

Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren

Von Roland Schauer^[*]

In Gangliosid- und in vielen Glykoproteinmolekülen nehmen Acylneuraminsäuren eine sowohl räumlich als auch biologisch-funktionell herausragende Stellung ein. Acylneuraminsäuren sind *N*- und zum Teil auch *O*-acylierte Derivate der Neuraminsäure, einer Polyhydroxyamino-ketosäure, welche die Eigenschaften eines Kohlenhydrats besitzt und daher zur glykosidischen Bindung fähig ist. In diesem Fortschrittsbericht wird ein Überblick über unsere Kenntnisse von der Chemie und der Biologie der vor allem im Tierreich weit verbreiteten Acylneuraminsäuren gegeben.

1. Entdeckung und Strukturaufklärung der Acylneuraminsäuren

Den ersten Hinweis auf die Existenz der hier besprochenen Substanzen hatten 1927 *Walz*^[1] sowie *Levene* und *Landsteiner*^[2] erhalten, als sie Glykolipide mit Orcin in eisen-chloridhaltiger Salzsäure erhitzen und eine rotviolette Färbung beobachteten (siehe Abschnitt 2). 1936 isolierte *Blix*^[3] aus dem „Submaxillarismucin“, dem Glykoprotein der Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula submaxillaris* oder *submandibularis*) vom Rind, eine Monocarbonsäure in kristalliner Form, deren mögliche Zusammensetzung mit $C_{14}H_{25}NO_{11}$ angegeben wurde und welche sich mit dem Orcin/Salzsäurerereagens ebenfalls rotviolett färbte. Durch salzaure Methanolysen von Gangliosiden des Gehirns erhielt *Klenk*^[4] 1941 eine sauer reagierende Substanz, die er wegen ihrer Herkunft aus dem Nervengewebe „Neuraminsäure“ nannte. Sie wurde ein Jahr später als „Methoxyneuraminsäure“ (Neuraminsäure- β -methylglykosid), das Derivat einer Polyhydroxyamino-säure, mit der Zusammensetzung $C_{10}H_{19}NO_8$ identifiziert^[5].

N-Acetylneuraminsäure wurde in kristalliner Form erstmals von *Klenk* und *Faillard*^[6] bzw. *Klenk*, *Faillard* und *Lempfriid*^[7] aus Submaxillarismucin vom Rind durch Säurehydrolyse bzw. aus Harnmucin nach Einwirkung von Influenzaviren (siehe Abschnitt 7) isoliert. 1956 gelang der Arbeitsgruppe um *Blix*^[8] und 1957 *Klenk* und *Uhlenbrück*^[9] die Reindarstellung der *N*-Glykoloylneuraminsäure aus Schweine-Submaxillarismucin. Di- und Triacetylneuraminsäuren wurden von *Blix*^[8, 10] aus dem Submaxillarismucin von Rind und Pferd gewonnen (siehe Abschnitt 4; dort werden auch weitere Acylneuraminsäuren beschrieben).

Die Aufklärung der Konstitution der Neuraminsäure hat lange Zeit in Anspruch genommen, da sie nur in Form von Acylderivaten, welche nach *Blix*, *Gottschalk* und *Klenk* auch Sialinsäuren genannt werden^[11], in der Natur vorkommt. Lediglich die funktionellen Gruppen der Neuraminsäure – eine Carboxygruppe, eine reduzierende (glykosidische) Gruppe, eine Aminogruppe und fünf Hydroxygruppen – sind rasch^[8, 12] bekannt geworden. Weiteres Licht in die Chemie der Neuraminsäure brachten die ersten Synthesen der *N*-Acetylneuraminsäure (1), welche *Comb*

forth et al. aufgrund der Vermutung von *Gottschalk*^[13], *N*-Acetylneuraminsäure sei ein Aldolkondensat aus *N*-Acetylglucosamin und Brenztraubensäure, aus *N*-Acetylglucosamin und Oxalessigsäure („aktivierte Brenztraubensäure“) gelangen^[14, 15]. Dabei wurde ein mit der aus Naturstoffen isolierten Substanz völlig identisches Produkt erhalten. Diese Experimente wiesen auf *N*-Acetylglucosamin als einen der Bausteine der *N*-Acetylneuraminsäure hin. Als aber *Comb* und *Roseman*^[16] durch Einwirkung einer Aldolase (siehe Abschnitt 7) auf *N*-Acetylneuraminsäure (1) *N*-Acetylmannosamin (2) und Brenztraubensäure (3) erhielten, war gezeigt, daß die Konfiguration der Substituenten an den C-Atomen 5 bis 8 der Neuraminsäure der des *N*-Acetylmannosamins entsprach (Abb. 1). Die erfolgreichen Synthesen der *N*-Acetylneuraminsäure aus *N*-Acetylglucosamin^[14, 15] finden in der im alkalischen Milieu erfolgenden leichten Epimerisierung von *N*-Acetylglucosamin zu *N*-Acetylmannosamin eine Erklärung^[17, 18].

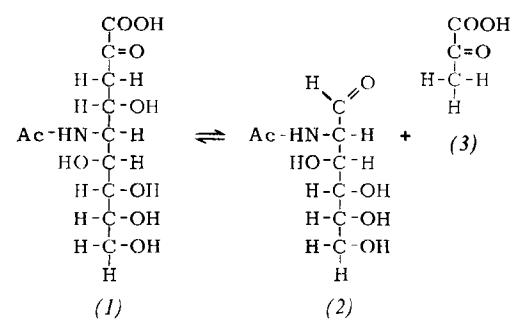


Abb. 1. Reversible Spaltung der *N*-Acetylneuraminsäure (1) in *N*-Acetylmannosamin (2) und Brenztraubensäure (3) durch die Aldolase „Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase“ (siehe Abschnitt 7). Darstellung der Zucker (Keto-Formen) in Fischerschen Projektionsformeln.

Nach Bestimmung der Konfiguration der OH-Gruppe an C-4 (in der Fischerschen Projektionsformel Stellung auf der rechten Seite; siehe Abb. 1) durch *Kuhn* et al.^[19, 20] war die Stereochemie der Neuraminsäure weitgehend bekannt, und der *N*-Acetylneuraminsäure (1) konnte folgender systematischer Name zugeordnet werden: 5-Acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galakturonulosäure. Sie liegt wie alle Acylneuraminsäuren in der Pyranose-Form vor (siehe dazu Abb. 2, 6, 7)^[21]. Die absolute Konformation der *N*-Acetylneuraminsäure konnte in jüngerer Zeit durch NMR-spektroskopische Untersuchungen

[*] Doz. Dr. R. Schauer
Institut für Physiologische Chemie der Universität Bochum
4630 Bochum-Querenburg, Postfach 2148

des *N*-Acetylneuraminsäure-methylesters^[22] sowie durch Röntgen-Strukturanalyse von Kristallen des Neuraminsäure- β -methylglykosids^[23] ermittelt werden. Sie entspricht der 1C-Konformation nach der Reeveschen Nomenklatur (Abb. 2). Nach diesen Untersuchungen ist die anomere Hydroxygruppe der nicht glykosidisch gebundenen Neuraminsäure an C-2 axial angeordnet (Abb. 2).

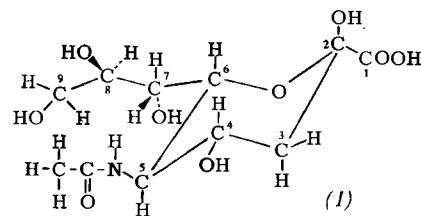


Abb. 2. *N*-Acetylneuraminsäure (1) in der Pyranose-Form; 1C-Konformation. Schreibweise nach Reeves.

2. Eigenschaften und Nachweismethoden der Acylneuraminsäuren

Die unsubstituierte Neuraminsäure (4) ist nicht existenzfähig, da sie durch Kondensation der Aminogruppe an C-5 mit der Carbonylgruppe an C-2 sofort zu einer inneren Schiffsschen Base, der 4-Hydroxy-5-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)- Δ^1 -pyrrolin-2-carbonsäure (5), cyclisiert^[24] (Abb. 3). Dieser Ringschluß wird durch die glykosidische Bindung z.B. einer Methylgruppe an C-2 („Neuraminsäure- β -methylglykosid“)^[4] oder durch Acylierung der Aminogruppe, wie dies bei den natürlich vorkommenden oder synthetisch gewonnenen Neuraminsäure-Derivaten der Fall ist, verhindert (siehe Abschnitte 4 und 5).

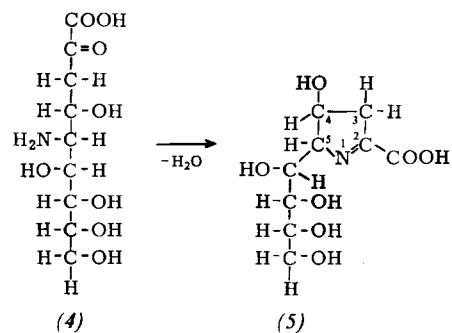


Abb. 3. Spontane Cyclisierung der nicht existenzfähigen Neuraminsäure (4) zur 4-Hydroxy-5-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)- Δ^1 -pyrrolin-2-carbonsäure (5).

Die Acylneuraminsäuren sind farblose, aus Essigsäure-, Äthanol- oder Dioxan-Wassergemischen kristallisierbare Substanzen, die in trockenem Zustand beständig sind und noch unterhalb 200°C unter Zersetzung schmelzen^[21, 25]. Sie lösen sich leicht in Wasser und drehen in wässriger Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach links^[21, 25]; sie sind schlecht löslich in Methanol (mit Ausnahme der Oligoacetylneuraminsäuren; Abschnitt 4) und unlöslich in Äther. Als α -Ketosäuren sind sie relativ starke Säuren, deren pK -Werte je nach Art der *N*- oder *O*-Substituenten zwischen 1.8 und 2.6 liegen^[26, 27].

Während freie Acylneuraminsäuren sowohl in alkalischer als auch in saurer Lösung leicht zersetzt werden, sind glykosidisch gebundene Acylneuraminsäuren gegenüber Alkalien einigermaßen beständig. In alkalischem Milieu erfolgt eine Realdolisierung der freien Acylneuraminsäuren zu Pyruvat und *N*-Acylmannosaminen oder -glucosaminen^[28, 29] (vgl. Abb. 1), oder es entstehen Pyrrol-Derivate^[30]. In einer für α -Ketosäuren typischen Reaktion werden Acylneuraminsäuren in 12-proz. HCl bei 100°C decarboxyliert; mit konzentrierter H_2SO_4 liefern sie Kohlenmonoxid^[18]. In verdünnten Säuren erfolgt die Zersetzung langsam^[31], wobei sich allmählich kirschrote bis dunkelbraune Produkte bilden^[32]. Der Abbau wird entweder durch Desacylierung der Aminogruppe mit folgendem intramolekularem Ringschluß der entstandenen freien Neuraminsäure eingeleitet, oder es kommt über Enolisierungs-, Dehydratisierungs- und Eliminierungsreaktionen zur Cyclisierung und Polymerisation der Moleküle zu braunen „Huminsubstanzen“^[33].

Die durch Säuren entstandenen Abbauprodukte der Acylneuraminsäuren bilden die Grundlage der quantitativen Bestimmung von Acylneuraminsäuren nach der Ehrlich- und nach der Svennerholm/Bial-Methode: Bei der „direkten“ Ehrlich-Reaktion entsteht beim Erhitzen von Acylneuraminsäuren in Salzsäurelösung mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd ein purpuroter Farbstoff^[21, 32]; das Chromogen dieser Reaktion ist vermutlich die aus Neuraminsäure entstandene 5-Tetrahydroxybutyl-2-pyrrolcarbonsäure^[21], die vom Aldehyd abgefangen wird. Bei der Svennerholm/Bial-Methode bildet sich durch Erhitzen von Acylneuraminsäuren in Salzsäure mit Resorcin^[34] oder mit Orcin^[35] und Fe^{3+} -Ionen ein violetter Farbstoff. Es handelt sich wahrscheinlich um einen Methinfarbstoff^[36], der für Neuraminsäure spezifisch ist und aus ihr in einer komplizierten, noch nicht ganz aufgeklärten Reaktionsfolge entsteht.

Die beiden genannten Methoden sind sowohl zum Nachweis glykosidisch gebundener als auch freier Acylneuraminsäuren geeignet. Im Gegensatz dazu erfaßt die Perjodsäure/Thiobarbitursäure-Methode nach Warren^[37] sowie Aminoff^[38] nur freie Acylneuraminsäuren. Bei dieser sehr empfindlichen und am häufigsten gebrauchten Analysenmethode (Erfassungsgrenze 2–5 µg *N*-Acetylneuraminsäure) entsteht durch Perjodat-Oxidation von Acylneuraminsäuren β -Formylbrenztraubensäure ($COOH-CO-CH_2-CHO$)^[39], welche mit 2-Thiobarbitursäure zu einem roten Farbstoff kuppelt.

3. Isolierung der Acylneuraminsäuren

Acylneuraminsäuren kommen in der Natur größtenteils nicht frei, sondern in α -glykosidischer, säurelabiler Bindung an Makromoleküle vor (siehe Abschnitt 4). Die Spaltung der glykosidischen Bindung erfolgt entweder besonders schonend durch das im Handel befindliche Enzym Neuraminidase (siehe Abschnitt 7^[40, 32, 41]) oder mit verdünnten Säuren^[21], z.B. mit 0.05–0.1 N H_2SO_4 oder HCl (80°C, 1 Std.^[21, 32, 42, 43]). (Zur Abspaltung von Acylneuramin-

säuren mit leicht verseifbaren *O*-Acetylgruppen müssen die Hydrolysebedingungen noch milder sein: 0.01 N HCl, 70°C, 1 Std.^[40]) Die abgelösten Acylneuraminsäuren werden gegen Wasser ausdialysiert, durch Ionenaustausch-chromatographie gereinigt und auf Cellulosepulver in Butanol/Propanol/Wasser fraktioniert^[40] (vgl. Abb. 4).

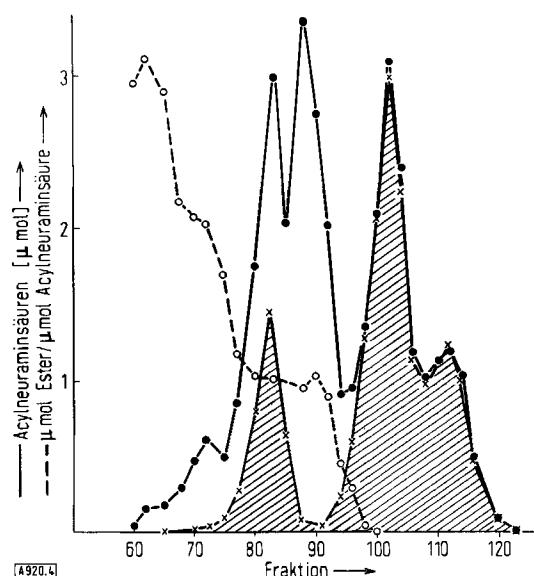


Abb. 4. Säurehydrolytisch aus Rinder-Submaxillarmucin freigesetzte Acylneuraminsäuren. Fraktionierung des Acylneuraminsäure-Gemisches durch Chromatographie auf Cellulose in Butanol/Propanol/Wasser (1 : 2 : 1) [40]. Bestimmen des Acylneuraminsäuregehalts einzelner Fraktionen mit Orcin/Fe³⁺ (●—●) oder mit Perjodsäure/Thiobarbitursäure (×—×). µmol Estergruppen pro µmol Acylneuraminsäuren (○—○). Fraktionen 60—75: *N*-Acetyl-tri-*O*-acetyl- und *N*-Acetyl-di-*O*-acetylneuraminsäuren; 76—85: *N*-Acetyl-8-*O*-acetylneuraminsäure (10); 86—95: *N*-Acetyl-7-*O*-acetylneuraminsäure (9); 96—108: *N*-Acylneuraminsäure (1); 109—123: *N*-Glykoloylneuraminsäure (7). (Nähere Erläuterung siehe Abschnitt 4.)

Die Identifizierung der Acylneuraminsäuren gelingt durch Dünnschicht-(Radio-)Chromatographie auf Kieselgel und Cellulose in mehreren Systemen^[40, 44]. Die Zahl der Estergruppen wird mit Hydroxylamin nach *Hestrin*^[45] und deren Position am Neuraminsäureskelett mit Perjodsäure polarographisch ermittelt^[40]. Die Entwicklung gaschromatographischer Methoden zur quantitativen und qualitativen Analyse der Acylneuraminsäuren macht gute Fortschritte^[46].

Die Isolierung der Neuraminsäure als Neuraminsäure-β-methylglykosid, das als Ausgangsmaterial für die Synthese von Acylneuraminsäuren gebraucht wird (Abschnitt 5), erfolgt in Anlehnung an bekannte Verfahren^[47] auf einfache Weise mit ca. 80% Ausbeute durch Methanolysen (1 N H₂SO₄ in wasserfreiem Methanol) von Acylneuraminsäuren, welche in Glykoproteinen aus Unterkiefer- und Speicheldrüsen des Rindes oder aus Nestern orientalischer Schwäbeln reichlich vorkommen^[25, 48].

4. Natürliche vorkommende Acylneuraminsäuren

Acylneuraminsäuren wurden bisher nur in tierischem Material und in einigen Bakterien, aber niemals in Pflanzen gefunden^[49]. Sie sind als Komponenten von Glykoproteinen und Glykolipiden sowohl bei Wirbellosen als auch

bei Wirbeltieren in Zellen und in Körperflüssigkeiten weit verbreitet^[21, 32] (Abschnitt 8). Freie, nicht glykosidisch gebundene Acylneuraminsäuren können im Gewebe jedoch nur in geringen Mengen nachgewiesen werden^[50, 51]. Die von *Montreuil* et al.^[52] beobachtete Ausscheidung von täglich bis zu 7.2 g freier *N*-Acetylneuraminsäure bei einem dreijährigen Patienten („Sialuria“) ist bisher ein Einzelfall geblieben.

Die Acylneuraminsäuren nehmen im allgemeinen das nicht reduzierende Ende der Heterooligosaccharidketten in Glykoproteinen^[32] und in Gangliosiden^[53] ein und sind dort glykosidisch an Hydroxygruppen der Galaktose, des *N*-Acetylgalaktosamins oder eines zweiten *N*-Acetylneuraminsäuremoleküls gebunden. Als Bindungsarten kommen z. B. *N*-Acetylneuraminsäure(2→3)galaktose^[1]^[54—56] in 3'-Sialylactose und in Gangliosiden, *N*-Acetylneuraminsäure(2→6)-*N*-acetylgalaktosamin^[57] im Submaxillarmucin vom Schaf und *N*-Acetylneuraminsäure(2→8)-*N*-acetylneuraminsäure in Gangliosiden^[58] sowie in der Colominsäure (s. unten)^[59] vor. In allen bisher untersuchten natürlichen Neuraminsäureglykosiden hat die ketosidische Verknüpfung der Acylneuraminsäuren unter der Annahme der Zugehörigkeit der *N*-Acetylneuraminsäure zur D-Serie^[54, 60, 61] α-Konfiguration. Diese Bindung ist – wie in Abschnitt 3 schon erwähnt – säurelabil und enzymatisch leicht angreifbar^[61] (Abb. 5).

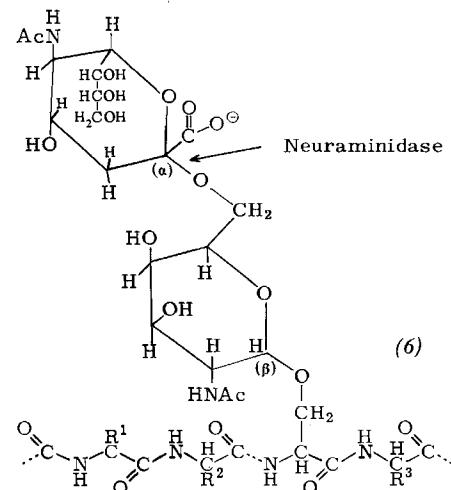


Abb. 5. Ausschnitt aus einem Glykoproteinmolekül (6) des Submaxillarmucins vom Schaf zur Demonstration der α-glykosidischen Bindung der *N*-Acetylneuraminsäure an andere Kohlenhydratreste, hier an C-6 des *N*-Acetylgalaktosamins. Die Disaccharidgruppe ist O-glykosidisch an Hydroxygruppen von Serin- oder Threoninresten der Proteinkette gebunden (aus [32, 57]).

Das am weitesten verbreitete natürliche Derivat der Neuraminsäure ist die *N*-Acetylneuraminsäure (1). Sie kommt als Polymer, Colominsäure genannt, im Kulturfiltrat von *Escherichia coli* K-235^[59] vor. Auch die Acylneuraminsäure-Fraktion aus dem Submaxillarmucin vom Schaf^[81] und aus Glykoproteinen menschlicher Organe sowie Erythrocyten^[6, 7, 62] enthält hauptsächlich *N*-Acetylneur-

[*] Diese Schreibweise bedeutet z. B. eine Verknüpfung der glykosidischen Hydroxygruppe an C-2 der *N*-Acetylneuraminsäure mit der Hydroxygruppe an C-3 der Galaktose.

aminsäure. In vielen tierischen Materialien kommt jedoch ein Gemisch von Acylneuraminsäuren vor. Neben der auffallenderweise nie fehlenden *N*-Acetylneuraminsäure (1) handelt es sich dabei um die *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) (Abb. 6) und um mehrere höher acetylierte Neuraminsäuren wie (8)–(11) (Abb. 7). Die letzteren tragen neben der *N*-Acetylgruppe einen oder mehrere Essigsäurereste esterartig gebunden.

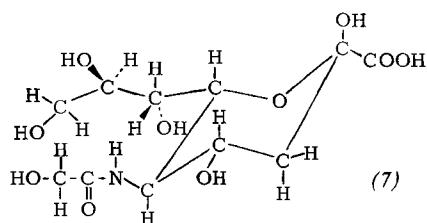


Abb. 6. *N*-Glykoloylneuraminsäure (7).

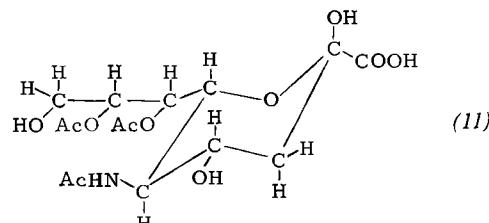
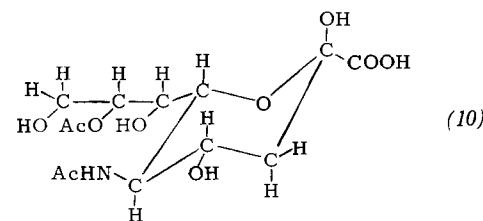
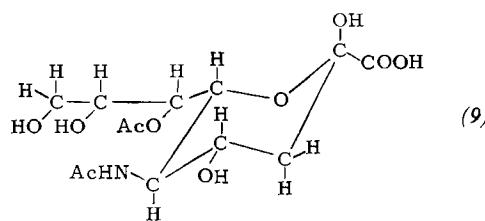
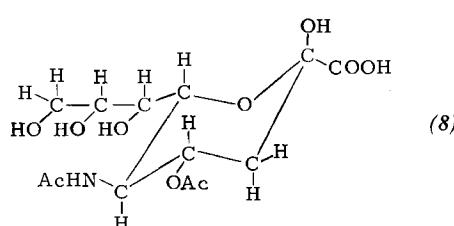


Abb. 7. Strukturformeln einiger *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren: *N*-Acetyl-4-*O*-acetylneuraminsäure (8), *N*-Acetyl-7-*O*-acetylneuraminsäure (9), *N*-Acetyl-8-*O*-acetylneuraminsäure (10) und *N*-Acetyl-7,8-di-*O*-acetylneuraminsäure (11).

Die *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) ist relativ weit verbreitet. Das Organ mit einem besonders hohen Anteil von *N*-Glykoloylneuraminsäure ist die Unterkieferspeicheldrüse vom Schwein, deren Acylneuraminsäuren aus ca. 90% *N*-Glykoloylneuraminsäure bestehen^[43, 50]. Außerdem kommt *N*-Glykoloylneuraminsäure beispielsweise in Rindererythrocyten^[21], in Serumglykoproteinen^[63], im

Submaxillarismucin von Rind und Pferd^[40], in der Haut von Kälberfoeten^[64], in Gangliosiden aus Pferdeerythrocyten^[65] und in Gangliosiden aus dem Gehirn des Huhns^[66] in unterschiedlichen Mengen vor.

Reiche Quellen für *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren sind die Submaxillarismucine von Rind und Pferd, deren Acylneuraminsäure-Fraktion aus 60–70% *O*-acetylierter *N*-Acetylneuraminsäure besteht. Wie Tabelle 1 zeigt, enthalten die Diacetylneuraminsäuren aus dem Submaxillarisglykoprotein des Rindes je eine *O*-Acetylgruppe in den Positionen 7 oder 8 [(9) bzw. (10)]^[8, 40, 67], während die Diacetylneuraminsäure aus dem entsprechenden Glykoprotein vom Pferd an C-4 *O*-acetyliert ist [(8)]^[8, 40]. Die Stellung der beiden *O*-Acetylgruppen der Triacetylneuraminsäure (11) des Rindes ist bekannt (Tabelle 1), dagegen muß die Position der zweiten *O*-Acetylgruppe in der Triacetylneuraminsäure des Pferdes^[40] noch aufgeklärt werden. Eine vierfach acetylierte Neuraminsäure (*N*-Acetyltri-*O*-acetylneuraminsäure^[68]) wurde in geringen Mengen aus dem Submaxillarisglykoprotein des Rindes isoliert. *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren kommen auch in anderen Glykoproteinen animalischen^[69] oder menschlichen Ursprungs^[70] sowie in Oligosacchariden, z. B. *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose^[71] vor. Wiegandt^[72] isolierte aus Gangliosiden des Gehirns mehrerer Knochenfische die *N*-Acetyl-8-*O*-acetylneuraminsäure (10).

Tabelle 1. Zusammensetzung der Acylneuraminsäure-Fraktion der Submaxillarismucine von Rind und Pferd. — bedeutet: nicht nachweisbar (aus [68]).

Acylneuraminsäure	Submaxillarismucin Rind [%]	Submaxillarismucin Pferd [%]
<i>N</i> -Glykoloylneuraminsäure (7)	15	1–2
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure (1)	20–25	15–20
<i>N</i> -Acetyl-4- <i>O</i> -acetylneuraminsäure (8)	—	70–75
<i>N</i> -Acetyl-7- <i>O</i> -acetylneuraminsäure (9)	ca. 25	—
<i>N</i> -Acetyl-8- <i>O</i> -acetylneuraminsäure (10)	ca. 25	—
<i>N</i> -Acetyl-7,8-di- <i>O</i> -acetylneuraminsäure (11)	5–10	—
<i>N</i> -Acetyl-4,7-di- <i>O</i> -acetylneuraminsäure	—	2–5
<i>N</i> -Acetyl-7,8-tri- <i>O</i> -acetylneuraminsäure	ca. 3	—

Die isomeren *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren verhalten sich bei der Perjodsäure/Thiobarbitursäure-Reaktion anders als *N*-Acetylneuraminsäure (1); dagegen besteht bei der Orcin/Fe³⁺-Reaktion kein Unterschied. Während das 4-Isomere (8) mit Perjodsäure/Thiobarbitursäure praktisch die gleiche Farbausbeute wie (1) liefert, beträgt die molare Extinktion des 8-Isomeren (10) nur 47% derjenigen von (1). Das 7-Isomere (9) setzt sich dagegen mit diesem Reagens) überhaupt nicht um (Abb. 4), was bereits Paerels^[39] beschrieb und begründete.

Als beste Methode zur Ermittlung der Position der *O*-Acetylgruppen erweist sich die polarographisch verfolgte Perjodsäure-Oxidation (Abb. 8). Der Schnellverbrauch an Perjodsäure beträgt 2 mol pro mol Acylneuraminsäure, wenn die drei benachbarten Hydroxygruppen an C-7 bis C-9 unbesetzt sind [(1) und (8)]; er beträgt nur 1 mol, wenn die OH-Gruppe an C-7 verestert ist [(9)]. Bei (10)

sind keine vicinalen OH-Gruppen mehr vorhanden, was sich in der besonders langsamen Oxidation durch Perjod-säure äußert^[40].

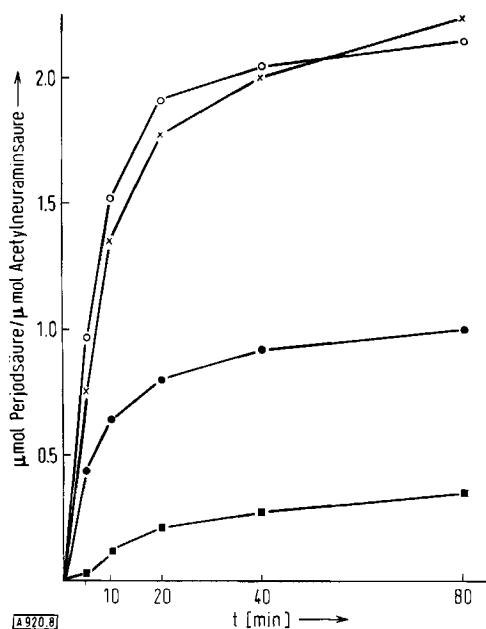


Abb. 8. Ermittlung der Lokalisation von *O*-Acetylgruppen am Neuraminsäurekett mehrerer isomeren *N*-Acetyl-mono-*O*-acetylneuraminsäuren durch polarographische Messung des Perjodsäureverbrauchs bei 0°C [40]. $\times - \times$ *N*-Acetylneuraminsäure (1); $\circ - \circ$ *N*-Acetyl-4-*O*-acetylneuraminsäure (8); $\bullet - \bullet$ *N*-Acetyl-7-*O*-acetylneuraminsäure (9); $\blacksquare - \blacksquare$ *N*-Acetyl-8-*O*-acetylneuraminsäure (10).

Seltenere Acylneuraminsäuren sind die *N*-Glykoloyl-8-*O*-methylneuraminsäure, welche im Seestern *Asterias forbesi* gefunden wurde^[73], sowie die kürzlich in der Eihülle des Seeigels^[44] entdeckte *N*-(*O*-Acetylglykoloyl)-4-methyl-4,9-didesoxyneuraminsäure (vermutliche Struktur). *Hakomori* und *Saito*^[74] beschreiben eine *N*-Glykoloyl-*O*-acetylneuraminsäure in Glykosphingolipiden der Membran von Pferdeerythrocyten, ohne jedoch entscheiden zu können, ob es sich dabei um die *N*-Glykoloyl-4-*O*-acetylneuraminsäure oder um die *N*-(*O*-Acetylglykoloyl)neuraminsäure handelt.

5. Synthetisch gewonnene Acylneuraminsäuren

Die Entwicklung der bereits in Abschnitt 1 beschriebenen Synthese der *N*-Acetylneuraminsäure (1) aus *N*-Acetylglucosamin^[14, 15] bzw. *N*-Acetylmannosamin^[75] und Oxalacetat bot die Möglichkeit, mit verschiedenartig *N*-acyliertem Glucosamin bzw. Mannosamin auch *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) sowie mehrere, nicht in der Natur vorkommende *N*-Acylneuraminsäuren herzustellen (zusammengestellt in Tabelle 2). Durch Verwendung der von *Kuhn* und *Baschang*^[76] eingeführten Derivate der oben angegebenen Kupplungskomponenten (4,6-Benzyliden-*N*-acylglucosamin und Oxalessigsäure-di-tert.-butylester) konnte die Ausbeute an *N*-Acylneuraminsäuren wesentlich gesteigert werden (maximal 34%). Ein neues Verfahren ergibt *N*-Acetyl- und *N*-Glykoloylneuraminsäure sogar mit Ausbeuten von 70–80%^[48, 25]. Es geht von der leicht

darstellbaren Methoxyneuraminsäure (siehe Abschnitt 3) aus, die mit Essigsäureanhydrid, *O*-Carboxy-glykolsäure-anhydrid (1,3-Dioxolan-2,4-dion) oder auch mit Fluoresigsäure- oder Chloressigsäureanhydrid *N*-acyliert wird. Durch anschließende Glykosidspaltung in schwach saurem Medium werden die *N*-Acylneuraminsäuren freigesetzt (Abb. 9, Tabelle 2). Diese Methode eignet sich besonders zur Gewinnung von radioaktiv markierten *N*-[¹⁴C, ³H]-Acyl-neuraminsäuren mit hoher spezifischer Radioaktivität, welche zu biochemischen Studien benötigt werden (Abschnitt 6).

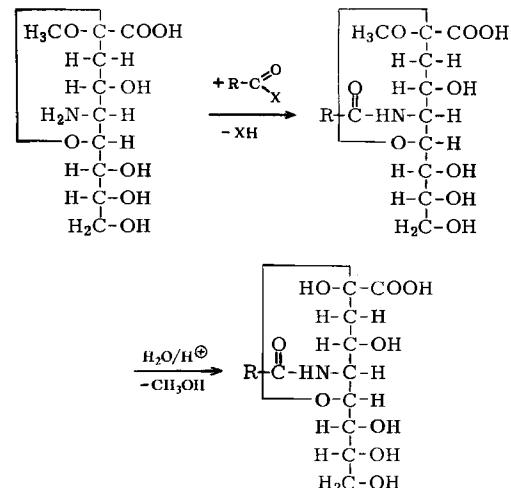


Abb. 9. Synthese von *N*-Acylneuraminsäuren aus Neuraminsäure- β -methylglykosid und Säureanhydriden oder Säurechloriden über *N*-Acylneuraminsäure- β -methylglykoside als Zwischenprodukte.

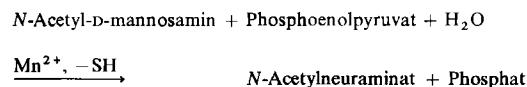
Tabelle 2. Synthetisch gewonnene *N*-Acylneuraminsäuren.

<i>N</i> -Acylneuraminsäure	Lit.
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure (1)	[14, 15, 48, 56, 75]
<i>N</i> -Glykoloylneuraminsäure (7)	[25, 48, 77]
<i>N</i> -Benzylloxycarbonylneuraminsäure	[78, 79]
<i>N</i> -Äthoxycarbonylneuraminsäure	[79]
<i>N</i> -Benzoylneuraminsäure	[79, 80]
<i>N</i> -Propionylneuraminsäure	[80]
<i>N</i> -Butyrylneuraminsäure	[80]
<i>N</i> -Succinylneuraminsäure	[81]
<i>N</i> -Formylneuraminsäure	[81]
<i>N</i> -Chloracetylneuraminsäure	[25]
<i>N</i> -Fluoracetylneuraminsäure	[25]

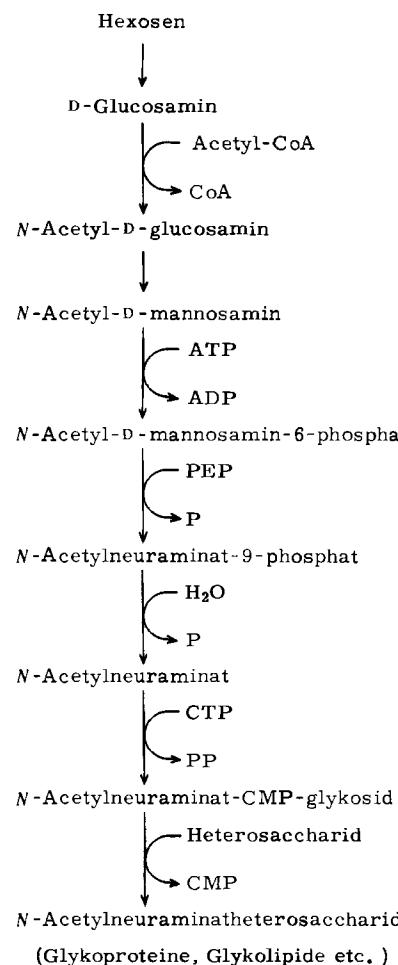
6. Biosynthese der Acylneuraminsäuren

Die erste enzymatische Synthese sowohl von *N*-Acetylneuraminsäure (1) als auch von *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) gelang *Comb* und *Roseman*^[82] aus Pyruvat und *N*-Acetyl-*D*-mannosamin bzw. *N*-Glykoloyl-*D*-mannosamin in guter Ausbeute durch Umkehr der von *Heimer* und *Meyer*^[83] entdeckten, bereits in Abschnitt 1 (Abb. 1) beschriebenen Aldolspaltung der Acylneuraminsäuren durch die Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase. Die biologische Aufgabe dieses in verschiedenen Bakterien und in Säugertierorganen vorkommenden Enzyms besteht jedoch nur im Abbau freier Acylneuraminsäuren (Abschnitt 7) und nicht in deren Biosynthese. Zum Aufbau der *N*-Acetyl-

neuraminsäure benutzen der Bakterien- und der Säugetierorganismus verschiedene Wege. Der einfachere wird z. B. im Bakterium *Neisseria meningitidis*^[84] beschritten, in dem aus *N*-Acetyl-D-mannosamin und Phosphoenolpyruvat in einem Schritt *N*-Acetylneuraminat entsteht:



Im Säugetierorganismus dagegen (siehe Abb. 10) muß vor dieser Kondensation eine Phosphorylierung des Acetylmannosamins durch eine spezifische Kinase erfolgen^[85]. Das dabei entstehende *N*-Acetyl-D-mannosamin-6-phosphat reagiert unter Einfluß der aus mehreren Organen (Leber, Unterkieferspeicheldrüse) angereicherten *N*-Acetylneuraminat-9-phosphat-Synthetase^[86, 87] mit Phosphoenolpyruvat zum *N*-Acetylneuraminat-9-phosphat, das dann durch eine spezifische Phosphatase^[88] in freies *N*-Acetylneuraminat überführt wird. Diesen Reaktionen, die in partikelfreien Homogenaten der Rattenleber^[86], der Colonschleimhaut des Schafes^[89] und der Unterkieferspeicheldrüsen^[51] beobachtet wurden, ist die Biosynthese



A920.10

Abb. 10. Biosynthese der *N*-Acetylneuraminsäure („*N*-Acetylneuramin“) in Säugetiergebenen und glykosidische Bindung der Säure. Abkürzungen: CoA = Coenzym A; ATP (ADP) = Adenosintriphosphat; PEP = Phosphoenolpyruvat; P = anorganisches Phosphat; CTP (CMP) = Cytidintriphosphat; PP = Pyrophosphat. (Schema bis zum *N*-Acetyl-D-mannosamin vereinfacht).

des *N*-Acetylmannosamins aus *N*-Acetylglucosamin durch epimerisierende Enzyme vorgeschaltet^[90, 91]. Das *N*-Acetylglucosamin seinerseits entsteht aus D-Glucosamin und Acetyl-Coenzym A^[92]. Hier werden enge Zusammenhänge zwischen dem Hexose- und dem Neuraminsäure-Stoffwechsel deutlich^[93].

Für die Übertragung der *N*-Acetylneuraminsäure auf Glykoproteine oder Ganglioside ist eine Aktivierung der glykosidischen Hydroxygruppe erforderlich. Das geschieht durch eine säureglykosidische Verknüpfung der *N*-Acetylneuraminsäure mit einem Phosphorsäurerest des Cytidintriphosphats unter Abspaltung von Pyrophosphat (Abb. 10). Die dabei entstehende Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminsäure (12) (Abb. 11) wurde erstmals in *Escherichia coli* gefunden^[94] und später mit Hilfe eines aus Unterkieferspeicheldrüsen des Schweines angereicherten Enzyms synthetisiert^[95]. Sie ist das Substrat für Sialyl-Transferasen, Enzyme, welche die glykosidische Verknüpfung der *N*-Acetylneuraminsäure mit anderen Kohlenhydraten besorgen.

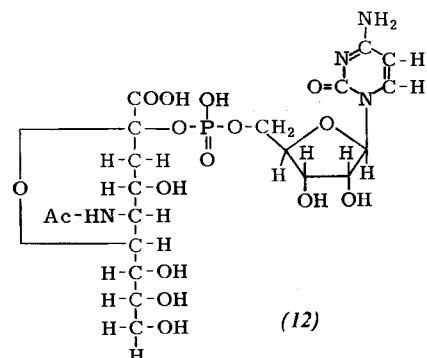


Abb. 11. Strukturformel der Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminsäure (12).

Sialyl-Transferasen aus verschiedenen Organen besitzen eine unterschiedliche Spezifität hinsichtlich des *N*-Acetylneuraminsäure-Acceptors. Während eine Transferase aus Milchdrüsen der Ratte *N*-Acetylneuraminat nur auf endständige β -Galaktopyranosylgruppen von Oligosacchariden, z. B. der Lactose, überträgt^[90], verknüpft eine andere Sialyl-Transferase aus der Schilddrüse des Kalbes *N*-Acetylneuraminat zwar ebenfalls mit Galaktose, aber nur, wenn diese endständig an Glykoproteine oder Glykopptide gebunden ist (Lactose ist in diesem Fall kein Acceptor^[96]). In der Unterkieferspeicheldrüse vom Schaf wird *N*-Acetylneuraminat mit *N*-Acetylgalaktosaminresten des Glykoproteins durch eine andere spezifische Transferase verbunden, welche im Gegensatz zu den oben erwähnten Enzymen ihr Substrat nicht auf Galaktose übertragen kann^[97]. Weitere Beispiele hierfür ließen sich leicht anfügen.

Eine strenge Acceptorspezifität auch für die durch spezifische Transferasen übertragenen Hexosen oder *N*-Acetylhexosamine wird überall bei der Biosynthese der Oligosaccharidketten von Glykoproteinen beobachtet. So kommt es nach den Vorstellungen der Arbeitsgruppe um Eylar^[99, 98] durch die Spezifität jeder Glykosyl-Transferase für den zuvor eingebauten Zuckerrest zu einer charakteristischen

und immer wieder reproduzierbaren Struktur des Oligosaccharidanteils eines bestimmten Glykoproteins. Da aber, wie Gottschalk^[100] annimmt, diese Acceptorspezifität nicht ganz unfehlbar ist, weil der stufenweise Einbau der Zucker nicht wie bei der Proteinsynthese durch einen gen-gesteuerten, Fehler weitgehend ausschließenden Matrizen-Mechanismus erfolgt, können durch den gelegentlichen Einbau von falschen Kohlenhydraten Fehler im Aufbau der Oligosaccharidketten bei einer bestimmten Glykoproteinart entstehen („Mikroheterogenität der Glykoproteine“).

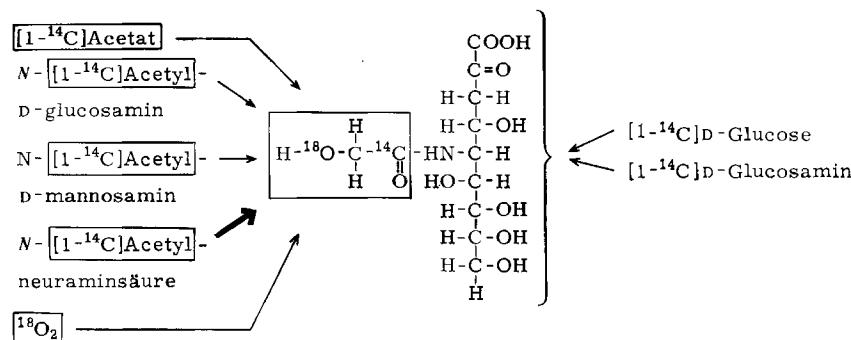


Abb. 12. Biosynthese der *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) durch direkte Oxidation der *N*-Acetylneuraminsäure. Das Angebot von radioaktivem Acetat oder von Vorstufensubstanzen der *N*-Glykoloylneuraminsäure mit *N*-[1-¹⁴C]Acetylgruppen an überlebende Schnitte der Unterkiefer-speicheldrüse vom Schwein führt zur radioaktiven Markierung ausschließlich der *N*-Glykoloylgruppe der Neuraminsäure. Außerdem wird ¹⁸O₂ als Beweis für die Hydroxylierungsreaktion spezifisch in die *N*-Glykoloylgruppe eingebaut. (Im Gegensatz dazu können die ¹⁴C-Atome von Glucosamin oder Glucose nach der Inkubation sowohl in der *N*-Acylgruppe als auch in der 9-C-Kette nachgewiesen werden.)

Im Gegensatz zur *N*-Acetylneuraminsäure (1) gelang die Aufklärung der Biosynthese der *N*-Glykoloylneuraminsäure (7) sowie der *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren erst in den vergangenen vier Jahren. *N*-Glykoloylneuraminsäure entsteht – entsprechend einer zuerst von Mårtensson et al.^[101] ausgesprochenen Vermutung – direkt aus der *N*-Acetylneuraminsäure durch Oxidation^[43, 50, 102, 103]. Durch Inkubation von überlebenden Schnitten der Unterkiefer-speicheldrüse des Schweines mit [1-¹⁴C]Acetat oder mit mehreren *N*-[1-¹⁴C]acetylierten Vorstufen der *N*-Acetylneuraminsäure sowie mit ¹⁸O₂ konnte gezeigt werden, daß die *N*-Glykoloylgruppe der *N*-Glykoloylneuraminsäure direkt aus der *N*-Acetylgruppe durch ein hydroxylierendes Enzym entsteht^[43, 50, 103] (Abb. 12). Diese Hydroxylierungsreaktion benötigt neben Sauerstoff NADPH oder Ascorbat; in Gegenwart dieser Cosubstrate wird in Homogenaten der Unterkiefer-speicheldrüse des Schweines *N*-[1-¹⁴C]Acetylneuraminat in *N*-[1-¹⁴C]Glykoloylneuraminat umgewandelt, und zwar durch ein Enzym, das vorläufig *N*-Acetylneuraminat-, Ascorbat- oder NADPH : O₂-Oxidoreduktase (*N*-Acetyl-hydroxylierend) (E.C. 1.14.1 oder 2) genannt wird^[102].

N-Acetylneuraminsäure fungiert auch als Vorstufe der *N*-Acetyl-(oligo)-*O*-acetylneuraminsäuren^[51, 68]. In Unterkiefer-speicheldrüsen des Rindes werden Acetylgruppen von Acetyl-Coenzym A spezifisch auf die Hydroxygruppen in den Positionen 7 und/oder 8 der *N*-Acetylneuraminsäure übertragen, während in der entsprechenden Pferde-drüse *N*-Acetyl-4-*O*-acetylneuraminsäure entsteht. Die so-

wohl mit überlebenden Gewebsschnitten als auch mit Homogenaten durchgeführten Experimente beweisen die Existenz positionsspezifischer *O*-Acetyl-Transferasen in den beiden Tieren. Sie heißen „*Acetyl-CoA : N*-Acetylneuraminat-7- und/oder -8-*O*-acetyl-Transferase(n)“ (Rind) bzw. „*Acetyl-CoA : N*-Acetylneuraminat-4-*O*-acetyl-Transferase“ (Pferd); (E.C. 2.3.1.?)^[51, 68].

Die *N*-acetylneuraminsäure-hydroxylierenden oder -*O*-acetylierenden Enzyme sind größtenteils an die subzellu-

lären Membranen („Mikrosomen“) des Unterkiefer-speichel-drüsengewebes gebunden^[104, 105]. Sie gehören dort zu einer Gruppe von strukturgebundenen Enzymen, welche für den Aufbau der Oligosaccharidketten des in diesen Drüsen produzierten Glykoproteins verantwortlich ist. Die chemischen Reaktionen dieses „Multienzymkomplexes“ werden am Beispiel der Unterkiefer-speicheldrüse des Rindes erläutert (Abb. 13): Die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarisglykoproteins vom Rind bestehen überwiegend aus Disaccharideinheiten^[106]: *N*-Acetyl-, *N*-Glyko-loyl- oder *N*-Acetyl-(oligo)-*O*-acetylneuraminsäuren (siehe Tabelle 1) sind an *N*-Acetylgalaktosaminresten gebunden, welche über Serin oder Threonin mit der Peptidkette verknüpft sind^[107]. Bei der Biosynthese dieses Glykoproteins (Abb. 13) werden zunächst *N*-Acetylgalaktosaminreste

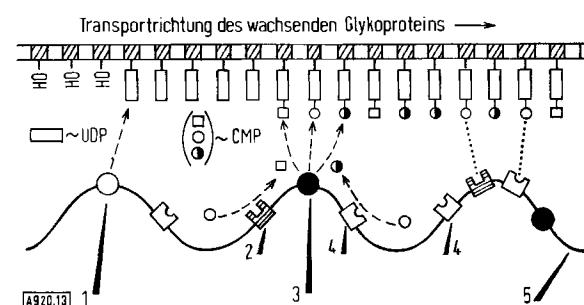


Abb. 13. „Multienzymkomplex“ in den subzellulären Membranen der Unterkiefer-speicheldrüse des Rindes, der für die Biosynthese des Oligosaccharidteils der Glykoproteinmoleküle des Submaxillaris-mucins verantwortlich ist. Das Diskussionsmodell wird im Text erklärt. ○ *N*-Acetyl-, □ *N*-Glykoloyl-, ● *N*-Acetyl-7(8)-mono- und -di-*O*-acetylneuraminsäuren; □ *N*-Acetylgalaktosamin; zz Serin- und Threoninrest der Proteinkette. 1 *N*-Acetylgalaktosamin-Transferase; 2 *N*-Acetylneuraminat-, Ascorbat- oder NADPH: Oxidoreduktase; 3 Sialyl-Transferase(n); 4 *N*-Acetylneuraminat-7(8)-*O*-acetyl-Transferase(n); 5 subzelluläre Membran. (Abkürzungen: CMP = Cytidin-monophosphat; UDP = Uridindiphosphat; NADPH = reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat.)

durch eine spezifische *N*-Acetylgalaktosamin-Transferase^[108] auf Proteinketten übertragen, welche durch

„Kanäle“ des endoplasmatischen Reticulums (isolierbar als eine bei $10000 \times g$ sedimentierbare Fraktion membranartiger Partikeln^[105]) von ihrem ribosomalen Syntheseort herantransportiert werden. Dann erfolgt die Übertragung (als Cytidinmonophosphat-glykoside) der *N*-Acetylneuraminsäure sowie deren – vermutlich an der Membranoberfläche – hydroxylierter oder *O*-acetylierter Derivate auf die *N*-Acetylgalaktosaminreste; für diesen Transfer werden acylneuraminsäure-spezifische Transferasen diskutiert^[50, 51]. Ein Teil der bereits in das Glykoprotein der subzellulären Membranen eingebauten *N*-Acetylneuraminsäure-Moleküle wird erst jetzt, wie Versuche mit *N*-[1-¹⁴C]-acetylneuraminsäure-markierten Mikrosomen gezeigt haben, durch die Hydroxylase bzw. *O*-Acetyltransferase modifiziert^[104, 105, 109]. Nach der Inkorporation der Acylneuraminsäuren wird das fertige Glykoprotein von den Membranen abgelöst, im Cytosol gespeichert^[51, 109] und bei Bedarf von der Speicheldrüse nach außen in hochviskoser Lösung abgegeben.

Bei der geschilderten Biosynthese des Submaxillaris-Glykoproteins vom Rind ist ein Mechanismus sichtbar geworden, der bei der Biosynthese von Glykoproteinen allgemeine Gültigkeit zu haben scheint: Nach Fertigstellen des Proteinanteils der Glykoproteine beginnt bereits an den Ribosomen (im Bereich der „rauen Mikrosomen“) die Anlagerung der ersten Zucker zur Bildung einer Oligosaccharidkette^[110]. Nach Ablösung von den Ribosomen wandert die Proteinkette zum „glatte Mikrosomen“ genannten Bereich des endoplasmatischen Reticulums, wo die Oligosaccharidkette durch Übertragung von Hexosen oder von deren Derivaten weiter aufgebaut und durch Anfügen von Acylneuraminsäuren oder auch von Fucose fertiggestellt wird^[98, 100, 111–115]. Die für den Aufbau des Oligosaccharidteiles des Glykoproteins verantwortlichen spezifischen Glykosyl-Transferasen sind vermutlich Teile eines Multienzymkomplexes^[99], welcher sich in den glatten Mikrosomen oder auch im Golgi-Apparat^[116] befindet.

7. Enzymatischer Abbau der Acylneuraminsäuren

Die meisten Acylneuraminsäuren lassen sich durch ein von Gottschalk^[117] „Neuraminidase“ genanntes Enzym (E.C.3.2.1.18; vorgeschlagener systematischer Name^[118]: „Acylneuraminid-Acylneuraminosyl-Hydrolase“) leicht aus ihrer α -ketosidischen (siehe Abschnitt 4) Bindung an Glykoproteine oder Ganglioside lösen. Damit wird der Abbau der Glykoproteine bzw. der Ganglioside eingeleitet. Neuraminidase ist in Lysosomen von Wirbeltierorganen^[119–121] sowie in Bakterien^[122] weit verbreitet und kann aus Kulturfiltraten von *Vibrio cholerae*^[123] oder *Clostridium perfringens*^[124] isoliert und kristallisiert werden^[41, 125]. Neuraminidasen kommen auch in manchen Virusarten („Myxoviren“), so auch in Influenzaviren, vor^[126].

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkungsspezifität der Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* haben gezeigt, daß die Natur des glykosidischen Bindungspartners der Neuraminsäure einen weit geringeren Einfluß auf die enzymatische Spaltbarkeit von Acylneuraminsäureglykosiden hat als die Größe des Stickstoffsubstituenten der Neur-

aminsäure oder als chemische Veränderungen an der Neuraminsäure in der Nähe der Glykosidbindung. Während synthetische Glykoside der *N*-Propionyl- und *N*-Glycoloylneuraminsäure bereits schwerer durch Neuraminidase spaltbar sind als die der *N*-Acetylneuraminsäure, können die entsprechenden Glykoside der *N*-Benzylloxycarbonyl- oder *N*-Butyrylneuraminsäure durch Neuraminidase nicht hydrolysiert werden^[127–129]. Die Veresterung der Carboxylgruppe der Neuraminsäure blockiert die Wirkung der Neuraminidase vollständig^[130], ebenso eine Peracetylierung des Moleküls^[127]. Eine partielle *O*-Acetylierung der *N*-Acetylneuraminsäure in den Positionen 7 oder 8, wie z.B. bei den Diacetylneuraminsäuren des Submaxillaris-Glykoproteins vom Rind, vermindert – erkennbar daran, daß die Michaelis-Konstante größer als bei *N*-Acetylneuraminsäure ist (Tabelle 3) – die Geschwindigkeit der hydrolytischen Freisetzung dieser Acylneuraminsäuren durch Neuraminidase^[40]. Eine Veresterung der Hydroxygruppe an C-4 der *N*-Acetylneuraminsäure mit Essigsäure hebt sogar die Wirkung der Neuraminidase auf die glykosidische Bindung völlig auf (Tabelle 3^[40]). Die biologische Bedeutung der Resistenz der *N*-Acetyl-4-*O*-acetylneuraminsäure gegenüber Neuraminidase dürfte in einem Schutz der Glykoproteinmoleküle, welche diese Acylneuraminsäure enthalten, vor dem Angriff durch Neuraminidase und damit auch vor dem weiteren Abbau durch andere Glykosidasen bestehen.

Die aus ihrer glykosidischen Bindung gelösten Acylneuraminsäuren werden durch eine Aldolase, die Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase^[131] (E.C. 4.1.3.3), abgebaut. Dabei entstehen in reversiblen Reaktionen Brenztraubensäure und Acylmannosamine, wie bereits in Abbildung 1 am Beispiel der *N*-Acetylneuraminsäure gezeigt wurde^[132]. *O*-Acetylgruppen haben auch auf diese Spaltungsreaktion teilweise eine starke Wirkung. Wie aus den K_M -Werten der Tabelle 3 hervorgeht, beeinflußt eine *O*-Acetylgruppe in

Tabelle 3. Einfluß von *O*-Acetylgruppen am Neuraminsäureskelett bei *N*-Acetyl-mono-*O*-acetylneuraminsäureglykosiden auf die Michaelis-Konstanten der Acylneuraminid-Acylneuraminosyl-Hydrolase („Neuraminidase“) [40] und der Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase („Neuraminsäure-Aldolase“) [131].

getestete Acylneuraminsäure	Michaelis-Konstanten (K_M)	
	[mmol/l] Neuraminsäure- Aldolase	[a] Neuraminidase
<i>N</i> -Acetylneuraminat	1.85	2.5
<i>N</i> -Acetyl-8- <i>O</i> -acetylneuraminat	2.00	16.0
<i>N</i> -Acetyl-7- <i>O</i> -acetylneuraminat	4.55	
<i>N</i> -Acetyl-4- <i>O</i> -acetylneuraminat	12.50	∞

[a] Als Bindungspartner dienten Glykoproteine der Submaxillarisdrüse des Rindes oder Pferdes.

Position 8 die Enzymaktivität nur unbedeutend, während sie in Position 7 die Spaltgeschwindigkeit um ca. 40% und in Position 4 sogar um ca. 80% senkt. Es gibt bis jetzt noch keine experimentellen Hinweise, welche Rolle die (unbesetzte) Hydroxygruppe an C-4 der Neuraminsäure bei der enzymatischen Katalyse sowohl der Aldolase als auch der Neuraminidase spielt.

Die beschriebenen Untersuchungen wurden mit Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase aus *Clostridium perfringens*

durchgeführt^[131]. Das Enzym ist wie die Neuraminidase weit verbreitet; es wurde sowohl in mehreren Bakterien nachgewiesen als auch aus Säugetierorganen isoliert (Literaturzitate befinden sich in^[131, 133, 134]).

Bei der Katalyse der Aldolase aus *Cl. perfringens* wurde die Teilnahme von Lysinresten unter intermediärer Bildung von Schiffschen Basen zwischen Enzym- und Substratmolekülen sowie von Histidinresten nachgewiesen^[134].

8. Biologische Funktionen der Acylneuraminsäuren

Die weite Verbreitung der Acylneuraminsäuren legt die Vermutung nahe, daß ihnen eine große biologische Bedeutung zukommt. In den letzten Jahren sind in der Tat eine Reihe von lebenswichtigen Vorgängen gefunden worden, bei denen Acylneuraminsäuren eine entscheidende Rolle spielen. Einige Beispiele, geordnet nach Funktionsgruppen, sollen hier gebracht werden (Übersichten siehe^[135]).

8.1. Erhöhung der Viskosität von Glykoproteinen in wässriger Lösung („Schleime“)

An Glykoproteine gebundene Acylneuraminsäuren sind für die hohe Viskosität von schleimigen Sekretionen der Atemwege, des Verdauungskanals, des Urogenitaltrakts und der Augenhöhle mitverantwortlich. Ihre Carboxygruppen sind wegen des niedrigen pK-Wertes (siehe Abschnitt 2) bei physiologischen pH-Werten (ca. 7.4) weitgehend dissoziiert, so daß die fadenförmigen Glykoproteinmoleküle durch den reichen Besatz mit negativ geladenen, einander abstoßenden Acylneuraminsäure-Resten gestreckt werden. Die Folge davon und des sehr hohen Molekulargewichts (bis zu mehreren Millionen) ist eine hohe Viskosität von wässrigen Lösungen dieser neuraminsäurereichen Glykoproteine, wie sie z. B. als Schleimhautsekretionen vorkommen^[136].

Die schleimigen Glykoproteinlösungen sind lebensnotwendig^[135]: Sie dienen als Schmiermittel für die Drehbewegungen des Augapfels und schützen die Hornhaut vor dem Austrocknen und vor Verletzungen durch Staubkörner etc. In der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt hüllen sie Nahrungsstoffe ein, machen sie dadurch gleitfähig und schützen die zarten Schleimhäute vor mechanischen und chemischen (Magensäure, Verdauungsenzyme etc.) Beschädigungen. Auf diese Weise wirkt die Neuraminsäure der Entstehung von Magengeschwüren entgegen. Die ständig nach außen transportierte Schleimschicht auf dem Epithel der Atemwege feuchtet die Atemluft an, fängt Bakterien und andere z. T. ätzende Luftverunreinigungen ab und hält auf diese Weise die Lungen steril. In ähnlicher Weise werden durch einen hochviskosen Schleimfropf im Halskanal der Gebärmutter Bakterien von der Uterushöhle und damit von der Bauchhöhle ferngehalten. Diese Viskositätsbarriere wird nur zum Zeitpunkt der Ovulation für den Einlaß von Spermien erniedrigt. Von Schleimdrüsen der Vagina sezernierte neuraminsäurereiche Glykoproteine sind für die Fortpflanzung insofern bedeutsam, als sie sowohl den Coitus als auch den Geburtsvorgang erleichtern^[135].

8.2. Weitere Funktionen bei der Fortpflanzung

Neuraminsäure ist auch bei der Ausbildung eines eine Befruchtung garantierenden Spermoreservoirs in der Vagina des Schweines direkt beteiligt: Im Ejakulat des Ebers kommt ein 25% N-Acetylneuraminsäure enthaltendes, hochmolekulares, saures Glykoprotein vor (isoelektrischer Punkt: pH = 1.1), das mit einem basischen Protein zu einem Netzwerk verklumpt, aus dem Spermien über längere Zeit abgegeben werden^[137]. Neuraminsäurereiche Glykoproteine, „Fertilisin“ genannt, sind in der Hülle von ins Wasser abgegebenen Eiern mancher Tiere, z. B. von Seeigeln^[138], enthalten, und binden spezifisch Spermatozoen. Hierbei spielt Neuraminsäure eine entscheidende Rolle und ermöglicht eine sichere Befruchtung. Auch als Bestandteil der Zona pellucida der Eizelle von Säugetieren scheint Neuraminsäure für den Befruchtungsvorgang unentbehrlich zu sein: Nach enzymatischem Abspalten der Acylneuraminsäure verliert die Eizelle vom Kaninchen ihre Elastizität, und Spermatozoen können nicht mehr in sie eindringen^[139].

8.3. Bindung und Transport von Molekülen und Viren

Einige Virusarten können sich an Zellen mit Hilfe membrangebundener Acylneuraminsäuren anlagern: Rote Blutkörperchen werden durch Myxoviren^[140], zu denen auch einige für Tiere oder Menschen pathogene Arten, z. B. Influenza-Viren, gehören, zusammengeballt^[141, 142]. Ursache dieser „Hämagglytination“ sind die Neuraminidase, das einzige Enzym dieser Viren, sowie vermutlich noch ein zweites spezifisches Virusprotein, das Hämagglytinin^[142], welche aufgrund einer hohen Affinität zur Neuraminsäure die Adsorption der Viren an die Erythrocyten und damit deren Agglutination ermöglichen. Mit Neuraminidase behandelte Erythrocyten zeigen dieses Phänomen nicht mehr. (In menschlichen Erythrocytenmembranen ist ein Teil der als Virusrezeptor dienenden N-Acetylneuraminsäure Bestandteil von M- und N-Blutgruppensubstanzen^[143].) Es wird diskutiert^[142, 144], daß die zellständige Neuraminsäure bei der Infektion der Zellen mit Myxoviren eine allerdings noch nicht ganz verstandene Rolle spielt.

An der Oberfläche von Zellen gebundene Acylneuraminsäuren sind am Kaliumtransport durch Zellmembranen beteiligt^[145] und dienen in der glatten Muskulatur als Rezeptoren für die erregende Substanz Serotonin^[146]. Plasmapexin, ein Neuraminosyl-Glykoprotein des Blutplasmas, bindet die Base Histamin^[147].

8.4. Einflüsse auf Oberflächenladung, Aggregation und Form von Zellen

Negativ geladene Acylneuraminsäuren verleihen Zellhüllen aufgrund ihrer gegenseitigen Abstoßungskräfte eine gewisse Festigkeit^[148] und beeinflussen den Zusammenhalt von Zellen im Organverband. Während Neuraminsäure die Aggregation von embryonalen Muskelzellen des Huhnes ermöglicht, vermutlich über Ca^{2+} -Brücken^[149], ver-

hindert sie eine spontane Zusammenlagerung von Blutplättchen^[150, 151] und wirkt dadurch einer unerwünschten Entstehung von Blutgerinnseln entgegen.

8.5. Schutz von Makromolekülen vor proteolytischem Angriff

N-Acetylneuraminsäure schützt den „Intrinsic Factor“, ein Neuraminsäureglykoprotein, das von der Magenschleimhaut sezerniert wird, vor der Einwirkung proteolytischer Enzyme. Der Intrinsic Factor bindet mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin B₁₂ und ermöglicht in den unteren Darmabschnitten dessen Resorption. Wie *Faillard* und *Pribilla* gezeigt haben, bleibt nach Ablösen der Neuraminsäure zwar die Fähigkeit des Intrinsic Factor zur Bindung des Vitamins B₁₂ erhalten, aber die Resorption des Vitamins aus dem Darmlumen ist nicht mehr möglich^[152, 153]. Die Ursache für diesen Verlust der biologischen Funktion im Darm ist eine – auch im Reagensglas leicht demonstrierbare – Zerstörung des neuraminsäurefreien Intrinsic Factor durch proteolytische Enzyme auf dem Wege zur Resorptionsstätte des Vitamins B₁₂. Wahrscheinlich bewahrt *N*-Acetylneuraminsäure den Intrinsic Factor allein aufgrund ihrer relativ stark sauren Carboxygruppe vor der proteolytischen Zerstörung, da ein Ersatz der *N*-Acetylneuraminsäure durch Polyacrylsäurevinylpyrrolidin, ebenfalls eine starke Säure, den raschen Abbau des neuraminsäurefreien Intrinsic Factor durch Trypsin verhindert.

Freie *N*-Acetyl- und *N*-Glykoloylneuraminsäure wirken hemmend auf das fibrinolytische Enzym Plasmin ein und verzögern dadurch die Auflösung von Fibrin und eine gefährliche Loslösung von Blutgerinnseln^[154].

8.6. Regulation des „normalen“ Verhaltens und der Lebenszeit von Zellen und Makromolekülen

Die Geschwindigkeit des invasiven Wachstums von Krebsgewebe scheint auch vom Neuraminsäuregehalt der Zelloberfläche beeinflußt zu werden: Durch Abspalten der Neuraminsäure wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Mäuse-Tumorzellen in Gewebekulturen wesentlich vermindert^[155]. An der Zellmembran gebundene Neuraminsäure schützt Erythrocyten vor rascher Phagocytose durch Makrophagen^[156]. Vor einem ähnlichen Schicksal bewahrt *N*-Acetylneuraminsäure im Blutplasma vorkommende Makromoleküle wie α_1 -Glykoprotein, Coeruloplasmin, Haptoglobin, Lactoferrin, menschliches Choriongonadotropin, Follikel-stimulierendes Hormon etc. Diese Glykoproteine, welche wichtige biologische Funktionen ausüben, werden nach dem Verlust der Acylneuraminsäure durch Leberparenchymzellen rasch aus der Blutbahn entfernt^[157]. Die erwähnten Glykoproteine werden nach Abspalten der Acylneuraminsäure von Plasmamembranen der Leberzellen adsorbiert^[158] und wahrscheinlich auf diese Weise dem Blutstrom entzogen. Diese Bindung ist jedoch nur möglich, solange die Plasmamembranen selbst Acylneuraminsäuren enthalten.

Daß der Neuraminsäure auch im Erythropoietin, welches die Bildung von roten Blutkörperchen im Knochenmark stimuliert, eine ähnliche Wirkung im Blutkreislauf zu-

kommt, darf vermutet werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß *N*-Acetylneuraminsäure am Erythropoietin gebunden bleiben muß, wenn es nach Injektion in den Blutkreislauf am Ganztier seine biologische Wirkung entfalten soll^[159]; für eine Wirkung des Hormons in Knochenmark-Zellkulturen ist dagegen keine *N*-Acetylneuraminsäure erforderlich^[160].

Neuraminsäure an der Oberfläche von Lymphozyten reguliert die normale Verteilung dieser Zellen im Körper auf eine allerdings noch nicht bekannte Weise. Nach Verlust der Neuraminsäure werden die Zellen nicht wie normalerweise in den Lymphknoten oder in der Milz, sondern in der Leber angereichert^[161].

8.7. Maskierung zellulärer Antigene

Von großer biologischer Tragweite dürfte die Beobachtung sein, daß Acylneuraminsäuren der Zellmembranen die immunochemischen Reaktionen von gesunden sowie von carcinomatös entarteten Zellen vermindern^[162, 163]. Ein Foetus in der Gebärmutterhöhle beispielsweise ist – immunologisch gesehen – ein Fremdkörper (ein „Transplantat“) für die Mutter, da die Zusammensetzung seiner Proteine auch vom Vater bestimmt ist. Eine histochemisch nachweisbare Glykoproteinschicht an der Oberfläche von Trophoblastzellen, der Grenzzone zwischen Mutter und Kind, stellt vielleicht eine ImmunobARRIERE zwischen beiden Organismen dar, welche die Entstehung von mütterlichen Antikörpern gegen das Kind verhindert. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, daß erst nach enzymatischem Abspalten der Acylneuraminsäure von der Oberfläche von Mäuse-Trophoblastzellen von der mütterlichen Maus Antikörper gegen diese Zellen gebildet werden können. Als Folge davon wird kindliches Gewebe (geprüft mit Hauttransplantaten) vom mütterlichen Organismus nicht mehr toleriert, sondern abgestoßen^[164].

Werden methylcholanthren-induzierte Sarkomzellen von Mäusen mit Neuraminidase behandelt und dann erbgleichen Mäusen injiziert, so entstehen Antikörper, welche die Entwicklung massiver Tumoren verhindern (ohne diese Neuraminsäure-Abspaltung entstehen mit Sicherheit tödliche Geschwülste^[165]). Ähnliche Beobachtungen wurden mit Leukämiezellen^[166] sowie mit Landschütz-Ascites-Tumor-Zellen^[167] bei Mäusen gemacht. Ob dieses Phänomen für eine Krebstherapie beim Menschen ausgenutzt werden kann, ist noch Gegenstand von Spekulationen.

Während manche der hier geschilderten Wirkungen der Acylneuraminsäuren, z.B. die Viskositätserhöhung, die Bindung von Basen und zum Teil auch der Schutz vor Proteasen durch ihre physikalischen Eigenschaften, insbesondere die negative Ladung, erklärt werden können, gibt es für viele andere, hier erwähnte biologische Effekte der Acylneuraminsäuren noch keine befriedigenden Deutungen.

Es ist noch unbekannt, warum so viele Enzyme Acylneuraminosyl-Glykoproteine sind^[32, 168]. Es fällt auf, daß vor allem Hydrolasen, z.B. Phosphatasen aus Lysosomen von Säugetieren, Neuraminsäure besitzen, welche den Enzymmolekülen Elektronegativität verleiht. (Daher än-

dert sich nach Abspalten der Neuraminsäure die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Enzyme erheblich^[169, 170].) Der beobachtete erhöhte Widerstand dieser Enzyme gegenüber proteolytischer Zersetzung wird – in Analogie zum Intrinsic Factor – mit dem Besitz von Acylneuraminsäureresten in Zusammenhang gebracht^[170]. Abgesehen von der sauren Phosphatase aus der menschlichen Prostata, bei der ein Verlust der Neuraminsäure sowohl das pH-Optimum der Enzymaktivität als auch die Affinität zum Substrat leicht erhöht^[171], wurden bisher keine Einflüsse der gebundenen Acylneuraminsäuren auf die Enzymaktivität gefunden.

Erst im Stadium der Spekulation befindet sich auch die Rolle der Acylneuraminsäuren wie auch die der übrigen Kohlenhydratkomponenten bei vielen anderen biologisch wichtigen Glykoproteinen^[135]: Immunoglobuline, Basalmembranen (diese haben Stützfunktionen für Zellen im Organverband oder Filtrationsaufgaben wie in den Glomeruli der Niere^[172], Glykoproteine und Ganglioside des Nervengewebes (diese sind überwiegend an partikulären Elementen wie Mikrosomen und Synaptosomen lokalisiert und vielleicht an der Erregungsleitung oder sogar an der Gedächtnisleistung des Gehirns beteiligt^[173, 174]), metallionen-bindende Glykoproteine des Blutes und des Knochengewebes, hormon-transportierende Makromoleküle und Proteaseninhibitoren des Blutplasmas, Komponenten des Blutgerinnungssystems usw.

Es gibt wohl keinen Zweifel daran, daß es sich lohnen wird, die Aufklärung aller Funktionen der *N*-Acetyl-, *N*-Glycoloyl- sowie der *N*-Acetyl-*O*-acetylneuraminsäuren, welche Bauelemente von Molekülen sehr verschiedenartiger Herkunft und mit so unterschiedlichen biologischen Aufgaben sind, voranzutreiben. Dasselbe gilt auch für die Struktur und Funktion der Kohlenhydratbindungspartner der Acylneuraminsäuren in den genannten Molekülen.

Der in diesem Aufsatz zitierte eigene Anteil an Untersuchungen über die Biochemie von Acylneuraminsäuren wurde in den Laboratorien von Herrn Prof. Dr. H. Faillard durchgeführt, dem ich für die stets fördernde Anteilnahme an meinen Experimenten sehr danke. Für wertvolle Zusammenarbeit danke ich auch Herrn Dr. F. Wirtz-Peitz. Besonderer Dank gebürt Frau Margret Wember für die ausgezeichnete technische Assistenz. Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie finanziell unterstützt.

Eingegangen am 28. Oktober 1971 [A 920]

- [1] E. Walz, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 166, 210 (1927).
- [2] P. A. Levene u. K. Landsteiner, J. Biol. Chem. 75, 687 (1927).
- [3] G. Blix, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 240, 43 (1936).
- [4] E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 268, 50 (1941).
- [5] E. Klenk, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 273, 77 (1942).
- [6] E. Klenk u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 298, 230 (1954).
- [7] E. Klenk, H. Faillard u. H. Lempfrid, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 301, 235 (1955).
- [8] G. Blix, E. Lindberg, L. Odin u. I. Werner, Acta Soc. Med. Upsal. 61, 1 (1956).
- [9] E. Klenk u. G. Uhlenbrück, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 307, 266 (1957).
- [10] G. Blix u. E. Lindberg, Acta Chem. Scand. 14, 1809 (1960).
- [11] G. Blix, A. Gottschalk u. E. Klenk, Nature 179, 1088 (1957).
- [12] E. Klenk, H. Faillard, F. Weygand u. H. H. Schöne, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 304, 35 (1956).
- [13] A. Gottschalk, Nature 176, 881 (1955).
- [14] J. W. Cornforth, M. E. Daines u. A. Gottschalk, Proc. Chem. Soc. (London) 1957, 25.
- [15] J. W. Cornforth, M. E. Firth u. A. Gottschalk, Biochem. J. 68, 57 (1958).
- [16] D. G. Comb u. S. Roseman, J. Amer. Chem. Soc. 80, 497 (1958).
- [17] R. Kuhn u. R. Brossmer, Liebigs Ann. Chem. 616, 221 (1958).
- [18] S. Roseman u. D. G. Comb, J. Amer. Chem. Soc. 80, 3166 (1958).
- [19] R. Kuhn u. R. Brossmer, Angew. Chem. 74, 252 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 218 (1962).
- [20] R. Kuhn u. G. Baschang, Chem. Ber. 95, 2384 (1962).
- [21] A. Gottschalk: The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances. Cambridge University Press, London 1960.
- [22] P. Lutz, W. Lochinger u. G. Taigel, Chem. Ber. 101, 1089 (1968).
- [23] A. Biedl, Naturwissenschaften 58, 95 (1971).
- [24] W. Gielen, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 348, 329 (1967).
- [25] R. Schauer, F. Wirtz-Peitz u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 359 (1970).
- [26] L. Svennerholm, Acta Soc. Med. Upsal. 61, 75 (1956).
- [27] B. M. Scheinthal u. F. A. Bettelheim, Carbohyd. Res. 6, 257 (1968).
- [28] R. Kuhn u. R. Brossmer, Chem. Ber. 89, 2471 (1956).
- [29] F. Zilliken u. M. C. Glick, Naturwissenschaften 43, 536 (1956).
- [30] A. Gottschalk, Biochem. J. 61, 298 (1955).
- [31] J. D. Karkas u. E. Chargaff, J. Biol. Chem. 239, 949 (1964).
- [32] A. Gottschalk: Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function. 2. Aufl., Elsevier, 1972.
- [33] A. Gottschalk, Rev. Pure Appl. Chem. 12, 46 (1962).
- [34] L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta 24, 604 (1957).
- [35] P. Böhm, St. Dauher u. L. Baumeister, Klin. Wochenschr. 32, 289 (1954).
- [36] F. Wirtz-Peitz, Dissertation, Universität Bochum 1969.
- [37] L. Warren, J. Biol. Chem. 234, 197 (1959).
- [38] D. Aminoff, Biochem. J. 81, 384 (1961).
- [39] G. B. Paerels u. J. Schut, Biochem. J. 96, 787 (1965).
- [40] R. Schauer u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 961 (1968).
- [41] G. Schramm u. E. Mohr, Nature 183, 1677 (1959).
- [42] H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 317, 257 (1959).
- [43] R. Schauer, H. J. Schoop u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 645 (1968).
- [44] K. Hotta u. M. Kurokawa, J. Biol. Chem. 245, 6307 (1970).
- [45] S. Hestrin, J. Biol. Chem. 180, 249 (1949).
- [46] R. K. Yu u. R. W. Ledeen, J. Lipid Res. 11, 506 (1970).
- [47] F. Weygand u. H. Rinno, Z. Physiol. Chem. 306, 173 (1957).
- [48] F. Wirtz-Peitz, R. Schauer u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 111 (1969).
- [49] W. Gielen, Z. Naturforsch. 23b, 1598 (1968).
- [50] H. J. Schoop, R. Schauer u. H. Faillard, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 155 (1969).
- [51] R. Schauer, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 749 (1970).
- [52] J. Montreuil, G. Biserte, G. Strecker, G. Spik, G. Fontaine u. J.-P. Farriaux, Clin. Chim. Acta 21, 61 (1968).
- [53] H. Wiegandt, Angew. Chem. 80, 89 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 87 (1968).
- [54] R. Kuhn u. R. Brossmer, Angew. Chem. 70, 25 (1958).
- [55] E. Klenk u. W. Kunau, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 335, 275 (1964).
- [56] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Chem. Ber. 96, 866 (1963).
- [57] E. R. B. Graham u. A. Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta 38, 513 (1960).
- [58] R. Kuhn u. H. Wiegandt, Z. Naturforsch. 18b, 541 (1963).
- [59] G. T. Barry u. W. F. Goebel, Nature 179, 206 (1957).
- [60] A. Gottschalk, Advan. Enzymol. 20, 135 (1958).
- [61] R. K. Yu u. R. W. Ledeen, J. Biol. Chem. 244, 1306 (1969).
- [62] A. Carrion, R. Bourrillon u. J. A. Cabezas, Clin. Chim. Acta 25, 351 (1969).
- [63] E. Mårtensson, A. Raal u. L. Svennerholm, Acta Chem. Scand. 11, 1604 (1957).

- [64] R. Bourrillon u. R. Got, *Biochim. Biophys. Acta* 58, 63 (1962).
- [65] T. Yamakawa u. S. Suzuki, *J. Biochem. (Tokyo)* 38, 199 (1951).
- [66] B. Kaufman, S. Basu u. S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 243, 5804 (1968).
- [67] G. Blix u. E. Lindberg, *Acta Chem. Scand.* 14, 1809 (1960).
- [68] R. Schauer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 595 (1970).
- [69] J. A. Cabezas, M. D. Frois u. J. Vázquez-Porto, *Rev. Espan. Fisiol.* 24, 133 (1968).
- [70] J. A. Cabezas u. M. Ramos, 6. FEBS-Meeting, Madrid 1969, Abstract No. 810.
- [71] R. Kuhn u. R. Brossmer, *Angew. Chem.* 68, 211 (1956).
- [72] I. Ishizuka, M. Kloppenburg u. H. Wiegandt, *Biochim. Biophys. Acta* 210, 299 (1970).
- [73] L. Warren, *Biochem. Biophys. Acta* 83, 129 (1964).
- [74] S. Hakomori u. T. Saito, *Biochemistry* 8, 5082 (1969).
- [75] P. M. Carroll u. J. W. Cornforth, *Biochim. Biophys. Acta* 39, 161 (1960).
- [76] R. Kuhn u. G. Baschang, *Liebigs Ann. Chem.* 659, 156 (1962).
- [77] H. Faillard u. M. Blohm, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 341, 167 (1965).
- [78] W. Gielen, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 348, 329 (1967).
- [79] W. Wesemann u. F. Zilliken, *Liebigs Ann. Chem.* 695, 209 (1966).
- [80] P. Meindl u. H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* 97, 1628 (1966).
- [81] R. Brossmer u. E. Nebelin, *FEBS-Lett.* 4, 335 (1969).
- [82] D. G. Comb u. S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 235, 2529 (1960).
- [83] R. Heimer u. K. Meyer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 42, 728 (1956).
- [84] L. Warren, R. S. Blacklow u. C. W. Spearing, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 106, 191 (1963).
- [85] L. Warren u. H. Felsenfeld, *J. Biol. Chem.* 237, 1421 (1962).
- [86] L. Warren u. H. Felsenfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 232 (1961); 5, 185 (1961).
- [87] S. Roseman, G. W. Jourdian, D. Watson u. R. Rood, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 958 (1961).
- [88] G. W. Jourdian, A. L. Swanson, D. Watson u. S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 239, 8 (1964).
- [89] P. W. Kent u. P. Draper, *Biochem. J.* 106, 293 (1968).
- [90] G. W. Jourdian u. S. Roseman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 106, 202 (1963).
- [91] S. Ghosh u. S. Roseman, *Fed. Proc.* 21, 89 (1962).
- [92] T. C. Chou u. M. Soodak, *J. Biol. Chem.* 196, 105 (1952).
- [93] S. Roseman, VIth Int. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. VI, S. 5.
- [94] D. G. Comb, F. Shimizu u. S. Roseman, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 5513 (1959).
- [95] S. Roseman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 437 (1962).
- [96] M. J. Spiro u. R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* 243, 6520 (1968).
- [97] D. M. Carlson, E. J. McGuire, G. W. Jourdian u. S. Roseman, *Fed. Proc.* 23, 380 (1964).
- [98] H. B. Bosmann, A. Hagopian u. E. H. Eylar, *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 470 (1968).
- [99] A. Hagopian u. E. H. Eylar, *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 447 (1969).
- [100] A. Gottschalk, *Nature* 222, 452 (1969).
- [101] E. Mårtensson, A. Raal u. L. Svennerholm, *Biochim. Biophys. Acta* 30, 124 (1958).
- [102] R. Schauer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 783 (1970).
- [103] H. J. Schoop u. R. Schauer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 13 (1969).
- [104] R. Schauer, Proc. 2nd European Symposium on Connective Tissue Research, Hannover 1970, im Druck.
- [105] R. Schauer u. M. Wember, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 1282 (1971).
- [106] Y. Hashimoto u. W. Pigman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 93, 541 (1962).
- [107] F. Downs u. W. Pigman, *Biochemistry* 8, 1760 (1969).
- [108] A. Hagopian u. E. H. Eylar, *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 515 (1969).
- [109] R. Schauer u. M. Wember, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 1353 (1970).
- [110] R. Winzler in E. Rossi u. E. Stoll: *Biochemistry of Glycoproteins and Related Substances, Cystic Fibrosis*, Part II. Karger, Basel 1968, S. 226.
- [111] B. Rossignol, G. Herman u. H. Clouser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 111 (1969).
- [112] G. R. Lawford u. H. Schachter, *Can. J. Biochem.* 45, 507 (1967).
- [113] P. J. O'Brien u. C. G. Muellenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 158, 189 (1968).
- [114] J. L. Simkin, E. J. Sikorska, J. C. Jamieson u. A. A. Sargent, *Biochim. Biophys. Acta* 170, 422 (1968).
- [115] R. R. Wagner u. M. A. Cynkin, *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 242 (1969).
- [116] A. Hagopian, H. B. Bosmann u. E. H. Eylar, *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 387 (1968).
- [117] A. Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 645 (1957).
- [118] H. Faillard, R. Schauer u. H. J. Schoop, Vorschlag an die Enzymkommission der IUPAC-IUB (1969).
- [119] W. Gielen, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol. 264, 235 (1969).
- [120] G. Tettamanti u. V. Zambotti, *Enzymologia* 35, 61 (1968).
- [121] H. Tuppy u. P. Palese, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 1169 (1968).
- [122] H. Faillard in Hoppe-Seyler/Thierfelder: *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*. Springer-Verlag, Berlin 1966, S. 1234.
- [123] F. M. Burnet, J. F. McCrea u. J. D. Stone, *Brit. J. Exp. Pathol.* 27, 228 (1946).
- [124] J. F. McCrea, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25, 127 (1947).
- [125] G. L. Ada u. E. L. French, *Nature* 183, 1740 (1959).
- [126] R. Drzeniek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 631 (1967).
- [127] H. Faillard, G. Kirchner u. M. Blohm, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 347, 87 (1966); Abstr. 7th Int. Congr. Biochem., IV, 708, Tokyo 1967.
- [128] H. Faillard, C. Ferreira do Amaral u. M. Blohm, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 798 (1969).
- [129] P. Meindl u. H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* 96, 802, 816 (1965); 97, 654, 990, 1628 (1966).
- [130] J. D. Karkas u. E. J. Chargaff, *J. Biol. Chem.* 239, 949 (1964).
- [131] R. Schauer, M. Wember, F. Wirtz-Peitz u. C. Ferreira do Amaral, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 1073 (1971).
- [132] D. G. Comb u. S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 235, 2529 (1960).
- [133] P. Brunetti, G. W. Jourdian u. S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 237, 2447 (1962).
- [134] R. Schauer u. M. Wember, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 1517 (1971).
- [135] A. Gottschalk: *Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function*. 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam 1972.
- [136] A. Gottschalk u. M. A. W. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta* 46, 91 (1961).
- [137] J. C. Boursnell, E. F. Hartree u. P. A. Briggs, *Biochem. J.* 117, 981 (1970).
- [138] S. Isaka, K. Hotta u. M. Kurokawa, *Exp. Cell Res.* 59, 37 (1970).
- [139] P. Soupart u. T. H. Clewe, *Fert. Steril.* 16, 677 (1965).
- [140] C. H. Andrewes, F. B. Bang u. F. M. Burnet, *Virology* 1, 176 (1955).
- [141] K. G. Hirst, *Science* 94, 22 (1941).
- [142] R. Drzeniek, *Z. Med. Mikrobiol. Immunol.* 155, 315 (1970); 156, 1 (1970).
- [143] R. H. Kathan, L. J. M. Riff u. M. Real, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114, 90 (1963).
- [144] J. T. Seto u. F. S. Chang, *J. Virol.* 4, 58 (1969).
- [145] J. L. Glick u. S. Githens, *Nature* 208, 88 (1965).
- [146] W. Wesemann u. F. Zilliken, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 823 (1968).
- [147] J. Labat, B. Lebel, G. Parrot, J.-L. Parrot u. J. E. Curtois, *C. R. Acad. Sci. Paris. D* 263, 2050 (1966).
- [148] L. Weiss, *J. Cell Biol.* 26, 735 (1965).
- [149] R. B. Kemp, *J. Cell Sci.* 6, 751 (1970).
- [150] T. Hovig, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 13, 84 (1965).
- [151] L. Mester in J. Caen: *Platelet Aggregation*. Table Ronde Roussel, März 1971, S. 131.
- [152] H. Faillard u. W. Pribilla, *Klin. Wochenschr.* 42, 686 (1964).
- [153] H. Faillard, *Blut* 19, 238 (1969).
- [154] H. Rubin u. N. D. Ritz, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 17, 23 (1967).
- [155] M. M. Yarnell u. E. J. Ambrose, *Eur. J. Cancer* 5, 265 (1969).
- [156] A. Lee, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 891 (1968).
- [157] A. G. Morell, G. Gregoriatidis, I. H. Scheinberg, J. Hickman u. G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* 246, 1461 (1971).

- [158] W. E. Pricer u. G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **246**, 4825 (1971).
 [159] P. P. Dukes, *18. Coll. Ges. Physiol. Chem. Mosbach*, Springer, Berlin 1967, S. 197.
 [160] P. P. Dukes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 345 (1968).
 [161] J. J. Woodruff u. B. M. Gesner, *J. Exp. Med.* **129**, 551 (1969).
 [162] C. A. Apffel u. J. H. Peters, *J. Theor. Biol.* **26**, 47 (1970).
 [163] G. Uhlenbrück u. W. Gielen, *Fortschr. Neurol. Psych. Grenzg.* **38**, 202 (1970).
 [164] G. A. Currie, W. van Doorninck u. K. D. Bagshawe, *Nature* **219**, 191 (1968).
 [165] G. A. Currie u. K. D. Bagshawe, *Brit. J. Cancer* **23**, 141 (1969).
 [166] K. D. Bagshawe u. G. A. Currie, *Nature* **218**, 1254 (1968).
 [167] G. A. Currie u. K. D. Bagshawe, *Brit. J. Cancer* **22**, 843 (1968).
 [168] R. G. Spiro, *Annu. Rev. Biochem.* **39**, 599 (1970).
 [169] A. Goldstone, P. Konecny u. H. Koenig, *FEBS Lett.* **13**, 68 (1971).
 [170] A. Goldstone u. H. Koenig, *Life Sci.* **9**, 1341 (1970).
 [171] E. Dziembor, J. Grysakiewicz u. W. Ostrowski, *Experientia* **26**, 947 (1970).
 [172] R. G. Spiro, *New Engl. J. Med.* **281**, 1043 (1969).
 [173] E. G. Brunngraber, B. D. Brown u. V. Aguilar, *J. Neurochem.* **16**, 1059 (1969).
 [174] W. Gielen, *Naturwissenschaften* **55**, 104 (1968).

ZUSCHRIFTEN

Direkter Beweis der Nicht-Aromatizität von Phospholen und Arsolen^[1]

Von Werner Schäfer, Armin Schweig, Gottfried Märkl, Hagen Hauptmann und François Mathey^[1]

Physikalisch-chemische (Röntgen-Strukturanalyse^[2 e, g], UV-^[2 a-d, o], NMR-^[2 a-d, f, h-k, n], Dipolmoment-^[21, 4 b], Reaktionskinetik-Messungen^[2 m]), theoretisch-chemische^[3 a-c] und chemische^[2 a-d, k, o, 4 a, b] Untersuchungen über die Beteiligung der einsamen Heteroatom-Elektronenpaare an einer cyclischen Konjugation (Aromatizität) in Phospholen und Arsolen führten bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hier beschreiben wir nun einen direkten Beweis für die Nicht-Aromatizität dieser Systeme.

Abbildung 1 zeigt die Photoelektronenspektren^[5] von 1-Phenylphosphol (1), 1-Phenylphospholan (2), 1-Phenyl-2,5-dimethylphosphol (3) sowie 1-Phenyl-2,5-dimethylarsol (5) und Abbildung 2 das aus diesen Spektren und dem Spektrum von 1-Phenyl-2,5-dimethylphospholan (4) abgeleitete Korrelationsdiagramm der obersten besetzten MOs in (1) bis (5). Das Spektrum von (1) weist im Bereich niedriger Ionisierungspotentiale (IP) zwei Banden im Intensitätsverhältnis 1:1 auf. Aus Lage (9.25 eV; $e_{1g}(\pi)$ -MO in Benzol: 9.24 eV^[5]) und Form der zweiten Bande (keine Aufspaltung) geht hervor, daß zwischen Phenyl-Substituent und Phosphol-System in (1) keine Wechselwirkung besteht^[6]. Die relative Intensität der ersten Bande bedeutet, daß zwei Ionisationen in diesem Bereich liegen müssen, die nur dem antisymmetrischen MO ($a_2(\pi)$ in Cyclopentadien: 8.57 eV^[7]) und dem einsamen Elektronenpaar am Phosphoratom (8.35 eV in (2)) zugeordnet werden können. Diese Zuordnung wird beim Vergleich mit den Spektren von (3) und (4) voll bestätigt. Durch die Methyl-Substitution in 2,5-Stellung wird das

π -MO auf 8.0 eV angehoben^[8] (Folge der hyperkonjugativen Kopplung zwischen CH_3 -Gruppe und π -MO), das einsame Elektronenpaar bleibt praktisch unbeeinflußt.

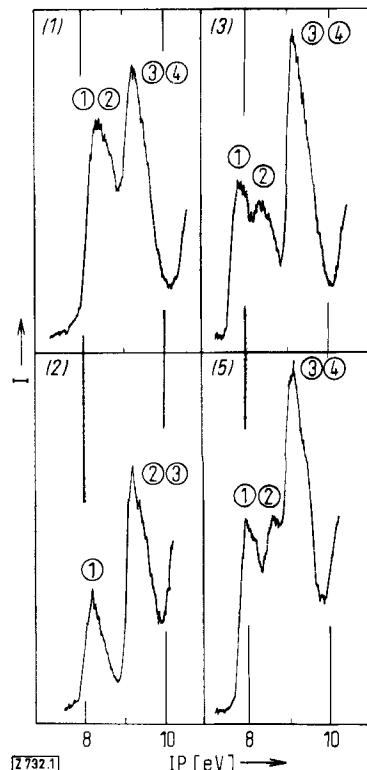


Abb. 1. PE-Spektren der Heterocyclen (1), (2), (3) und (5).

Alle verfügbaren Argumente – die einsamen Elektronenpaare in PH_3 : 10.59 eV^[10] und in AsH_3 : 10.58 eV^[10] liegen bei gleicher Energie, das π -HOMO („highest occupied MO“) in (3) ist praktisch ein 1,4-Dimethyl-*cis*-butadien-MO sowie quantenchemische Näherungsrechnungen^[3 c] – legen für (5) die gleiche Zuordnung wie für (3) nahe.

Unsere Resultate zeigen, daß bei allen untersuchten Verbindungen keine konjugativen Wechselwirkungen zwischen Fünf- und Sechsring bestehen (die $e_{1g}(\pi)$ -MOs in

[*] Prof. Dr. A. Schweig und Dipl.-Chem. W. Schäfer
Fachbereich Physikalische Chemie der Universität
355 Marburg, Biegenstraße 12
Prof. Dr. G. Märkl und Dr. H. Hauptmann
Fachbereich Chemie der Universität
84 Regensburg, Universitätsstraße 31
Dr. F. Mathey
Institut National de Recherche Chimique Appliquée
Centre de Recherche
F-91 Vert-le-Petit (Frankreich)