

Die Gesamtheit der chemischen und biologischen Befunde erlaubt die Annahme, daß die Zuckerketten im NN-Antigen nur aus vier bis sechs Monosacchariden bestehen, während im Meconium-Antigen erheblich längere Ketten angenommen werden müssen. Die immunologische Spezifität dürfte von noch kleineren Oligosaccharidgruppen bestimmt werden: multiple Einheiten von nicht mehr als zwei Zuckern für die *Vicia*-Spezifität und nicht mehr als vier für die mit menschlichem Serum gemessene N-Spezifität. Die Gesamtzahl der Ketten mit N-Spezifität, mit menschlichem Serum bestimmt, beträgt maximal etwa 300 pro Molekül NN-Antigen^[96].

Die MM- und NN-Antigene können, da sie mehrere biologische Funktionen besitzen, nicht nur in der Blutgruppenserologie, der biochemischen Genetik des Menschen und der Virologie als Modelle dienen, sondern auch auf einigen anderen Gebieten. Es handelt sich hier erstmals um physikalisch homogene, chemisch definierte Zellmembrankomponenten eines Säugers, die eine Blutgruppenaktivität der gleichen Größenordnung wie die besten aus Körperflüssigkeiten isolierten ABH(0)-Glykoproteine zeigen (bestimmt mit ihren Antikörpern).

Eingegangen am 17. März 1966, ergänzt am 17. August 1966 [A 535]

ZUSCHRIFTEN

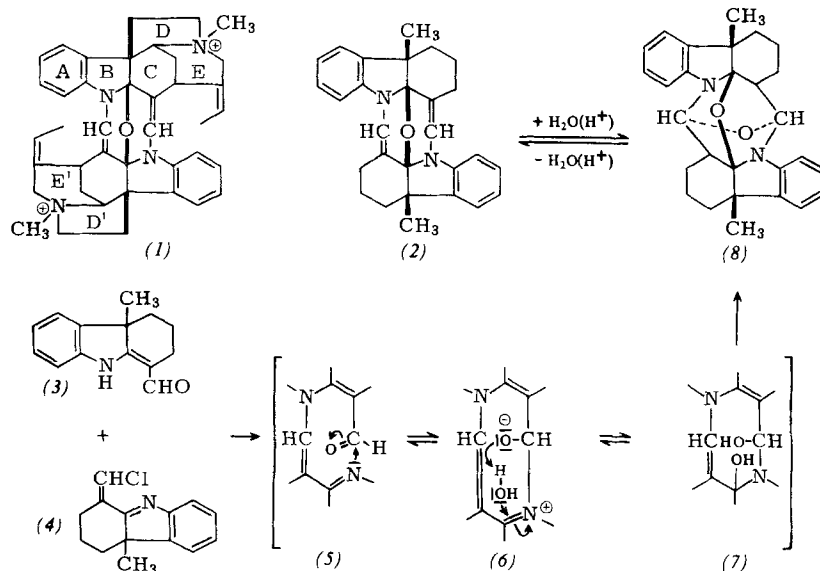
Synthese der zentralen octacyclischen Struktur des Calebassencurare-Hauptalkaloids C-Curarin-I^[1]

Von Prof. Dr. H. Fritz und Dipl.-Chem. R. Oehl

Institut für Organische Chemie
der Universität Frankfurt am Main

Eliminiert man formal aus dem C-Curarin-I^[2] (1) die in der Peripherie angegliederten Ringe D und E sowie D' und E', so erhält man ein octacyclisches Ringsystem (2), den Chromophor des Alkaloids. Es ist uns gelungen, diesen lange gesuchten^[3] Chromophor zu synthetisieren, dessen strukturelle Besonderheit das in seiner Mitte befindliche, von einem Äthersauerstoff überbrückte Diazacyclooctadien-System ist.

Läßt man eine äquimolare Mischung des vinylogenen Formamids (3)^[4] und des Imidchlorids (4)^[5] in wasserhaltigem Äther gelöst etwa 18 Std. bei 20°C stehen, so wird zunächst in etwa 20-proz. Ausbeute in stereospezifischer Reaktion das Racemat des Indolins (8) (Fp = 216°C) gebildet^[5].



Für die Konstitution (8) sind beweisend: die Elementaranalyse, das UV-Spektrum (Indolin-Absorption), das IR-Spektrum (Ätherbande bei 8,38 μ ; keine OH- und NH-Bande) und das Massenspektrum ($M^+ = 426$). Insbesondere beweist das NMR-Spektrum (in $CDCl_3$), zusammen mit $MG = 426$, zwei äquivalente C-Methylgruppen (6H-Singulett bei $\tau = 8,93$; TMS als interner Standard) und zwei äquivalente Aminoacetal-Protonen (2H-Singulett^[6] bei $\tau = 4,63$). Aus der Äquivalenz dieser Gruppen folgt die für Formel (8) geforderte Symmetrie C_2 . Das zentrale tricyclische System von (8) – das sich im Modell praktisch spannungsfrei aufbauen

läßt – ist mit Adamantan isoster, und zwar ist es ein substituiertes 2,6-Dioxa-4,8-diaza-adamantan. Sehr wahrscheinlich stimmt die aus C-Curarin-I erhaltene „Indolinbase-VII“ bisher unbekannter Konstitution^[7] in ihrer zentralen nonacyclischen Struktur mit Verbindung (8) überein.

(8) entsteht aus (3) und (4) und einem Molekül Wasser vermutlich über (5), (6) und (7).

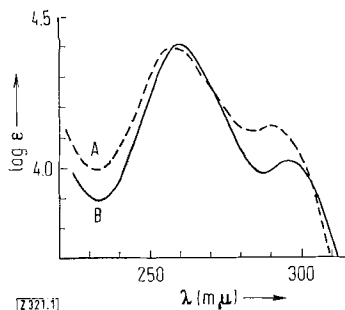
Durch säurekatalysierte Dehydratisierung (methanol. 1 N HCl; 20°C; 24 Std.) läßt sich (8) mit (2) (Fp = 205°C) – das hierbei in ebenfalls sterisch einheitlicher Form entsteht – ins Gleichgewicht setzen. Es resultiert eine Mischung von (8) und (2) im Molverhältnis $\approx 1:1$, gleichgültig ob man von reinem (8) oder von reinem (2) ausgeht. Die beiden Substanzen lassen sich leicht chromatographisch an Kieselgel-G mit Benzol als Fließmittel präparativ trennen und kristallisieren leicht.

Mit der Konstitution (2) sind im Einklang: die Elementaranalyse, das massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewicht 408 und das IR-Spektrum (keine OH- und NH-Bande). Aus dem NMR-Spektrum ist ersichtlich, daß (2),

ebenso wie (8), C_2 -Symmetrie besitzt, da die sechs Protonen der beiden C-Methylgruppen ein scharfes Singulett bei $\tau = 8,87$ (in $CDCl_3$; TMS als interner Standard) verursachen. Die beiden an den Enamin-C-Atomen stehenden Protonen zeigen ein durch Allylkopplung schwach aufgespaltenes Signal bei $\tau = 3,30$, das an genau der gleichen Stelle liegt, wie das Signal dieser Protonen im Nor-C-curarin-I^[2b]. Damit kann für unser Syntheseprodukt eine zu (2) alternative Formel (O-Brücke zwischen den beiden CH-Gruppen und entsprechend andere Lage der Doppelbindungen) mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da in dieser die beiden relevanten

Protonen an Aminoacetal-C-Atomen stehen würden und daher ihre Resonanzsignale bei wesentlich höherem Feld erscheinen müßten.

Schließlich stimmt das UV-Spektrum von (2) (siehe Abb.) mit dem von C-Curarin-I (1)^[8] so gut überein, wie es auf Grund der vereinfachten Struktur möglich ist. Die höhere Alkylsubstitution im Alkaloid (1) im Vergleich zu (2) macht sich dadurch schwach bemerkbar, daß im Spektrum von (1) das kürzerwellige Maximum um 2 m μ und das längerwellige um 7 m μ bathochrom gegen das Spektrum von (2) verschoben sind.



UV-Spektren

A: Synthetisches C-Curarin-I-Derivat (2), 0,390 mg in 25 ml Methanol;
B: C-Curarin-I-dichlorid (1)2Cl⁺, 0,507 mg in 25 ml Methanol.

Die für C-Curarin-I typische Farbreaktion mit Cerisulfat/Schwefelsäure^[8] zeigt in der gleichen Nuance und Intensität (intensiv blau) auch unser synthetisches C-Curarin-I-Derivat (2).

Eingegangen am 12. August 1966 [Z 321]

[1] Vorgetragen auf der Westdeutschen Chemiedozenten-Tagung in Würzburg, April 1966. Synthetische Versuche in der Reihe der Indolalkaloide V; IV. Mittlg.: H. Fritz u. O. Fischer, Tetrahedron 20, 2047 (1964).

[2a] H. Wieland, W. Konz u. R. Sonderhoff, Liebigs Ann. Chem. 527, 160 (1937); H. Wieland u. H. J. Pistor, ibid. 536, 68 (1938).

[2b] J. Nagyváry, W. Arnold, W. v. Philipsborn, H. Schmid u. P. Karrer, Tetrahedron 14, 138 (1961).

[3] K. Bernauer, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 17, 183 (1959).

[4] H. Fritz, Chem. Ber. 92, 1809 (1959).

[5] H. Fritz, A. Kreckel u. H. Meyer, Liebigs Ann. Chem. 664, 188 (1963).

[6] Eine Aufspaltung dieses Signals durch Kopplung mit dem benachbarten Proton ist wegen eines Diederwinkels von 60–70° kaum nachweisbar.

[7] W. v. Philipsborn, W. Arnold, J. Nagyváry, K. Bernauer, H. Schmid u. P. Karrer, Helv. chim. Acta 43, 141 (1960).

[8] J. Kebrle, H. Schmid, P. Waser u. P. Karrer, Helv. chim. Acta 36, 102 (1953).

Quartärstruktur und Farbe von Crustacyanin

Von Prof. Dr. R. Kuhn und Dipl.-Chem. H. Kühn

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

Aus den Panzern des Hummers läßt sich ein blaues Chromoprotein (Crustacyanin) isolieren^[1], dessen prosthetische Gruppe Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy-4,4'-dioxo- β -carotin) ist^[2]. Wir entkalkten die Panzer mit Calgon®; die entkalkten Panzer gaben das Chromoprotein leicht an Phosphatpuffer (pH = 7) ab. Die Reinigung erfolgte durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat und durch präparative Ultrazentrifugation.

α -Crustacyanin, das native Chromoprotein (λ_{\max} = 632 m μ in Wasser), ist in 0,2 M Phosphatpuffer (pH = 7) monatelang beständig. Als einheitlich erwies es sich in der analytischen Ultrazentrifuge, beim fraktionierenden Aussalzen mit Ammo-

niumsulfat und bei der Elektrophorese. Die Extinktionskoeffizienten 1-prozentiger wäßriger Lösungen (1 cm Schichtdicke) betragen: $E_{278 \text{ m}\mu}$ = $19,4 \pm 0,4$ und $E_{632 \text{ m}\mu}$ = 65 ± 2 . Auf 19000 \pm 1000 g Chromoprotein kommt 1 Mol Astaxanthin. α -Crustacyanin enthält 15,7% N (nach Dumas) und folgende Aminosäuren^[3] (g Anhydroamino-säure/100 g Chromoprotein): Lys 6,86; His 1,99; Arg 4,37; Asp 12,95; Thr 5,71; Ser 5,58; Glu 8,41; Pro 4,69; Gly 2,61; Ala 5,58; Val 6,64; Ileu 3,82; Leu 4,20; Phe 8,67; Tyr 9,76; Cys 1,39; Try 2,5.

α -Crustacyanin hat ein Molekulargewicht von ca. 310000; es enthält 16 Moleküle Astaxanthin gebunden. Der Staudinger-Index beträgt bei 20°C etwa $[\eta]$ = 0,09 dl/g, und das Achsenverhältnis etwa 10:1 (ein Rotationsellipsoid^[4] vorausgesetzt).

Untereinheiten vom Molekulargewicht ca. 38000 (= β -Crustacyanin, λ_{\max} = 585 m μ in Wasser) entstehen aus α -Crustacyanin in neutralem Phosphatpuffer geringer Ionenstärke; β -Crustacyanin enthält noch zwei Moleküle Astaxanthin pro Proteinmolekül gebunden.

In saurer Lösung (pH = 3,7 bis 3,0) sowie in neutraler 0,15% Natriumdodecylsulfat enthaltender Lösung dissoziieren α - und β -Crustacyanin zu Untereinheiten vom Molekulargewicht ca. 20000; das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei nach 440 m μ (saure Lösung) oder nach 482 m μ (Dodecylsulfat-Lösung). Diese Untereinheiten enthalten noch je ein Molekül Astaxanthin gebunden.

Durch Einwirkung von Alkalien (pH \geq 11) oder Harnstoff (\geq 4 M) können α - und β -Crustacyanin noch weiter zerlegt werden in kleinere, farblose Untereinheiten, die mit nur 1,2 S sedimentieren, und in eine farbige Komponente, die schneller sedimentiert (λ_{\max} der gesamten Lösung = 400 m μ). Wie α -Crustacyanin erwiesen sich auch β -Crustacyanin und die Untereinheiten vom Molekulargewicht ca. 20000 in der Ultrazentrifuge als einheitlich.

Die Änderungen der Quartärstruktur, die α - und β -Crustacyanin unter dem Einfluß von Säuren, Basen oder Harnstoff erleiden, sind reversibel: Bei Neutralisation bzw. Dialyse gegen Phosphatpuffer erhält man aus den Lösungen der Untereinheiten von α -Crustacyanin dieses zurück. Das Produkt unterscheidet sich in der Ultrazentrifuge nicht von nativem α -Crustacyanin. Aus β -Crustacyanin entstehen mit Säuren, Basen, Harnstoff oder Detergentien Untereinheiten mit denselben λ_{\max} -Werten und Molekulargewichten wie aus α -Crustacyanin; die Neutralisation oder Dialyse der Lösungen dieser Untereinheiten liefert aber nur β -Crustacyanin zurück, kein α -Crustacyanin. Dem entspricht, daß die Bildung von β -Crustacyanin aus α -Crustacyanin nicht umkehrbar ist.

Substanz	λ_{\max} [m μ]	Molekulargewicht bei 20°C	Methode
α -Crustacyanin	632	320000 307000	Ultrazentrifuge Lichtstreuung [5]
β -Crustacyanin	585	36000 39500	Ultrazentrifuge Osmometrie [6]
α - oder β -Crust. nach Behandl. mit 0,15% Na-Dodecylsulfat	482	19600	Ultrazentrifuge
α - oder β -Crust. bei pH = 3,5	440	19800	Ultrazentrifuge
α - oder β -Crust. bei pH = 13	400	\leq 10000	Ultrazentrifuge
α - oder β -Crust. in 8 M Harnstoff-Lösung	400	\leq 10000	Ultrazentrifuge
Äquivalentgewicht von α - und β -Crustacyanin (bezogen auf 1 Mol Astaxanthin)		19000	Photometrie, Trockengewicht

Eingegangen am 9. August 1966 [Z 310]

[1] G. Wald, N. Nathanson, W. P. Jencks u. E. Tarr, The Biological Bulletin 95, 249 (1948); W. P. Jencks u. B. Buten, Arch. Biochem. Biophysics 107, 511 (1964); D. F. Cheesman, P. F. Zagalsky u. H. J. Ceccaldi, Proc. Roy. Soc. (London) 164 B, 130 (1966).