL-lyxo-hexonsäurelacton (Abequonsäure/Colitonsäurelacton) auf dem in Schema 7 angegebenen Weg in 3,6-Didesoxy-2,4,5-tri-O-acetyl-DL-lyxo-al-hexose verwandelt. Umsetzung mit D-(--)-Menthyl-N-aminocarbamat ergab ein kristallisiertes Hydrazongemisch, dessen fraktionierte Umkristallisation aus Chloroform/Petroläther eine Trennung in das (schwererlösliche) Abequose- und das (leichter lösliche) Colitose-Derivat erlaubte. — Hydrolyse mit 1,5 n Schwefelsäure führt dann zu den freien 3,6-Didesoxy-hexosen.

<sup>65)</sup> E. Rüde, Dissert. Universität Freiburg/Brsig. 1960.

<sup>66)</sup> Methoxy-butinen,  $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{CH}(\text{OCH}_3)$ , (Chemische Werke Hüls) wird mit Dimethylsulfat/Natriumamid in Methoxypentenin übergeführt; siehe Th. Herbertz, Chem. Ber. 85, 475 [1952].

<sup>67)</sup> F. Weygand u. H. Leube, Chem. Ber. 89, 1914 [1956].

<sup>68)</sup> R. Kuhn u. Mitarb., Liebigs Ann. Chem. 600, 115 [1956]; 612, 55 [1958]; Chem. Ber. 91, 1989 [1958].

Ausgehend von 2,5-Didesoxy-DL-*erythro*-pentose sollten so auch die 3,6-Didesoxy-hexosen mit *arabino*- (Tyvelose, Ascarylose) und *ribo*-Konfiguration (Paratose) prinzipiell (totalsynthetisch) zugänglich sein.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, kann man die acht theoretisch möglichen 3,6-Didesoxy-hexosen durch folgende Werte eindeutig identifizieren:  $R_{\text{Rh}}$ -Wert und spezifische Drehung der Aldose sowie Schmelzpunkt und Drehung der Hexite. Auch IR-Spektren können herangezogen werden<sup>16)</sup>.

	3,6-Didesoxy-hexose			3,6-Didesoxy-hexit		
	$R_{\text{Rh}}^*$	Fp [°C]	$[\alpha]_D$	$R_{\text{Rh}}^*$	Fp [°C]	$[\alpha]_D$
3,6-Didesoxy-D-xylo-hexose (synth.)	1,16	Öl	— 3,2°		92–93	+51°
Abequose (= D-xylo-) ...	1,16	Öl	— 3,6°		93–94	+54°
Colitose (= L-xylo) .....	1,16	Öl	+ 4,0°		92–94	-51°
3,6-Didesoxy-D-ribo-hexose (synth.)	1,27	Öl	+10°	1,14	66–68	-17°
Paratose (= D-ribo-) ....	1,27	Öl	+ 8°	1,14	66–68	-17°
3,6-Didesoxy-D-arabinohexose (synth.)	1,29	96–98	+24°	1,07	113–115	-35°
Tyvelose (= D-arabinoh.)	1,29	96–98	+25°	1,07	112	-40°
Ascarylose (= L-arabinoh.)	1,29	97–99	-25°	1,07	114–115	+35°
3,6-Didesoxy-L-lyxohexose (synth.)	1,29	Öl	-20°	1,12	77	-10°

\* ) Wanderungsgeschwindigkeit bezogen auf Rhamnose = 1 in Pyridin-Butanol-Wasser (4:6:3).

Tabelle 2. Einige physikalische Daten natürlicher und synthetischer 3,6-Didesoxy-hexosen

Wegen ihres chromatographisch gleichen Verhaltens wurde Colitose früher für Abequose gehalten<sup>1)</sup>; Paratose hielt man wegen ihres fast gleichen  $R_f$ -Wertes für Tyvelose<sup>11)</sup>.

### Immunchemie

3,6-Didesoxy-hexosen sind Bausteine bakterieller Polysaccharide und diese sind Komponenten des Endotoxin-Komplexes, welcher jeweils in der Zellwand der Bakterien lokalisiert ist und wesentlich an deren Aufbau teilnimmt<sup>18, 19)</sup>. Endotoxine werden nur von gram-negativen Bakterien gebildet, z. B. von allen Species in der großen Gruppe der Enterobacteriaceen. Beim Infekt werden diese hochmolekularen Stoffe frei und verursachen typische toxische Manifestationen (endotoxische Wirkungen<sup>2, 69–71)</sup>). Die Endotoxin-Komplexe bestehen im wesentlichen aus einer Polysaccharid-Komponente, einem Lipoid (Lipoid A) und einem Protein<sup>1, 2)</sup>. Injiziert man hitzegetötete Bakterien oder ihre isolierten Endotoxin-Komplexe, so beobachtet man beim höheren Tier und Menschen neben den akut endotoxischen Wirkungen die Bildung spezifischer Antikörper. Diese sind nur gegen das verwendete Bakterium und immunologisch verwandte (kreuzreagierende) Keime gerichtet. Schon frühzeitig erkannte man, daß diese Antikörper durch das somatische Antigen — das sog. O-Antigen — der Bakterien gebildet werden, und daß die Spezifität der O-Antigene eng mit der Polysaccharid-Komponente des Endotoxin-Komplexes verbunden ist<sup>1, 2, 72, 73)</sup>.

Zahlreiche Verfahren sind ausgearbeitet worden, um die O-Antigene der gram-negativen Bakterien zu isolieren und rein darzustellen<sup>1, 2)</sup>. Es zeigte sich, daß praktisch alle biologischen Wirkungen des Endotoxin-Komplexes durch die proteinfreien Lipopolysaccharide der Bakterien gegeben werden<sup>1, 2)</sup>. Diese in Wasser kolloidal löslichen Substanzen können auch direkt aus den Bakterien isoliert werden, z. B. mit Hilfe des Phenol/Was-

ser-Verfahrens<sup>20)</sup>. Beim Menschen genügt die intravenöse Injektion von 0,1 µg (total) eines Lipopolysaccharids, z. B. aus *Coli*-oder *Typhus*-Bakterien, um eine kurzdauernde Fieberreaktion, Veränderungen des weißen Blutbildes (besonders Leukozytose), Aktivierungen hormонаler und enzymatischer Systeme usw.<sup>2, 69, 70, 71, 74, 75)</sup> hervorzurufen, die man insgesamt als Ausdruck gesteigerter Abwehrbereitschaft ansehen kann<sup>2)</sup>. Eine Erhöhung der Injektionsdosis beim Menschen um das 10-fache, z. B. auf 1 µg total, verursacht bereits einen fulminanten Fieberstoß auf über 40 °C, massive Leukopenie, gefolgt von Leukozytose, und andere Systemreaktionen<sup>2, 75)</sup>. — Bei Pferden und Kaninchen liegt die pyrogene Schwelldosis in der gleichen Größenordnung von 0,0005 bis 0,005 µg/kg (intravenös). — Bei den bakteriellen Endotoxinen handelt es sich demnach um antigene Stoffe von hoher biologischer Wirksamkeit<sup>1, 2)</sup>.

Akut endotoxische Aktivität — wie Fieber usw. — und antigenen Spezifität beruhen auf verschiedenen strukturellen Details (wie auf dem physikalischen Status)<sup>2, 75)</sup> der Endotoxine. In den Endotoxin-Komplexen kann man Wirkungsgruppen unterscheiden: für die unspezifischen, akut endotoxischen Wirkungen erwiesen sich Strukturen der Lipoid-Komponente als wesentlich<sup>76)</sup>; für die antigenen Spezifität sind determinante Gruppen (Definition siehe<sup>23)</sup>) in der Polysaccharid-Komponente verantwortlich.

Die Vielfalt von Zuckern, welche als Bausteine der O-Antigene von gram-negativen Bakterien synthetisiert werden, ist überraschend groß<sup>2, 78)</sup>. Dies zeigt zusammenfassend Tabelle 3.

Bis zu sieben der in Tabelle 3 genannten Zucker können am Aufbau einzelner O-antigerer (Lipo)-Polysaccharide beteiligt sein<sup>20)</sup>.

Hexosamine ...	Galaktosamin	Pentosen .....	Xylose
	Glucosamin	6-Desoxy-hexosen ...	Fucose
	Fucosamin		Rhamnose
Heptosen <sup>13)</sup> .....		3,6-Didesoxy-hexose	Abequose
Hexosen .....	Galaktose		Colitose
	Glucose		Tyvelose
	Mannose		Ascarylose
			Paratose

Tabelle 3. Zucker, welche am Aufbau spezifischer Polysaccharide (O-Antigene) gram-negativer Bakterien beteiligt sein können<sup>2)</sup>

Zwei Befunde gaben uns frühzeitig einen Hinweis, daß unter diesen vielen Zuckerbausteinen die 3,6-Didesoxyhexosen möglicherweise immunologisch eine besondere Rolle spielen könnten<sup>2)</sup>:

1. Die Didesoxy-hexosen sind terminal in den stark verzweigt gebauten Polysacchariden gebunden. Aus immunchemischen Untersuchungen von E. A. Kabat und anderen (siehe z. B. 23, 78, 79)) ist bekannt, daß terminale Bausteine in Antigenmolekülen durch ihre besondere sterische Situation immunologisch bevorzugt als determinante Endgruppen fungieren können und den größten Affinitätsbeitrag der gesamten determinanten Gruppe bei der Reaktion mit dem spezifischen Antikörper leisten.

2. Beim Übergang der pathogenen Glattform (OS-Form) in die Rauhform (oR) von stark verminderter Pathogenität (siehe z. B. 80)) verschwindet die Fähigkeit zur Bildung

<sup>74)</sup> E. Eichenberger, M. Schmidhauser-Kopp, H. Hurni, M. Fricsay u. O. Westphal, Schweiz. Med. Wschr. 85, 1190, 1213 [1955].

<sup>75)</sup> O. Westphal: Pyrogens. Trans. 2nd Macy Conf. on Polysaccharides in Biology (Princeton 1956), Macy Foundation New York 1958, S. 115.

<sup>76)</sup> O. Westphal, A. Nowotny, O. Lüderitz, H. Hurni, E. Eichenberger u. G. Schönholzer, Pharm. Acta Helv. 33, 401 [1958].

<sup>77)</sup> D. A. L. Davies, Adv. Carbohydr. Chem., im Druck.

<sup>78)</sup> E. A. Kabat, J. cell. comp. Physiol. 60, Suppl. 1, 79 [1957]; Rev. Hematol. 12, 606 [1957].

<sup>79)</sup> F. Karush, J. Amer. chem. Soc. 78, 5519 [1957]; 79, 3380 [1957]; The Specificity of Antibodies. Trans. N.Y. Acad. Sci. Ser. II, 20, 581 [1958].

<sup>80)</sup> E. Kröger, Erg. Hyg. Bakt. Immunitätsf. exp. Therap. 29, 475 [1955].

Bakterienspecies	Form	Zucker (in chromatographischer Reihenfolge)								
		Glucosamin	Heptose(n)	Galaktose	Glucose	Mannose	Rhamnose	Abequose	Fucose	Tyvelose
<i>S. enteritidis</i> ....	O/Glatt o/rauh	+	+	+	+	+	+			+
<i>S. paratyphi B</i> ..	O/Glatt o/rauh	+	+	+	+	+	+	+		
<i>S. typhi murium</i>	O/Glatt o/rauh	+	+	+	+	+	+	+		
<i>S. bareilly</i> .....	O/Glatt o/rauh	+	+	+	+	+				

Tabelle 4. Vergleich der Zuckerbausteine aus den Lipopolysacchariden genetisch zusammengehöriger O/Glatt- und o/Rauh-Formen einiger *Salmonella*-Bakterien<sup>81, 82)</sup>

des O-Antigens. Mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens<sup>26)</sup> findet man in den Rauhformen zwar endotoxische Lipopolysaccharide von gleicher Wirksamkeit wie in Glattformen<sup>2, 75)</sup>, das Rauh-Polysaccharid unterscheidet sich aber von jenem der zugehörigen Glattform durch das Fehlen der O-Spezifität und chromatographisch rascher wandernder Zuckerbausteine<sup>2, 75, 81, 82)</sup>, wofür Tabelle 4 einige Beispiele bringt. Die Analyse einer größeren Zahl von Glatt/Rauh-Paaren aus der *Salmonella*-Gruppe hat prinzipiell zu den gleichen Ergebnissen geführt<sup>83).</sup>

Gemeinsam mit A. M. Staub und R. Tinelli<sup>21, 22)</sup> und in enger Zusammenarbeit mit F. Kauffmann haben wir seit einigen Jahren Zucker-Analysen vieler bakterieller Lipopolysaccharide (O-Antigene) durchgeführt, insbesondere von *Salmonella*<sup>20, 30, 82)</sup> und *Coli*-Bakterien<sup>84)</sup> sowie von einigen kreuzreagierenden Stämmen anderer Gruppen<sup>85).</sup> Die Analyse der O-Antigene von 93 *Salmonella*-Species und deren Einteilung nach Chemytypen wurde mit deren serologischer Klassifizierung als Serotypen nach dem Kauffmann-White-Schema in Beziehung gesetzt (siehe Tabelle 5).

Im Kauffmann-White-Schema<sup>86)</sup> sind alle *Salmonella*-Species auf Grund ihres serologischen Verhaltens gegenüber spezifischen Kaninchen-Antiseren eingeteilt (Serotypen). Es hat sich ergeben, daß das O-Antigen vieler Species oftmals mehr als eine Spezifität aufweist, so daß bei Immunisierungen entsprechend mehrere (trennbare) Antikörperfraktionen im Antiserum auftreten. Diese Spezifitäten (oder Antigen-Faktoren<sup>20)</sup>) sind im Kauffmann-White-Schema mit arabischen Ziffern — 1, 2, 3, 4, 5 usw. — bezeichnet; bei einzelnen Serotypen kommen sie häufig in verschiedenen Kombinationen vor und entsprechen chemisch verschiedenen determinanten Gruppen in ein- und demselben Polysaccharid-Molekül<sup>87)</sup> (siehe Tabelle 5), ähnlich den Spezifitäten A und B in der menschlichen Blutgruppensubstanz AB<sup>88).</sup>

<sup>81)</sup> O. Westphal u. O. Lüderitz: Proceedings of the VI. International Congress of Microbiology (Rom 1953). 1955, Bd. 2, S. 22.

<sup>82)</sup> O. Lüderitz, F. Kauffmann, H. Stierlin u. O. Westphal, Zbl. Bakt. I. Orig. 179, 180 [1960]; dasselbst weitere Lit.

<sup>83)</sup> F. Kauffmann, L. Krüger, O. Lüderitz u. O. Westphal, Zbl. Bakt. I. Orig., im Druck.

<sup>84)</sup> F. Kauffmann, O. H. Braun, O. Lüderitz, H. Stierlin u. O. Westphal, Zbl. Bakt. I. Orig., im Druck.

<sup>85)</sup> O. Westphal, F. Kauffmann, O. Lüderitz u. H. Stierlin, Zbl. Bakt. I. Orig. 179, 336 [1960].

<sup>86)</sup> F. Kauffmann, Ergeb. Hyg. Bakt. Immunitätsf. exp. Therap. 30, 160 [1957]; F. Kauffmann u. P. R. Edwards, Acta path. microbiol. scand. 41, 242 [1957].

<sup>87)</sup> O. Lüderitz, G. O'Neill u. O. Westphal, Biochem. Z. 333, 136 [1960]; dasselbst weitere Lit.

<sup>88)</sup> W. T. J. Morgan, Naturwissenschaften 46, 181 [1959].

Die Serotypen des Kauffmann-White-Schemas sind in Gruppen — *Salmonella*-Gruppe A, B, C, D usw. — eingeordnet, wobei im Prinzip die Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe (Serogruppe) sich nach dem Vorliegen einer gemeinsamen und für die Gruppe typischen Spezifität richtet. So ist beispielsweise für die *Salmonella*-Gruppe A der Antigenfaktor 2, für die Gruppe B der Faktor 4, für D der Faktor 9 typisch (siehe Tabelle 5). Andere Spezifitäten finden sich in mehreren Gruppen und verursachen so partielle serologische Kreuzreaktionen; z. B. der Antigenfaktor 12 in den Gruppen A, B und D (Tabelle 5).

In Tabelle 5 sind alle von uns bislang analysierten *Salmonella*-O-Antigene, welche 3,6-Didesoxy-hexosen enthalten, auf Grund ihrer Klassifizierung im Kauffmann-White-Schema angeordnet.

Wie Tabelle 5 zeigt, besteht tatsächlich eine Korrelation zwischen Serotypen und Chemytypen<sup>20).</sup> Die Angehörigen einer Serogruppe sind stets vom gleichen Chemytyp. Aller-

Species	Gruppe	O-Antigen	Zucker*) (in chromatographischer Reihenfolge)								
			Galaktosamin	Glucosamin	Heptose(n)	Galaktose	Glucose	Mannose	Fucose	Rhamnose	Abequose
<i>S. paratyphi A</i> ..	A	1, 2, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paratyphi A</i> var. <i>durazzo</i>		2, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. kiel</i> .....		1, 2, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. abortus equi</i> ..	B	4, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paratyphi B</i> ..		4, 5, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. java</i> .....		4, 5, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. schleissheim</i> ..		4, 12, 27	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi murium</i>		4, 5, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. muenchen</i> ....	C <sub>2</sub>	6, 8	+	+	+	+	±	+	+	+	+
<i>S. newport</i> .....		6, 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. virginia</i> .....	C <sub>3</sub>	(8)	+	+	+	+	±	+	+	+	+
<i>S. kentucky</i> .....		(8), 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. sendai</i> .....	D <sub>1</sub>	1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. miami</i> .....		1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. onarimon</i> .....		1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i> .....		9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i> (Vi) .....		9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. ndolo</i> .....		9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. enteritidis</i> .....		1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. dublin</i> .....		1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. gallinarum</i> .....		1, 9, 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. strasbourg</i> .....	D <sub>2</sub>	(9), 46	+	+	+	+	±	+	+	+	+
<i>S. haarlem</i> .....		(9), 46	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. fresno</i> .....		(9), 46	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. adelaide</i> .....	O	35	+	+	+	+	+	+			+
<i>S. monschau</i> ...		35	+	+	+	+	+	+			+
<i>S. greenside</i> .....	Z	50	+	+	+	+	+	+			+

\*) ± bedeutet definitiv, jedoch in relativ geringer Menge vorhanden.

Tabelle 5. Zuckerbausteine von O-Antigenen der *Salmonella*-Gruppen A, B, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, O und Z (Auszug aus Tabelle 1 in<sup>20</sup>)

dings zeigt das Beispiel der Serogruppen B und C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>, daß die qualitative Zuckerbaustein-Analyse — wie zu erwarten — weniger differenziert ist als die serologische Analyse. Verschiedene Serotypen gehören oftmals dem gleichen Chemytyp an (z. B. <sup>20, 84)</sup>), weil die gleichen Zuckerbausteine zu verschiedenen determinanten Strukturen kombiniert sein können. Ähnlich liegen die Verhältnisse z. B. bei den Blutgruppensubstanzen A, B, AB und H, deren qualitative Bausteinanalyse gleich ist<sup>88).</sup> Die Stellung von 3,6-Didesoxyhexosen wird aus Tabelle 5 deutlich. So bildet jede der hier aufgeführten Species immer nur eine Didesoxy-hexose, die sie in ihr Zellwand-Polysaccharid einbaut. Für einige Gruppen des Kauffmann-White-Schemas ist jeweils eine 3,6-Didesoxy-hexose charakteristisch: z. B. Paratose in der

Gruppe A, Tyvelose in der Gruppe D. Abequose und Colitose sind in zwei Gruppen (B und C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub> sowie O und Z) vertreten.

Mit Hilfe der quantitativen Präcipitations-Technik konnte demonstriert werden, daß 3.6-Didesoxy-hexosen in einigen Antigenfaktoren des *Kauffmann-White-Schemas* als determinante Endgruppen fungieren<sup>21, 22)</sup>.

Die von *A. M. Staub* und *R. Tinelli*<sup>21)</sup> angewendete Technik beruht auf folgendem Prinzip: Eine gewogene Menge von bakteriellem Polysaccharid wird mit steigenden Mengen spezifischem Antiserum präcipitiert und vom Präcipitat eine Mikro-N-Bestimmung nach *Kjeldahl* ausgeführt. Im System mit maximaler Präcipitation (Äquivalenzzone (siehe<sup>23, 8c)</sup>) wird nun der Einfluß steigender Mengen von Zuckerbausteinen des betreffenden Polysaccharids (oder von Oligosacchariden aus Partialhydrolysaten) auf die Menge an Präcipitat — gemessen als präcipitierter *Kjeldahl-N* — quantitativ bestimmt. Diese Technik hat sich auch zur immunchemischen Analyse anderer Polysaccharid-Antigene bewährt (siehe z. B. <sup>7b</sup>).

Folgende spezifische Hemmungswirkungen wurden gefunden: Die Präcipitation von *Salmonella* B-Polysacchariden mit Anti-B-Seren (z. B. Anti-4,12) wird durch Abequose spezifisch gehemmt; eine vergleichbare Hemmung verursacht Tyvelose im System *Salmonella* D-Polysaccharid/Anti-D-Serum sowie Colitose im System *Salmonella* O-Polysaccharid/Anti-O-Serum (vgl. dazu Tabelle 5). Die betreffende 3.6-Didesoxy-hexose läßt sich dabei weder durch stereoisomere noch durch andere Zucker ersetzen; die Reaktion ist hochspezifisch. Verwendet man zur Präcipitation nicht das genuine, sondern perjodat-oxydiertes Bakterien-Polysaccharid<sup>21, 22)</sup>, so kann man die relative Hemmung durch die betreffende 3.6-Didesoxyhexose noch verstärken. Perjodat greift glykosidisch gebundene 3.6-Didesoxy-hexosen nicht an, weil keine 1,2-glykolischen Hydroxylgruppen vorhanden sind; sie treten erst nach Hydrolyse beim freien Zucker an C-1 und C-2 auf (vgl. Schema 2). Auf diese Weise bleibt die determinante Struktur, an welcher eine terminale 3.6-Didesoxy-hexose beteiligt ist, erhalten, während andere Spezifitäten bei der Oxydation zerstört werden. Als Ergebnis dieser Versuche konnte folgendes festgestellt werden<sup>8, 12, 21, 22, 24, 90)</sup>:

3.6-Didesoxy-hexose	Determinante Endgruppe im Antigenfaktor der <i>Salmonella</i> -Gruppe	
Abequose .....	4	B
Tyvelose .....	9	D
Colitose .....	35	O

Mit der gleichen Hemmungstechnik konnten weitere Endgruppen in Antigenfaktoren des *Kauffmann-White-Schemas* aufgeklärt werden, so z. B. terminale L-Rhamnose im Faktor 12 (der allerdings uneinheitlich ist und aus drei Teilstoffen — 1<sub>2</sub>, 1<sub>2</sub>, und 1<sub>2</sub> — besteht)<sup>21, 22)</sup> und D-Glucose als Endgruppe des Faktors 1<sup>91)</sup>.

Damit sind einige bakterielle Antiseren sehr empfindliche Reagenzien auf individuelle 3.6-Didesoxy-hexosen, z. B. *Salmonella*-Faktor-4-Antiseren für Abequose, Faktor-9-Antiseren für Tyvelose oder Faktor-35-Antiseren für Colitose. Man kann so wenige Milligramm individueller 3.6-Didesoxyhexosen eindeutig identifizieren. In Zusammenarbeit mit *A. M. Staub* und *E. Lederer* und ihren Mitarbeitern haben wir von dieser Möglichkeit wiederholt Gebrauch gemacht<sup>8, 12, 22)</sup>, z. B. zur Differenzierung optischer Anti-

<sup>20)</sup> *O. Westphal*: Immunchemie, in *B. Flaschenträger* u. *E. Lehnartz*: Physiologische Chemie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957, Bd. II/2b, S. 894.

<sup>21)</sup> *A. M. Staub* u. *R. Tinelli*, Etudes immunochimique des facteurs O présents sur les polyosides spécifiques de quelques *Salmonella*. Coll. internat. sur la Biochimie des Glycides, Paris (18.-21. 7. 1960), Bull. Soc. chim. France, im Druck.

<sup>22)</sup> *B. A. D. Stocker*, *A. M. Staub*, *R. Tinelli* u. *B. Kopacka*, Ann. Inst. Pasteur 98, 505 [1960].

poden — wie Tyvelose/Ascaryllose oder Abequose/Colitose — zu Zeiten, als wir nur über geringe Mengen der einzelnen Zucker verfügten.

### Vorkommen in Bakterien-Polysacchariden

Das Vorkommen von 3.6-Didesoxy-hexosen ist nicht auf *Salmonella*-Arten<sup>20)</sup> beschränkt. Sie wurden auch bei anderen gram-negativen Bakterien gefunden<sup>77, 81, 85</sup>), insbesondere bei *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Arizona* und *P. pseudotuberculosis*<sup>13)</sup>. Vielfach sind die determinanten Gruppen mit 3.6-Didesoxy-hexosen in diesen Polysacchariden Ursache immunologischer Verwandtschaft, welche sich in serologischen Kreuzreaktionen ausdrückt<sup>85</sup>). Beispielsweise ist das O-Antigen von *Salmonella* O 35 serologisch identisch mit dem O-Antigen von *E. coli* O 111; beide Polysaccharide sind vom gleichen Chemotyp mit Glucosamin, Heptose, Galaktose, Glucose und Colitose. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über bislang bekannte Vorkommen von 3.6-Didesoxyhexosen, wobei kreuzreagierende Polysaccharide verschiedener Bakterienspecies in die gleiche Rubrik eingeordnet sind.

3.6-Didesoxy-hexose	Bakterien	Serogruppe bzw. Serotyp	
Abequose .....	<i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> <i>P. pseudotuberculosis</i>	B 4,5 II	C <sub>2</sub> /3
Colitose .....	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Arizona</i>	0 O 111 20	Z O 55 9
Paratose .....	<i>Salmonella</i> <i>P. pseudotuberculosis</i>	A	I und III
Tyvelose .....	<i>Salmonella</i> <i>P. pseudotuberculosis</i>	D IV	
Ascaryllose ....	<i>P. pseudotuberculosis</i> (Ascarideneier)	V	

Tabelle 6. Vorkommen natürlicher 3.6-Didesoxyhexosen (Serologisch kreuzreagierende Bakterien bzw. deren O-Antigene sind in der gleichen Rubrik aufgeführt<sup>17a</sup>))

Wie aus den Tabelle 5 und 6 hervorgeht, kommen Abequose und Colitose jeweils in zwei Gruppen immunologisch nicht verwandter Bakterien vor. In allen untersuchten Polysacchariden dieser Bakterien befindet sich die 3.6-Didesoxy-hexose endständig. Doch ist in beiden Gruppen die Bindung der 3.6-Didesoxy-hexose offensichtlich verschieden. Die Verhältnisse sind vielleicht jenen bei Pneumococcus-Polysacchariden vergleichbar, wo bei den Typen II und III D-Glucuronsäure jeweils als determinante Endgruppe fungiert. Beide Typen zeigen jedoch keine Kreuzreaktion<sup>92)</sup>. Es ist wahrscheinlich, daß zur vollen Spezifität das zweite und dritte Glied der Oligosaccharid-Kette noch beiträgt<sup>22)</sup>; insbesondere bei allen Polysacchariden deren Präcipitation mit Antiserum durch die freie 3.6-Didesoxy-hexose allein nicht gehemmt wird. Dies gilt z. B. für das System *Salmonella*-Polysaccharid C<sub>2</sub> oder C<sub>3</sub>/Antiserum in Bezug auf Abequose, oder für das System *Salmonella* Z-Polysaccharid/Antiserum wie auch in gleicher Weise für *E. coli* O 55 Polysaccharid/Antiserum in Bezug auf Colitose (siehe Tabellen 5, 6). — Bislang ist auch noch kein System eines paratose-haltigen Polysaccharids/Antiserum bekannt, dessen Präcipitation durch freie Paratose allein gehemmt wird. Bei Polysacchariden, deren spezifische Präcipitation durch die betreffende freie 3.6-Didesoxy-hexose gehemmt wird, ist die sterische Situation derart, daß die terminale Didesoxyhexose maximale Affinität zum Antikörper entfaltet und als freier Zucker daher in relativ geringer Konzentration allein schon das Gleichgewicht der Reaktion von Polysaccharid mit Antikörper zugunsten der Bildung löslicher Komplexe von Antikörper mit 3.6-Didesoxyhexose verschieben kann.

Wegen der großen Säurelabilität der glykosidischen Bindung von 3.6-Didesoxy-hexosen ist es bislang nicht möglich gewesen, Oligosaccharide mit den Didesoxyzuckern aus

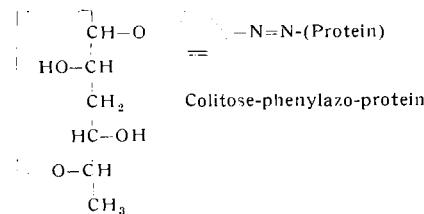
<sup>23)</sup> Siehe z. B. *W. F. Goebel*, Nature [London] 143, 77 [1939].

Partialhydrolysaten zu erhalten. Durch kurzdauernde, milde Säure-Hydrolyse kann man degradierte Polysaccharide darstellen, die vollständig frei von 3,6-Didesoxy-hexose sind<sup>90, 93</sup>). Solche degradierten Polysaccharide sind in manchen Fällen geeignet, jenen Zuckerbaustein zu ermitteln, welcher nach Abspaltung der 3,6-Didesoxy-hexose endständig geworden ist bzw. ein weiteres freies Hydroxyl aufweist. Beispielsweise wird nach Abspaltung von Tyvelose in *Salmonella* D-Polysacchariden (*S. typhi*) die gebundene Mannose perjodat-oxydabel, die im intakten Polysaccharid unangegriffen bleibt. Daraus haben A. M. Staub und Mitarbeiter<sup>90</sup>) geschlossen, daß Tyvelose im *S. typhi*-Polysaccharid an Mannose gebunden ist. Im gleichen Sinne kann man eine Präcipitationshemmung des Systems *S. typhi*-Polysaccharid/Antiserum durch Mannan interpretieren<sup>22</sup>). Ähnliche Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß in *Salmonella* B-Polysacchariden Abequose wie folgt gebunden ist: Abequose-Galaktose-Mannose<sup>-22</sup>). Durch serologische Hemmungsexperimente konnte ferner festgestellt werden<sup>25</sup>), daß Colitose in den Polysacchariden von *E. coli* O 111 und *Salmonella* O 35 (*S. adelaide*, *S. monschaui*) als  $\alpha$ -Colitopyranosid vorliegt, weil von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aminophenyl-colitopyranosid das  $\alpha$ -Colitosid die Präcipitation des bakteriellen Polysaccharids mit homologem Antiserum stärker als freie Colitose und ebenfalls stärker als das  $\beta$ -Colitosid hemmt.

### Künstliches Colitose-Antigen

Einen direkten Nachweis der immunspezifischen Funktion von Colitose in den Polysacchariden (O-Antigenen) von *E. coli* O 111 und kreuzreagierenden *Salmonella*- und *Arizona*-Polysacchariden (siehe Tabelle 5, 6) konnten O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub und L. Le Minor<sup>25</sup>) kürzlich durch die Darstellung künstlicher Antigene mit Colitose als determinante Gruppe erbringen.

Tri-O-acetyl-colitose wurde mit p-Nitrophenol bei Gegenwart von Quecksilber(II)-chlorid in ein Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nitrophenyl-colito-pyranosid verwandelt. Nach O-Entacetylierung und Reduktion der Nitrogruppe wurden die getrennten  $\beta$ -Aminophenyl- $\alpha$ - und  $\beta$ -colitoside diazotiert und nach der klassischen Azomethode von K. Landsteiner (siehe<sup>23, 89</sup>) an Proteine gekuppelt.



Kaninchen und Ziegen wurden mit den künstlichen Antigenen immunisiert. Kaninchen bildeten sehr spezifische Colitose-Antikörper; die Antiseren von Ziegen reagierten nicht nur mit den Colitose-Antigenen, sondern zeigten auch starke Kreuzreaktion mit *E. coli* O 111-, *Salmonella* O 35- und *Arizona* 20-Polysacchariden und -Bakterien. Sie zeigten, wie zu erwarten, geringere Kreuzreaktion mit der anderen Gruppe colitose-haltiger Polysaccharide von *E. coli* O 55, *Salmonella* O 50 und *Arizona* 9 (vgl. Tabelle 6). Ziegensera gegen das künstliche Colitose-Antigen verhalten sich ähnlich wie Seren, welche man nach Immunisierung mit *E. coli* O 111-Bakterien erhält.

Es ist bekannt, daß Kaninchen sehr spezifische und wenig übergreifende Antikörper bilden; deingegenüber findet man in Pferde- oder Ziegen-Antiseren vielfach übergreifende Spezifitäten, so daß Kreuzreaktionen häufiger beobachtet werden. Diese Speciesunterschiede zeigen sich auch bei der Immunisierung mit Colitose-

Antigenen. — Es ist jedoch bemerkenswert, daß ein einziges Monosaccharid — Colitose — als determinante Gruppe bereits genügt, um die Bildung von Antikörpern auszulösen, welche gegen Bakterien wirksam sind, die in ihrem Oberflächen-Antigen jenen Zucker in gleicher Bindung enthalten.

Damit ist erstmals ein künstliches Antigen gegen pathogene gram-negative Bakterien dargestellt worden<sup>25</sup>). Weitere künstliche Antigene mit anderen Didesoxy-hexosen werden z. Zt. hergestellt. Derartige Antigene sind untoxisch, da ihnen die toxicitäts-bestimmenden Wirkgruppen der Bakterien-Endotoxine fehlen. — Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung der Wirkgruppen-Analyse, besonders mit immunochemischen Methoden, an hochmolekularen, biologisch aktiven Naturstoffen.

### Biochemische und genetische Aspekte

Verschiedene Arbeitskreise haben die Biosynthese von Colitose (3-Desoxy-L-fucose) bei *E. coli* O 111 näher untersucht. Züchtet man diesen Keim auf  $^{14}\text{C}$ -markierter D-Glucose, so zeigt die aus den Bakterien isolierte Colitose die gleiche Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität entlang der C-Kette wie die angebotene D-Glucose<sup>94, 95, 96</sup>). Verwendet wurden  $1\text{-}^{14}\text{C}$ ,  $2\text{-}^{14}\text{C}$ - und  $6\text{-}^{14}\text{C}$ -D-Glucose. Die biochemische Umwandlung von D-Glucose in Colitose verläuft demnach ohne Spaltung von C-C-Bindungen, wie dies ebenfalls schon für die Biosynthese von L-Fucose<sup>97-100</sup>) gefunden wurde. Nach Segal und Topper<sup>98</sup>) verläuft die Biosynthese von L-Fucose über D-Glucose  $\rightarrow$  Guanosindiphosphat-Mannose  $\rightarrow$  GDP-L-Fucose  $\rightarrow$  L-Fucose.

Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäts-Verteilung in Colitose wurde bestimmt (a) durch Perjodat-Abbau gereinigter Colitose, wobei C-1 als Ameisensäure, C-2 bis C-4 als Malondialdehyd und C-5 und C-6 als Acetaldehyd (vgl. Schema 2) isoliert wurden<sup>14</sup>) oder (b) durch Perjodat-Abbau von Colitit (3-Desoxy-L-fucit), dessen C-1 als Formaldehyd bestimmt wurde, während die übrigen Abbauprodukte die gleichen wie beim ersten Verfahren sind<sup>15</sup>).

E. C. Heath<sup>100, 101</sup>) gelang es, aus 1 kg (Feuchtgewicht) *E. coli* O 111-Bakterien 2,5  $\mu\text{Mol}$  ( $\approx 1,5 \text{ mg}$ ) Guanosindiphosphat-Colitose zu isolieren.

Thymidindiphosphat-Mannose und L-Rhamnose wurden aus *E. coli* B und *Streptomyces griseus* isoliert<sup>102, 103</sup>).

Für Untersuchungen über den Stoffwechsel und die Biosynthese von 3,6-Didesoxy-hexosen in Bakterien sowie den Einbau dieser Zucker in ihre spezifischen Zellwand-Polysaccharide<sup>104</sup>) erscheinen vergleichend-biochemische Analysen an nahestehenden Bakterienarten sehr geeignet, deren Polysaccharide sich chemotypisch in bestimmter Weise unterscheiden. Beispielsweise sind genetisch zusammengehörige Paare von Glatt- und Rauhstämmen in dieser Hinsicht von großem Interesse (vgl. Tabelle 4). Die Mutation von *Salmonella* OS-Formen, welche 3,6-Didesoxy-hexosen bilden, in die entsprechenden *Salmonella*-oR-Formen, ist — wie schon ausgeführt — mit dem Verlust des Synthesevermö-

<sup>94)</sup> M. A. Cynkin u. G. Ashwell, Bact. Proc. 1960, 161 (P 45).

<sup>95)</sup> H. Hollidorf, W. Bernhardt u. H. Gruncke, Biochemie-Kongreß Zürich, 10.-12. Okt. 1960.

<sup>96)</sup> E. C. Heath, Feder. Proc. 19, 85 [1960].

<sup>97)</sup> E. C. Heath u. S. Roseman, J. biol. Chemistry 230, 511 [1958].

<sup>98)</sup> S. Segal u. Y. J. Topper, Biochim. biophysica Acta 42, 147 [1960].

<sup>99)</sup> R. Denanne, G. Fauconneau u. G. Gunz, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 246, 2820 [1958].

<sup>100)</sup> Siehe auch V. Ginsburg u. H. N. Kirkman, J. Amer. chem. Soc. 80, 3481, 4426 [1958]; C. P. Hunag u. O. N. Miller, J. biol. Chemistry 231, 201 [1958].

<sup>101)</sup> E. C. Heath, Biochim. biophysica Acta 39, 377 [1960].

<sup>102)</sup> R. Okazaki, T. Okazaki u. Y. Kuriki, Biochim. biophysica Acta 38, 384 [1960].

<sup>103)</sup> J. Baddiley u. N. L. Blumson, Biochim. biophysica Acta 39, 376 [1960].

<sup>104)</sup> Siehe auch J. Strominger, Physiol. Rev. 40, 55 [1960].

<sup>93)</sup> H. Mayer, O. Lüderitz u. O. Westphal, unveröffentl.

gens für Desoxy-hexosen verbunden und läßt sich experimentell leicht mit einer nahezu beliebigen Zahl von Bakterien-Species (siehe z. B.<sup>20</sup>) durchführen<sup>83</sup>.

Zum Studium biochemischer Zusammenhänge bei der Synthese von Desoxy- und anderen Zuckern und deren Einbau in spezifische Bakterien-Polysaccharide mögen noch folgende (herausgegriffene) Hinweise von Interesse sein:

Die Polysaccharide in den *Salmonella*-Gruppen A, B, C<sub>2/3</sub> und D<sub>1/2</sub> unterscheiden sich chemotypisch jeweils nur durch die individuelle 3,6-Didesoxy-hexose (Tabelle 5). Bislang wurden Paratose, Abequose und Tyvelose bei Salmonellen immer nur zugleich mit Rhamnose gefunden. Demgegenüber wurde Colitose bislang bei Salmonellen, *Coli*- und *Arizona*-Stämmen niemals gleichzeitig mit Rhamnose gefunden<sup>20, 85</sup>. In Polysacchariden von Colibakterien fanden wir alternativ immer nur eine Desoxyhexose – nämlich Rhamnose, Fucose oder Colitose<sup>84</sup>.

Eine Übersicht über alle bisher durchgeföhrten Analysen von Bakterien-polysacchariden, an deren Aufbau 3,6-Didesoxy-hexosen beteiligt sind, bringt Tabelle 7 (siehe dazu Tabellen 5 und 6).

Da die 3-Desoxy-Derivate von L- und D-Rhamnose sowie L- und D-Fucose von Bakterien gebildet werden können, entsteht die Frage, ob nicht auch die bislang in der Natur unbekannte

gene: eine ebenfalls große Zahl ist auch bei *Escherichia coli* und anderen Enterobacteriaceen bekannt. Diese außerordentlich vielen Serotypen (Species) besitzen als differenzierendes Merkmal jeweils das species-spezifische Polysaccharid, dessen Synthese, ebenso wie die Synthese der einzelnen Zuckerbausteine, genetisch kontrolliert ist. Das vergleichende biochemische Studium dieser Variationen ist somit auch ein geeignetes Objekt genetischer Forschung. Neuerdings kann man bekanntlich verschiedene Bakterien-Species, z. B. aus der Klasse der Enterobacteriaceen, kreuzen. Es wird von großem Interesse sein, zu untersuchen, wie sich bei dem gekreuzten Organismus Strukturmerkmale des Zellwand-Polysaccharids in Bezug auf beide Ausgangsspecies verhalten. Ebenso bedeutsam in diesem Zusammenhang sind die lysogenen Abwandlungen bei Bakterien<sup>91, 106</sup>.

Die spezifischen Polysaccharide gram-negativer Bakterien sind als Bestandteile ihrer Zellwand von großer Bedeutung für den Mikroorganismus. Sie bilden Teile seiner Begrenzung gegen das umgebende Medium. Mit der Fähigkeit zur Biosynthese von 3,6-Didesoxy-hexosen und zu deren Einbau in die Zellwand nimmt der lipophile Charakter der Zelloberfläche (relativ) zu. Es ist bemerkenswert, daß bei Glattformen von *Salmonella* und *Escherichia* eine gewisse Parallelität zwischen lipophiles Oberflächen-Charakter und der klinischen Bedeutung der Keime zu bestehen scheint<sup>20</sup>). Es erscheint möglich, daß die Wirkung von Antikörpern, welche mit terminalen 3,6-Didesoxyhexosen reagieren, in vivo u. a. in einer Herabsetzung lipphiler Oberflächen-Eigenschaften bei den betreffenden Bakterien besteht.

Bei der Biosynthese von Polysacchariden und Polysaccharid-Komplexen zum Aufbau von Zellmaterial scheinen Bakterien zwei Prinzipien zur Erzielung relativ lipphiler Strukturen anwenden zu können, die man kurz als das Desoxy-Prinzip und das O-Methyl-Prinzip bezeichnen könnte. Außer 3,6-Didesoxyhexosen bei gram-negativen Bakterien wurden neuerdings verschiedene O-Methyläther von 6-Desoxy-hexosen in Glycolipoiden einiger Mycobakterien aufgefunden<sup>107, 108</sup>). Die weitere Untersuchung von Oberflächen-Strukturen und ihrer Bedeutung bei der Auseinandersetzung des Bakteriums mit seiner Umgebung, u. a. bei der Infektion von Makroorganismen oder andererseits beim Angriff von Phagen, Antikörpern, Antibiotika u. a., leitet über zu einer verfeinerten Biochemie von Zellgrenzflächen.

Eingegangen am 12. September 1960 [A 88]

<sup>106</sup>) Siehe z. B. L. Barksdale, *Bact. Rev.* 23, 202 [1959]; daselbst weitere Lit.

<sup>107</sup>) A. P. Mac Lennan, D. W. Smith u. H. M. Randall, *Biochem. J.* 74, 3 p [1960].

<sup>108</sup>) D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. Mac Lennan u. E. Lederer, *Nature [London]* 186, 887 [1960].

Bakterien (Serogruppen oder Serotyp)	Zuckerbausteine									
	Galaktosamin	Glucosamin	Hexitose(n)	Galaktose	Glucose	Mannose	Fucose	Rhamnose	Abequose	Colitose
									Paratose	Tyvelose
<i>Salmonella</i> -Gruppe B u. C <sub>2/3</sub>	+	+	+	+	+			+	+	
<i>Pseudotuberculosis</i> II .....	+	+	+	+	±				+	
<i>Citrobacter</i> 4, 5 .....	+	+	+	+	+				+	
<i>Salmonella</i> -Gruppe O (035)	+	+	+	+	+					+
<i>E. coli</i> O 111 .....	+	+	+	+	+				+	
<i>Arizona</i> 20 .....	+	+	+	+	+				+	
<i>Salmonella</i> -Gruppe Z (050)	+	+	+	+	+				+	
<i>E. coli</i> 055 .....	+	+	+	+	+				+	
<i>Arizona</i> 9 .....	+	+	+	+	+	(+)?			+	
<i>Salmonella</i> -Gruppe A .....	+	+	+	+	+					+
<i>Pseudotuberculosis</i> I .....	+	+	+	+	+				+	
<i>Pseudotuberculosis</i> III .....	+	+	+	+	+	+			+	
<i>Salmonella</i> -Gruppe D .....	+	+	+	+	+		+			+
<i>Pseudotuberculosis</i> IV .....	+	+	+	+	±	+			+	
<i>Pseudotuberculosis</i> V .....	+	+	+	+	+	+				+

Tabelle 7. Zuckerbausteine, welche zusammen mit 3,6-Didesoxy-hexosen am Aufbau bakterieller Polysaccharide beteiligt sind<sup>20, 77, 85, 105</sup>)

D-Rhamnose und die in gram-negativen Bakterien bisher nicht aufgefunden D-Fucose in den Polysacchariden angetroffen werden – was wir z. Zt. prüfen.

Das Studium von Bakterienarten mit partiell kreuzreagierenden O-Antigenen (siehe z. B.<sup>85</sup>) dürfte ebenfalls erhebliches Interesse besitzen.

Man kennt bis heute bei Salmonellen weit über hundert verschiedene serologisch klassifizierte Polysaccharid-Anti-

<sup>105</sup>) Siehe auch D. A. L. Davies, *J. gen. Microbiol.* 18, 118 [1958].