

Biogenese, Struktur und biologische Wirkungen der Lipide des Tuberkelbazillus [*]

VON PROF. DR. E. LEDERER

INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES, GIF-SUR-YVETTE, UND
LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, FACULTÉ DES SCIENCES, PARIS (FRANKREICH)

Die umfangreichen Untersuchungen von Anderson (1926–1946) sowie die darauffolgenden Arbeiten von Stenhagen, Polgar, Cason und im Laboratorium des Autors haben die erstaunlichen Fähigkeiten des Tuberkelbazillus zur Synthese von Lipoiden bewiesen. Zahlreiche verzweigte Fettsäuren, Glykolipide, Peptidolipide und Peptidoglykolipide sind isoliert und strukturell mehr oder weniger aufgeklärt worden. Diese Arbeiten haben nicht nur Interesse für den Naturstoffchemiker und den Biochemiker, sondern vor allem auch für den Biologen und Pathologen, der sich mit der Genese der Schädigungen, die vom Tuberkelbazillus hervorgerufen werden, beschäftigt. Der vorliegende Beitrag behandelt vor allem drei Fragen: 1. Biogenese der verzweigten Fettsäuren – 2. Struktur einiger Glyko-, Peptido- und Peptidoglykolipide – 3. Adjuvanswirkung und Immunisierung durch Lipide der Tuberkelbazillen.

I. Biogenese verzweigter Fettsäuren

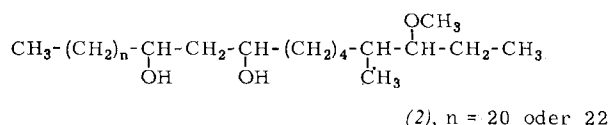
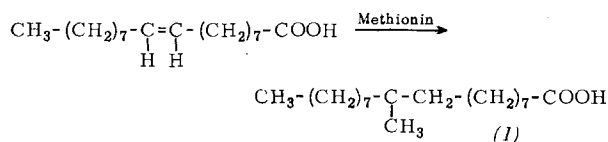
a) Substanzen mit Methyl-Seitenketten

Die wichtigsten Verbindungen mit einer Methyl-Verzweigung, die vom Tuberkelbazillus produziert werden, sind Tuberculostearinsäure (1) und Phthiocerol (2).

Von K. Bloch und Mitarbeitern [2] ist gezeigt worden, daß Tuberculostearinsäure (1) aus Ölsäure durch C-Methylierung in Gegenwart von Methionin entsteht.

Diese an *Mycobacterium phlei* durchgeführten Versuche konnten in Gif von *M. Gastambide-Odier* auch am

menschlichen Stamm H₃₇R_a bestätigt werden [3]. Andererseits haben Tanaka und Umezawa [4] die Biosynthese einer methylverzweigten Säure des Antibiotikums Variotin untersucht und ebenfalls die C-Methylierung einer ungesättigten Vorstufe festgestellt. Der Mechanismus dieser C-Methylierungen in Gegenwart von Methionin bleibt noch aufzuklären.



[*] Nach einem Plenarvortrag auf der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker am 10. September 1963 in Heidelberg. Bisherige Übersichten zum Thema siehe [1].

[1a] R. J. Anderson, Fortschr. Chem. org. Naturst. 3, 145 (1939); Harvey Lectures 35, 271 (1939); Chem. Reviews 29, 225 (1941); Yale J. Biol. Med. 15, 311 (1943).

[1b] J. Asselineau u. E. Lederer, Fortschr. Chem. org. Naturst. 10, 170–270 (1953).

[1c] J. Asselineau: Les Lipides Bactériens. Hermann, Paris 1962.

[1d] E. Lederer, Angew. Chem. 72, 372 (1960).

[1e] J. Asselineau u. E. Lederer in K. Bloch: Lipide Metabolism. Wiley, London 1960, S. 336–406.

[1f] E. Lederer, Pure and appl. Chem. 2, 587 (1961).

[2] J. W. Lennarz, G. Scheuerbrandt u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 237, 664 (1962).

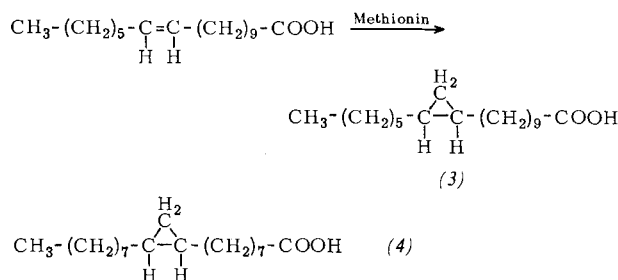
Es war schon durch Arbeiten von K. Hofmann bekannt, daß in Lactobazillen die Lactobacillinsäure (3) aus Vaccensäure in Gegenwart von Methionin entsteht [5]. Dies legte die Mög-

[3] M. Gastambide-Odier u. E. Lederer, unveröffentlichte Versuche.

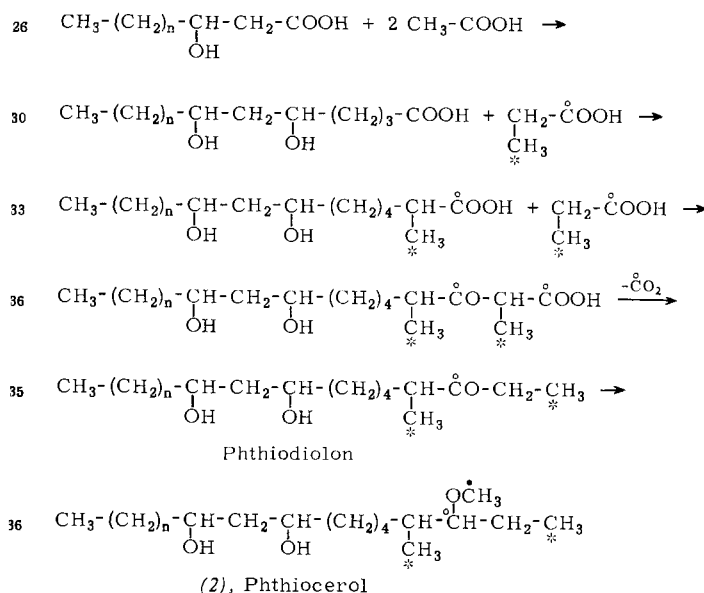
[4] N. Tanaka u. H. Umezawa, J. Antibiotics, Ser. A, 15, 189 (1962).

[5] K. Hofmann u. T. Y. Liu, Biochim. biophysica Acta 37, 364 (1960).

lichkeit nahe, daß eine isomere Cyclopropan-carbonsäure (4) Vorstufe in der Biogenese der Tuberculo-stearinsäure sein könnte. Diese Säure (4) wurde in Gift von *Noble* und *Sarda* aus Ölsäure und $^{14}\text{CH}_2\text{I}_2$ synthetisiert. Nach Inkubation der markierten Cyclopropan-carbonsäure mit *M. phlei* konnte aber keine Umwandlung in Tuberculo-stearinsäure festgestellt werden [6].



Die Biosynthese des Phthiocerols (2) ist vor kurzem in Gift von *M. Gastambide-Odier* geklärt worden [7]; es erwies sich, daß die Methylgruppe des Methionins nur in die Methoxylgruppe des Phthiocerols eingebaut wird. Der verzweigte Teil der Kohlenstoffkette stammt aus Propionsäure. Das schon früher [1f] vorgeschlagene Schema 1 ist damit wahrscheinlich gemacht worden. Das gleichfalls im Schema enthaltene Phthiodiolon ist ein häufiger Begleiter des Phthiocerols.



Schema 1. Biosynthese des Phthiocerols ($n = 20$ oder 22).

*C = C-Atom aus $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Natriumpropionat

°C = C-Atom aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Natriumpropionat

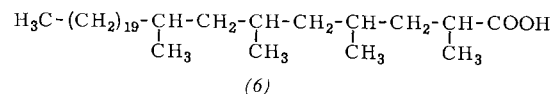
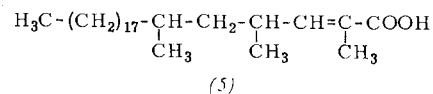
•C = C-Atom aus Methyl- ^{14}C -Methionin

Diese Befunde zeigen erneut, wie gefährlich es ist, auf Grund struktureller Analogien Rückschlüsse auf biogenetische Vorgänge zu ziehen. Die Natur ist eben viel einfallsreicher und vielfältiger als der „Papierchemiker“.

Propionsäure wird vom Tuberkelbazillus verwendet, um Verbindungen mit mehreren Methyl-Verzweigungen aufzubauen. Es gibt in dieser Kategorie zwei Reihen von

[6] *R. Noble, P. Sarda u. E. Lederer*, unveröffentlichte Versuche.

[7] *M. Gastambide-Odier, J. M. Delaunéy u. E. Lederer*, *Chem. and Ind.* 1963, 1285.



Säuren: die α,β -ungesättigten rechtsdrehenden Phthien-säuren (5) und die gesättigten, linksdrehenden Myco-cerosinsäuren (6). Die ersteren kommen nur in viru-lenten Stämmen vor, weshalb ihre Biogenese noch nicht näher studiert wurde. Mycocerosinsäuren sind leichter zugänglich.

Vorversuche mit *H. Grisebach* unter Verwendung von doppelt markierter Propionsäure (^3H in der Methylgruppe, ^{14}C in der Carboxylgruppe) hatten schon vor einigen Jahren den Einbau von Propionsäure nahege-legt [8a]. In neueren Versuchen wurde vor allem auf größte Reinheit der C_{32} -Mycocerosinsäure Wert gelegt; durch wiederholte Gaschromatographie des Methyl-esters konnte diese Substanz in einheitlicher Form ge-wonnen werden, was durch Massenspektrometrie kon-trolliert wurde. Die nach Inkubation von H_3^3R_a -Bazillen mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Propionsäure erhaltene radioaktive C_{32} -Myco-cerosinsäure wurde dann decarboxyliert, wobei 22 % der Radioaktivität als CO_2 auftraten. Ein Einbau von 4 Mo-lekülen Propionsäure hätte 25 % ergeben müssen [8b].

Bei der Inkubation wurde auch eine radioaktive C_{26} -Mycocerosinsäure erhalten.

Es ist wohl überflüssig daran zu erinnern, daß die Verwendung von Propionsäure zum Aufbau verzweigter Verbindungen auf dem Gebiet der von Streptomyceten produzierten Makro-lide schon von *Grisebach* und *Achenbach* [9], von *Kaneda* et al. [10] für Erythromycin, von *Birch* et al. [11] für Methy-mycin, von *Ollis* et al. [12] für ϵ -Pyrromycinon und von *Grisebach* und *Achenbach* [13] sowie von *Gilner* und *Srini-vasan* [14] für Magnamycin bewiesen worden ist.

b) Substanzen mit langen Seitenketten

Hierher gehören vor allem die Mycolsäuren, d. h. „Säu-ren, die in α -Stellung eine lange aliphatische Kette und in β -Stellung eine Hydroxylgruppe besitzen“ [15].

Aus säurefesten Bakterien sind bisher drei Arten von Mycolsäuren isoliert worden:

[8a] *M. Gastambide-Odier, H. Grisebach u. E. Lederer*, unver-öffentlichte Versuche.

[8b] *M. Gastambide-Odier, J. M. Delaunéy u. E. Lederer*, *Bio-chim. biophysica Acta* 70, 670 (1963).

[9] *H. Grisebach u. H. Achenbach*, *Z. Naturforsch.* 17b, 634 (1962).

[10] *T. Kaneda, C. Butte, S. B. Taubman u. J. W. Corcoran*, *J. biol. Chemistry* 237, 322 (1962).

[11] *A. J. Birch, E. Pride, R. W. Rickards u. P. J. Thomson*, *Chem. and Ind.* 1960, 1245.

[12] *W. D. Ollis, I. O. Sutherland, R. C. Codner, J. J. Gordon u. G. A. Miller*, *Proc. chem. Soc. (London)* 1960, 347.

[13] *H. Grisebach u. H. Achenbach*, *Z. Naturforsch.* 17b, 6 (1962).

[14] *D. Gilner u. P. R. Srinivasan*, *Biochem. biophys. Res. Com-mun.* 8, 299 (1962).

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

aktive Präparate isoliert worden sind, die zweibasige Mycolsäuren der ungefähren Formel $C_{84}H_{164}O_6$ enthalten [22].

Japanische Autoren [23] haben kürzlich aus den „fest gebundenen“ Lipoiden von Tuberkelbazillen ein Diarabinose-mycolat und ein 5-O-Mycolat der D-Arabinose isoliert.

Mycoside A und B

Die Mycoside sind „typenspezifische Glykolipide aus Mycobakterien“ [24]. Man kennt gegenwärtig die drei folgenden Typen [25, 26]:

Mycosid A: charakteristisch für die sogenannten atypischen, photochromogenen Stämme (*M. kansasii*),

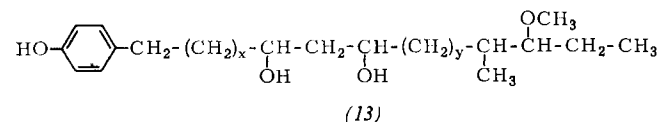
Mycosid B: charakteristisch für bovine Stämme,

Mycosid C: charakteristisch für aviäre und verwandte Stämme.

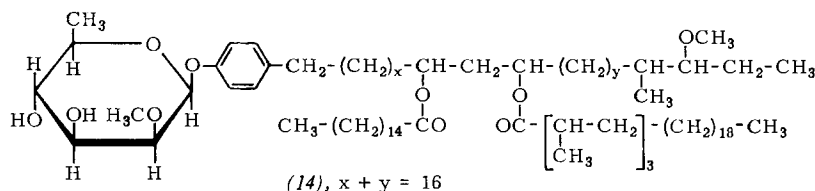
Die ersten zwei sind Glykolipide, die Mycoside C sind Peptidoglykolipide und werden weiter unten behandelt.

Die Gegenwart eines Methoxyl-Restes sowie einer wahrscheinlich sekundären β -Glykol-Gruppierung wies tatsächlich auf eine Ähnlichkeit mit Phthiocerol (2) hin, die im Massenspektrum bewiesen werden konnte. Banden bei den Massen 73 und 101 sprechen in Analogie mit dem Massenspektrum des Phthiocerols für die Gruppen $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ($M/e = 73$) und $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ($M/e = 101$).

Die beiden Enden der aliphatischen Kette des „Phenolglykol B“ sind also festgelegt; man kann ihm die Formel (13) zuschreiben.



Im Mycosid B ist der Zucker β -glykosidisch an das phenolische Hydroxyl des „Phenolglykol B“ gebunden. Die zwei Fettsäuren verestern die aliphatischen Hydroxyle. Mycosid B hat demnach Formel (14) [27].



Mycosid A: die genaue Struktur dieser Verbindung ist noch nicht bekannt; sie ist sicher sehr nahe verwandt mit der des Mycosid B, dessen Struktur vor kurzem H. Demartean-Ginsburg [27] bestimmt hat.

Mycosid B: nach Smith et al. [26] ist diese Substanz ($F_p = 25^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = -22^\circ$) ein Glykolipoid, das ein Molekül 2-O-Methylrhamnose und zwei Moleküle Mycocerosinsäure in Verbindung mit einem „aromatischen Analoges des Phthiocerols“ enthält.

Das von uns analysierte Mycosid B enthält ein Molekül normaler Fettsäuren (vor allem Palmitinsäure) sowie ein Molekül Mycocerosinsäure (vor allem die C_{29} -Mycocerosinsäure). Der Zucker wurde als 2-O-Methyl-D-rhamnose erkannt [27].

Nach Elementaranalyse und Massenspektrometrie hat das „aromatische Analoge des Phthiocerols“, das wir „Phenolglykol B“ nennen, die Formel $C_{32}H_{58}O_4$. UV-, IR- und NMR-Messungen zeigen, daß ein p-Phenol vorliegt; Massenspektrometrie des Phenol-methyläthers zeigt ferner, daß diese Substanz das Fragment $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ enthält.

[22] A. M. Miquel, H. Ginsburg u. J. Asselineau, Bull. Soc. Chim. biol. 45, 715 (1963).

[23] I. Azuma u. Y. Yamamura, J. Biochemistry (Tokio) 52, 142, 200 (1962); 53, 275 (1963).

[24] D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan u. E. Lederer, Nature (London) 186, 887 (1960).

[25] D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan, R. K. Putney u. S. V. Rao, J. Bacteriol. 79, 217 (1960).

[26] D. W. Smith, H. M. Randall, M. Gastambide-Odier u. A. L. Koevoet, Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 145 (1957).

[27] H. Demartean-Ginsburg u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 70, 442 (1963).

Phospholipide

Die Arbeiten von Anderson [1a] hatten vor allem gezeigt, daß die Phospholipide der Mycobakterien stickstoffarm sind und Inosit und D-Mannose enthalten. Eine „Manninositose“ aus zwei Molekülen D-Mannose und einem Molekül meso-Inosit wurde charakterisiert [1a].

Neuere Arbeiten von E. Vilkas, teilweise mit C. Ballou, in Gif haben gezeigt, daß in menschlichen Stämmen, im BCG [*] sowie in *M. phlei* besonders folgende Typen von stickstoff-freien Phospholipiden vorkommen [28]:

1. Ein zuckerfreies Phosphoinositid, in dem, wie in allen anderen derartigen Verbindungen pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, die Phosphorsäure an das L-1-Hydroxyl des meso-Inosits gebunden ist.

2. Ein mono- α -D-Mannopyranosid eines Phosphoinositids; nach synthetischen Arbeiten von Angyal und Shelton [29] ist die Mannose an das D-1-Hydroxyl des Inosits gebunden.

3. Ein Di- α -D-mannopyranosid eines Phosphoinositids; nach E. Vilkas liegt eine α -(1 \rightarrow 6)-D-Mannobiose vor [30].

4. Ein Pentamannosid eines Phosphoinositids [31, 32].

[*] BCG = *Bacillus Calmette-Guérin*.

[28] C. E. Ballou, E. Vilkas u. E. Lederer, J. biol. Chemistry 238, 69 (1963).

[29] S. J. Angyal u. B. Shelton, Proc. chem. Soc. (London) 1963, 57.

[30] E. Vilkas u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 1013 (1960).

[31] S. Nojima, J. Biochemistry (Tokio) 46, 607 (1959).

[32] M. C. Pangborn, Fed. Proc. 17, 1133 (1958).

Die Anwesenheit des von uns früher [1f] vermuteten Trimanosids konnte neuerdings nicht bestätigt werden.

Die früher in Phospholipiden oft gefundenen Aminosäuren, vor allem L-Ornithin [33], stammten wahrscheinlich aus Verunreinigungen durch Peptidolipoide [34]. Houtsmuller und Van Deenen [35] haben allerdings vor kurzem aus *M. cereus* ein Phosphatidylglycerin isoliert, das esterartig gebundenes Ornithin enthält (siehe auch [36]).

b) Peptidolipoide

Die im folgenden beschriebenen Peptido- und Peptidoglykolipoide sind aus mehreren Gründen bemerkenswert:

1. Sie sind eine neue Form fettlöslicher Peptidderivate.
2. Sie enthalten fast ausnahmslos eine oder mehrere D-Aminosäuren.
3. Sie enthalten manchmal in der Natur nur sehr selten vorkommende Aminosäuren.

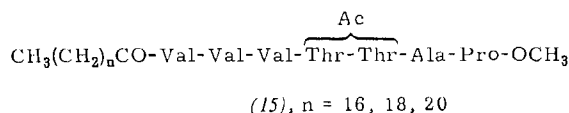
Einige haben interessante biologische Eigenschaften.

Das Studium dieser wohldefinierten Verbindungen ist auch im Hinblick auf neuere Hypothesen [37], die bei der Proteinsynthese eine lipidlösliche Stufe annehmen, von Bedeutung.

Fortuitin: das Fortuitin, Fp = 199 bis 202 °C, $[\alpha]_D = -72^\circ$, $C_{53}H_{95}N_7O_{11} \pm 2 CH_2$, wurde aus *M. fortuitum* isoliert; es enthält ein Gemisch homologer Fettsäuren (hauptsächlich Palmitinsäure), die amidartig mit einem Heptapeptid Val₃, Thr₂, Ala₁, Pro₁ verbunden sind [38]. Als bisher einzige Verbindung dieser Gruppe enthält das Fortuitin nur L-Aminosäuren.

Die Gegenwart einer Methoxylgruppe, die neutrale Reaktion des Fortuitins sowie eine positive Hydroxamat-Reaktion sprechen für eine Veresterung der Peptidkette mit Methanol; tatsächlich zeigt das NMR-Spektrum des Fortuitins ein Signal bei 3,64 ppm, das einer Methoxycarbonyl-Gruppe entsprechen könnte.

Chemische und enzymatische Partialhydrolysen haben schließlich zur Formel (15) für das Fortuitin geführt [39], in der ein Molekül Essigsäure die Hydroxylgruppe eines der Threonin-Moleküle verestert.



Peptidolipin NA: 1958 beschrieben wir mit Guinand und Michel [40] ein Gemisch von Peptidolipiden, das aus *Nocardia asteroides* isoliert worden war; vor kurzem

[33] T. Gendre u. E. Lederer, Ann. Acad. Sci. fennicae, Ser. A II, 60, 313 (1955).

[34] F. Paul u. E. Vilkas, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 254, 3915 (1962).

[35] U. M. T. Houtsmuller u. L. L. M. Van Deenen, Biochim. biophysica Acta 70, 211 (1963).

[36] M. A. Lanéele, G. Lanéele u. J. Asselineau, Biochim. biophysica Acta 70, 99 (1963).

[37] R. W. Hendler, Nature (London) 193, 821 (1962).

[38] E. Vilkas, A. M. Miquel u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 59, 731 (1962).

[39] P. Jollès, E. Vilkas u. E. Lederer, unveröffentlichte Versuche.

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

ist es Guinand und Michel [41] gelungen, durch Gegenstromverteilung aus diesem Gemisch eine reine Verbindung zu isolieren. Der Name Peptidolipin NA ist vorgeschlagen worden; die Substanz, Fp = 232 bis 233 °C, $[\alpha]_D = +42^\circ$, $C_{47}H_{83}N_7O_{12}$, enthält eine Fettsäure, die amidartig an ein Heptapeptid L-Thr₂, L-Ala₁, D-Ala₁, L-Val₁, D-allo-Ileu₁, L-Pro₁ gebunden ist.

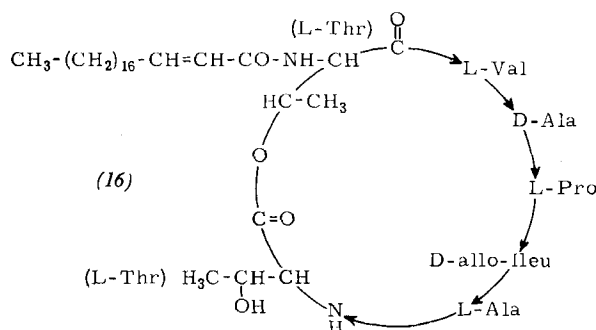
Das von Ikawa und Snell [42] hier gefundene D-allo-Isoleucin ist bisher nur von Brockmann et al. [43] aus Actinomycin C₃ isoliert worden.

Die durch energische saure Hydrolyse des Peptidolipin NA erhaltene Fettsäure hat sich im Gaschromatogramm als homogen erwiesen und wurde als 2-trans-Eicosensäure erkannt [44].

Die saure Partialhydrolyse ergibt ein N-acyliertes L-Threonin, freies L-Threonin sowie ein Hexapeptid der Struktur:



Da das Peptidolipin NA keine freie Carboxylgruppe hat, eine positive Hydroxylamin-Reaktion zeigt und nach Reduktion mit LiAlH₄ Threoninol ergibt [45], nehmen wir eine cyclische Struktur an, in der die Carboxylgruppe eines Threonins die OH-Gruppe des zweiten Threonins verestert. Vorsichtige saure Hydrolyse öffnet den Ring an der Stelle der Esterbindung, und man erhält so eine Substanz, die noch die Fettsäure sowie alle sieben Aminosäuren enthält. In dieser Substanz ist jetzt ein C-endständiges Threonin nachzuweisen.



Formel (16) erklärt in zufriedenstellender Weise alle Reaktionen des Peptidolipin NA [44]. Sie erinnert an die Strukturen mehrerer Antibiotika, z. B. des Etamycins [46] und des Telomycins von Sheehan et. al. [47], der Actinomycine von Brockmann und Mitarbeitern

[41] M. Guinand u. G. Michel, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 256, 1621 (1963).

[42] M. Ikawa u. E. E. Snell, Biochim. biophysica Acta 60, 186 (1962).

[43] H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass u. H. Kalbe, Chem. Ber. 84, 260 (1951).

[44] M. Guinand, G. Michel u. E. Lederer, unveröffentlichte Versuche. Nach neueren Versuchen sieht es so aus, als ob die 2-trans-Eicosensäure während der sauren Hydrolyse des Peptidolipin NA durch β -Eliminierung aus der 3-Hydroxy-eicosensäure hervorgeht; das Hydroxyl dieser Säure wäre demnach mit dem Carboxyl des endständigen Threonins verestert, und Formel (16) wäre entsprechend zu ändern.

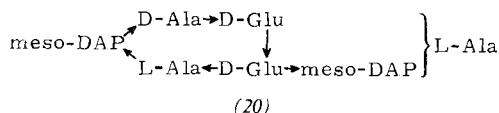
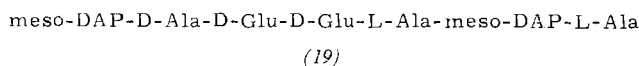
[45] Nicht Alaninol, wie in der ersten Mitteilung [41] irrtümlicherweise angegeben wurde.

[46] J. C. Sheehan, H. G. Zachau u. W. B. Lawson, J. Amer. chem. Soc. 80, 3349 (1958).

[47] J. Sheehan et al., J. Amer. chem. Soc. 85, 2868 (1963).

Peptidteil ist besonders interessant, weil er anscheinend für die immunologische Adjuvanswirkung [*] der D-Wachse bestimmend ist.

In diesem Peptidteil findet man die typischen „Zellwand-Aminosäuren“ der Mycobakterien, nämlich meso- α,α' -Diaminopimelinsäure (meso-DAP), D-Glutaminsäure und D- sowie L-Alanin [55]. In den meisten Fällen sind die Proportionen fast genau meso-DAP₂, D-Glu₂, D-Ala₁, L-Ala₂ [56]. Diese sieben Aminosäure-Moleküle bilden ein Heptapeptid, für das vorläufig zwei Strukturen (19) oder (20) in Betracht kommen [57].



Die Bindung des Heptapeptids an das Polysaccharid ist resistent gegen Reduktion mit Natriumborhydrid und gegen 0,01 N NaOH, was eine Esterbindung auszuschließen scheint. Vielmehr ist das Heptapeptid offenbar amidartig mit der Carboxylgruppe eines meso-DAP an die NH₂-Gruppe von Galaktosamin gebunden; der Aminosucker ist glykosidisch mit Arabinose verknüpft.

Vor kurzem gelang es, D-Wachse menschlicher Stämme durch Ultrazentrifugation in Äther in mehrere deutlich verschiedene Fraktionen zu zerlegen [58]:

1. eine „leichte“ Fraktion (6 bis 10 % des D-Wachses), die in Äther gelöst bleibt, aminosäure-frei ist und keine Adjuvanswirkung zeigt, sowie
2. mehrere „schwere“ Fraktionen, die nach 15 bis 150 Minuten sedimentieren.

Alle „schweren“ Fraktionen enthalten die schon erwähnten Aminosäuren, in der ungefähren Proportion meso-DAP₂, Glu₂, Ala₃. In einer Fraktion ist ein Glu durch Gly ersetzt.

In diesen durch Ultrazentrifugation gereinigten Fraktionen wurde auch zum erstenmal Muraminsäure (3-O-Lactyl-D-glucosamin) festgestellt, was wiederum für die biochemische Analogie zwischen D-Wachsen und der Zellwand spricht [59].

Alle unsere Resultate scheinen darauf zu deuten, daß in den D-Wachsen menschlicher Stämme ein, zwei oder drei Moleküle Heptapeptid durch Galaktosamin an das Polysaccharid gebunden sind. Formel (21) zeigt eine hypothetische Struktur.

Nach den Ergebnissen der Ultrazentrifugation des wasserlöslichen Teils der D-Wachse ist das Molekulargewicht des peptidhaltigen Mucopolysaccharides ca.

[*] Als Adjuvans bezeichnet man eine Substanz, die bei gemeinsamer Applikation mit einem Antigen die Antikörperbildung stimuliert (siehe weiter unten).

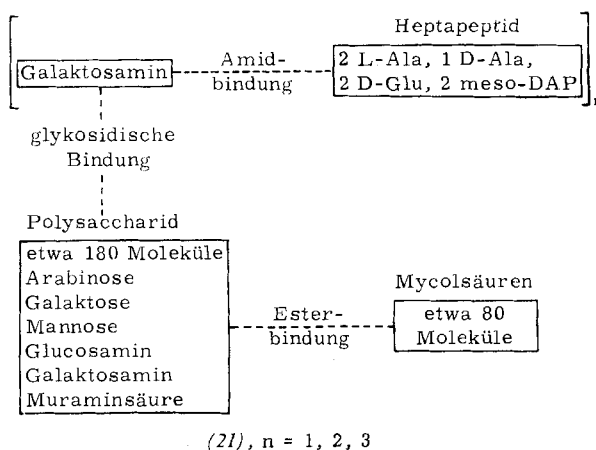
[55] C. S. Cummins u. H. Harris, J. gen. Microbiol. 18, 173 (1958).

[56] J. Asselineau, H. Buc, P. Jollès u. E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. 40, 1953 (1958).

[57] P. Jollès, H. Nguyen-Trung-Luong-Cros u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 43, 559 (1960).

[58] P. Jollès, D. Samour u. E. Lederer, Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. 1, 283 (1962).

[59] P. Jollès, D. Samour u. E. Lederer, Biochim. biophysica Acta 78, 342 (1963).



35000. Da das D-Wachs ca. 25 % Mucopolysaccharid enthält, wäre das minimale Molekulargewicht des intakten D-Wachses ca. 140000.

Die Ultrazentrifugation von D-Wachsen boviner, aviärer und saprophytischer Stämme in Äther hat analoge Fraktionen ergeben, nur mit dem Unterschied, daß „schwere“ Fraktionen hier meist nur in geringer Menge anfallen und der größte Teil in Äther bleibt. Diese löslichen Fraktionen enthalten keine Aminosäuren und sind als Adjuvantien unwirksam [59,60].

Einige „schwere“ Fraktionen aus *M. avium* und *M. phlei* enthalten einen Peptidteil, der dem der D-Wachse aus menschlichen Stämmen sehr ähnlich ist; diese Fraktionen sind auch als Adjuvantien wirksam.

Eine besondere Stellung nehmen die D-Wachse der sogenannten „atypischen photochromogenen“ Stämme (*M. kansasii*) ein; sie verhalten sich bei der Ultrazentrifugation in Äther genau wie die D-Wachse menschlicher Stämme: sie sedimentieren bis auf wenige Prozent und enthalten das typische Heptapeptid sowie Aminosucker; sie sind als Adjuvantien wirksam [59,60].

III. Biologische Wirkungen

Tabelle 2 gibt eine Übersicht der an Lipoid-Fraktionen des Tuberkelbazillus beobachteten biologischen Wirkungen. Über die Bildung von Tuberkeln scheinen nur ältere Angaben vorzuliegen; diese wurden schon 1960 zitiert [1d].

Tabelle 2. Beziehungen zwischen biologischer Wirkung und chemischer Konstitution der Lipide von Tuberkelbazillen.

Biologische Wirkung	Chemische Konstitution der Lipide
Bildung von Tuberkeln	Verzweigte Fettsäuren (Phthiänsäuren, Mycrocerosinsäuren, Mycolsäuren und deren Ester)
Gewichtsverlust, Haemorrhagien, Tod	Cord-Faktor (6,6'-Dimycolat der Trehalose)
Adjuvanswirkung, Granulom, verzögerte Hypersensibilität	D-Wachse (Peptidoglykolipide)
Immunisierung	Phosphoglykolipide (?)

Wir haben uns in den letzten Jahren vor allem für Adjuvanswirkung und Immunisierung interessiert.

[60] R. G. White, P. Jollès, D. Samour u. E. Lederer, Immunology, im Druck.

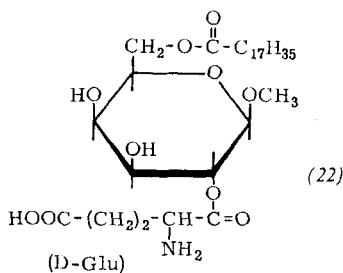
a) Adjuvanswirkung

Vor allem aus Arbeiten von *Freund* [61] ist bekannt geworden, daß abgetötete Tuberkelbazillen in Paraffinöl-Suspension einen Adjuvanseffekt aufweisen, das heißt: injiziert man einem Tier die Bakterien-Suspension zusammen mit einem Antigen, so beobachtet man ein starkes Ansteigen der Antikörper-Bildung. *White, Bernstock, Johns* und *Lederer* [62] bewiesen, daß die D-Wachse für diese Aktivität verantwortlich sind und daß nur die D-Wachse humaner Stämme, also nur die, in denen die drei Aminosäuren Ala, Glu und meso- α,α' -Diaminopimelinsäure vorkommen, aktiv sind.

Seither wurden D-Wachse weiter gereinigt, und es ergab sich, wie erwähnt, daß D-Wachse nicht-menschlicher Stämme in kleiner Menge auch ein Peptidoglykolipoid enthalten, das chemisch der Hauptfraktion der D-Wachse menschlicher Stämme sehr ähnlich ist [59].

Die biologischen Versuche von *White* (am London Hospital) haben gezeigt, daß nur die Fraktionen, die das Heptapeptid DAP₂D-Glu₂Ala₃ enthalten, Adjuvanswirkung besitzen. Diese Wirkung scheint der im D-Wachs vorhandenen Menge an Heptapeptid proportional zu sein [62a].

Unwirksam sind folgende Substanzen: der wasserlösliche Teil der D-Wachse, Mycolsäuren, die Wachse A, B und C, Fortuitin, Peptidolipin NA, die Mycoside C₂ und C_m, ein synthetisches Galaktolipoid (22), das 6-O-Stearyl-2-D-glutamyl- β -D-methylgalaktopyranosid [63], sowie das Distearylamid des meso- α,α' -Diaminopimelinsäure-dimethylesters.



Nach *White* geht die Adjuvanswirkung immer parallel mit der Bildung eines Granuloms an der Injektionsstelle und mit der für Tuberkulose typischen verzögerten Hypersensibilität [*].

Es sei noch bemerkt, daß die Adjuvanswirkung der D-Wachse viel länger anhält als die durch die Endotoxine gramnegativer Bakterien hervorgerufene [65].

[61] *J. Freund*, Adv. Tuberc. Res. 7, 130 (1956).

[62] *R. G. White, L. Bernstock, R. G. S. Johns u. E. Lederer*, Immunology 1, 54 (1958).

[62a] *R. G. White*, unveröffentlichte Versuche.

[63] *M. Černý, J. Moron u. E. Lederer*, Bull. Soc. Chim. biol. 45, 601 (1963).

[*] Diese Wirkung wurde früher nach Versuchen von *Raffel* [64] im allgemeinen den Zuckerestern der Mycolsäuren zugeschrieben; dies hat sich in den Versuchen von *White* nicht bestätigen lassen.

[64] *S. Raffel, J. Asselineau u. E. Lederer*: Experimental Tuberculosis, A Ciba Foundation Symposium. Churchill, London 1955, S. 174.

[65] *J. Munoz*, J. Immunol. 90, 132 (1963).

Wir versuchen gegenwärtig mit *Bricas* [66] durch Verwendung von Enzymen stereospezifisch Peptide der meso- α,α' -Diaminopimelinsäure herzustellen; solche Peptide müßten mit Mycolsäureestern von Zuckern verbunden werden, um zu synthetischen Adjuvantien zu gelangen.

b) Immunisierung

Die meisten Autoren scheinen darin übereinzustimmen, daß weder Tuberkulin noch andere Proteine oder Polysaccharide des Tuberkelbazillus Tiere gegen experimentelle Tuberkulose zu immunisieren vermögen.

Andererseits gibt es verschiedene Angaben, daß mehr oder weniger gereinigte Lipoidfraktionen dies vermögen. So haben schon vor mehr als 40 Jahren *Boquet* und *Nègre* [67] am Pasteur-Institut in Paris einen Methanol-extrakt von *M. tuberculosis* hergestellt, den sie „Antigène méthylique“ nannten und mit dem sie Tiere gegen Tuberkulose immunisieren konnten. Diese Versuche sind 1956 von *Weiss* und *Dubos* [68] bestätigt und erweitert worden. Wir haben uns seither auch für diese Fraktion interessiert, deren immunogene Wirksamkeit von *H. Bloch* an Mäusen geprüft wurde. Eine Zeitlang schien sich die Wirksamkeit in einer ätherunlöslichen Phosphatidfraktion anzureichern, und wir meinten, eine reine, als Phosphatidyl-inosito-trimannosid analysierte Fraktion in Händen zu haben [1f]; das hat sich jedoch nicht bestätigt, so daß die immunisierende Substanz (oder Substanzen) im „Antigène méthylique“ noch zu identifizieren sind.

Es gibt auch Angaben über immunisierende Wirkungen des sogenannten PmKo [69], einer Lipoidfraktion, die dem von uns beschriebenen D-Wachs chemisch sehr nahe steht. Nach *Crowle* [70] waren drei von vier solcher PmKo-Präparate wirksam; derselbe Autor fand allerdings auch Wachs B wirksam, was bisher noch nie beobachtet worden ist.

Nach *Larson, Ribi* et al. [71] haben Zellwände von *M. tuberculosis* (BCG) keine immunisierende Wirkung, wenn die Bazillen im Wasser aufgebrochen werden, wohl aber, wenn dies in Paraffinöl getan wird. Die Bedeutung dieses Befundes ist noch unklar.

Es ist andererseits a priori wahrscheinlich, daß eine starke Immunität, die sich mit der vom BCG hervorgerufenen vergleichen ließe, nur durch Verwendung von zwei oder mehreren Antigenen zu erzielen ist. Anzeichen für eine Dualität finden sich in der Arbeit von *Williams* und *Dubos* [72]. Das Problem kompliziert sich außerdem durch das gleichzeitige Auftreten einer „nicht spezifischen Resistenz“, wie sie auch durch die En-

[66] *E. Bricas, C. Nicot u. E. Lederer*, Bull. Soc. Chim. biol. 44, 1115 (1962); *C. Nicot u. E. Bricas*, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 256, 1391 (1963).

[67] *A. Boquet u. L. Nègre*, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 86, 581 (1922); *L. Nègre*: Les Lipoides dans le Bacille Tuberculeux et la Tuberculose. Masson, Paris 1950.

[68] *D. W. Weiss u. R. J. Dubos*, J. exp. Med. 103, 73 (1956).

[69] *N. Choucroun*, Amer. Rev. Tuberc. 56, 203 (1947).

[70] *A. J. Crowle*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 969 (1962).

[71] *C. L. Larson, E. Ribi, W. C. Wicht, R. H. List u. G. Goode*, Nature (London) 198, 1214 (1963).

[72] *C. A. Williams u. R. J. Dubos*, J. exp. Med. 110, 981 (1959).

dotoxine gramnegativer Bakterien hervorgerufen werden kann.

Unsere Arbeiten wurden von der Fondation Waksman pour le Développement des Recherches Microbiologiques en France sowie durch Grant AI-02838 vom National

Institute of Allergy and Infectious Diseases (U.S. Public Health Service) unterstützt. Eine Subvention des Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay) hat die Anschaffung von Isotopen ermöglicht.

Eingegangen am 12. September 1963 [A 356]

Fortschritte in der Synthese von 19-nor-Steroiden

VON THOMAS B. WINDHOLZ UND MARTHA WINDHOLZ

MERCK SHARP & DOHME RESEARCH LABORATORIES, RAHWAY, N. J. (USA)

In dieser Arbeit werden verbesserte Wege zur Darstellung von 19-nor-Steroiden beschrieben. Sie beruhen auf neuen Totalsynthesen des Östrons und auf der intramolekularen Funktionalisierung und Eliminierung der Methylgruppe C-19 in Androstan-Derivaten.

A. Totalsynthesen

1. Syntheschema AD → ABCD
2. Syntheschema CD → ACD → ABCD
3. Syntheschema AB → ABD → ABCD

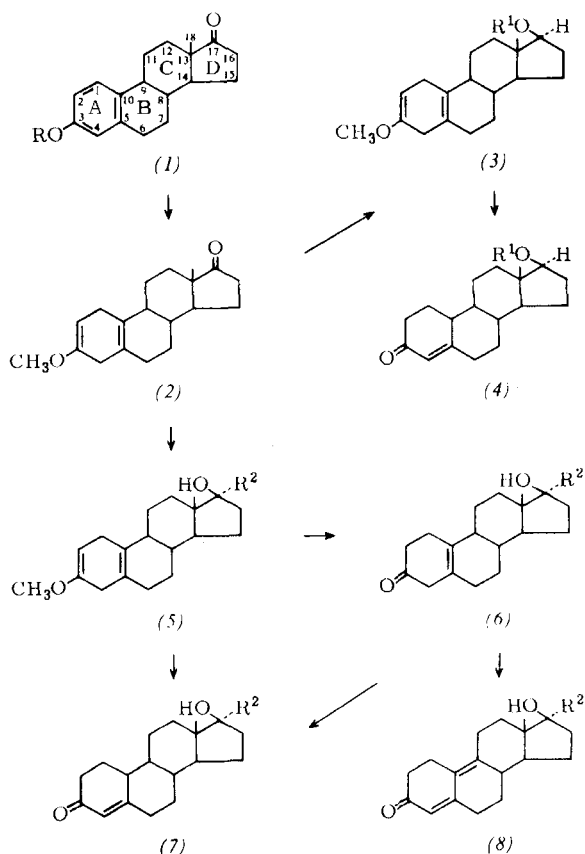
4. Andere Synthesen

- B. Aromatisierung des Ringes A
- C. Intramolekulare Funktionalisierung von C-19
- D. Praktisch brauchbare Synthesen von 19-nor-Steroiden

Einleitung

Nichtaromatische 19-nor-Steroide haben in den letzten zehn Jahren als anabolisch wirkende Stoffe [1] und als Gestagene zur Ovulationshemmung [2] Bedeutung erlangt. Einige Anabolica mit günstigem Verhältnis von anabolischer zu androgener Aktivität sind: 19-nor-Testosteron (4), $R^1 = H$, einige seiner Ester ($R^1 = \text{Acyl}$) und 17α -Alkyl-Derivate, z. B. (7), $R^2 = C_2H_5$. Gestagene Wirkung zusammen mit ausgeprägter Gonadotropin-Hemmung zeigen bei oraler Applikation Noräthisteron (7), $R^2 = -C\equiv CH$, Noräthinodrel (6), $R^2 = -C\equiv CH$, sowie die kürzlich beschriebenen 19-nor- $\Delta^{4,9(10)}$ -Androstadien-3-one (8), $R^2 = -C\equiv CH$ [3] und $R^2 = -C\equiv CCl$ [4].

Bis 1961 beruhte die Darstellung dieser Substanzen [5] fast vollkommen auf der Birch-Reduktion [6] des einzigen allgemein zugänglichen 19-nor-Steroids, d. h. des Östrons (1), $R = H$, oder seines 3-Methyläthers (1),



[1] Zusammenfassung: B. Camerino u. G. Scala, in E. Jucker: Progress in Drug Research. Birkhäuser, Basel 1960, Bd. 2, S. 71.

[2] G. Pincus u. A. P. Merrill, in C. A. Villee: Control of Ovulation. Pergamon Press, New York 1961, S. 37.

[3] M. Perelman, E. Farkas, E. J. Fornfeld, R. J. Kraay u. R. T. Rapala, J. Amer. chem. Soc. 82, 2402 (1960).

[4a] J. H. Fried, T. S. Bry, A. E. Oberster, R. E. Beyler, T. B. Windholz, J. Hannah, L. H. Sarett u. S. L. Steelman, J. Amer. chem. Soc. 83, 4663 (1961).

[4b] C. Burgess, D. Burn, J. W. Ducker, B. Ellis, P. Feather, A. K. Hiscock, A. P. Leftwick, J. S. Mills u. V. Petrow, J. chem. Soc. (London) 1962, 4995.

[5] Eine detaillierte Beschreibung dieser Reaktionen findet sich in L. F. Fieser u. M. Fieser: Steroide. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1961, S. 639.

[6a] A. J. Birch u. H. Smith, Quart. Rev. (Chem. Soc. London) 12, 17 (1958).

[6b] Neuere Verbesserungen: H. L. Dryden, G. M. Webber, R. R. Burtner u. J. A. Cella, J. org. Chemistry 26, 3237 (1961); B. Pelc, Coll. czechoslov. chem. Commun. 27, 2706 (1962).

[6c] Zusammenfassung: F. J. Kakis in C. Djerassi: Steroid Reactions. Holden-Day, San Francisco 1963, S. 267.

[6d] Die in diesem Abschnitt wiedergegebenen Strukturformeln bezeichnen jeweils nur ein Enantiomer. Im Text sind auch dann stets die Racemate gemeint, wenn die Bezeichnung (\pm) fehlt.