

$J_{13\text{W},13\text{P}} = 167.0$ Hz); IR (KBr): $\nu_{\text{H}} = 1755$, $\nu_{\text{D}} = 1250$ cm^{-1} ; Kristalldaten für 1: $T = -160^\circ\text{C}$; $a = 9.841(1)$, $b = 20.478(3)$, $c = 17.280(3)$ Å, $\beta = 95.70(1)^\circ$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.734$ g cm^{-3} , Raumgruppe $P2_1/n$, $R(F) = 0.033$, $R_w(F) = 0.035$ [7].

2: In einem 20-mL-Kontes-Gefäß mit Durchstichkappe löst man 1 (0.200 g, 0.221 mmol) in ca. 10 mL Hexan. Die Lösung wird in flüssigem Stickstoff abgekühlt und das Reaktionsgefäß evakuiert. Man setzt das Gemisch unter 1 atm CO, verschließt das Gefäß, erwärmt auf Raumtemperatur und rührt weitere 24 h. Man filtriert und überführt das Filtrat in ein Schlenk-Gefäß. Anschließend wird die Lösung auf ca. 1 mL eingeeengt. Nach 3–4 Tagen bei -20°C können braune Kristalle isoliert werden. (Ausbeute 0.190 g, 92%); Elementaranalyse für $\text{W}_2\text{P}_4\text{O}_{10}\text{C}_{25}\text{H}_{60}$, ber. (gef.): C 32.21 (31.88), H 6.49 (6.27); $^1\text{H-NMR}$ (22°C , C_6D_6): $\delta = 4.63$ (sept, 4H, $\text{OC}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$), 1.56 (d, 12H, $\text{OC}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$), 1.41 (d, 12H, $\text{OC}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$), 2.24, 2.14, 2.05, 1.86, 1.29, 1.26, 0.801, 0.468 (8d, 24H, $(\text{CH}_3)_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{CH}_3)_2$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (22°C , C_6D_6): $\delta = 224.0$ (m, 1C, CO), $J_{13\text{W},13\text{C}} = 158.6$, $J_{13\text{C},13\text{P}(\text{trans})} = 27.3$, $J_{13\text{C},13\text{P}(\text{cis})} > 4.8$ Hz); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (22°C , C_6D_6): $\delta = 15.7$ (AB quart, 2P, dmpe), 6.8 (dd, 1P, dmpe), -3.0 (dd, 1P, dmpe); simulierte Kopplungskonstanten (Hz) für das ABMX-System: $J_{\text{AB}} = 85$, $J_{\text{AM}} = 16$, $J_{\text{AX}} = 0$, $J_{\text{BM}} = 0$, $J_{\text{BX}} = 13$, $J_{\text{MX}} = 23.5$, $J_{\text{W-P(A)}} = 370$, $J_{\text{W-P(B)}} = 260$, $J_{\text{W-P(M)}} = 190.5$, $J_{\text{W-P(X)}} = 130$; IR (Nujol): $\nu_{\text{CO}} = 1827$, $\nu_{13\text{CO}} = 1784$ cm^{-1} ; Kristalldaten von 2: 0.5 Toluol: $T = -170^\circ\text{C}$, $a = 19.546(3)$, $b = 21.745(4)$, $c = 18.114(3)$ Å, $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.688$ g cm^{-3} , Raumgruppe $Pbca$, $R(F) = 0.051$, $R_w(F) = 0.046$ [7].

3: In einem Kontes-Gefäß mit Durchstichkappe wird 1 (0.200 g, 0.221 mmol) in ca. 10 mL Toluol gelöst. Wie vorher beschrieben, setzt man das Reaktionsgemisch unter 1 atm CO, um 2 herzustellen. Die Lösung von 2 wird in ein Schlenk-Gefäß überführt, fügt dann eine 1.11 M Lösung H_2O in THF (600 μL , 0.662 mmol) mit einer μL -Spritze hinzu, und läßt ohne zu rühren das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur 24 h stehen, wobei sich orange Nadeln abscheiden. Die Mutterlauge wird mit einer Kanüle entfernt. Man wäscht den orangen Feststoff zweimal mit 5 mL Hexan und trocknet ihn im Vakuum (Ausbeute: 0.148 g, 97%). 3 kann auch direkt aus kristallinem 2 in vergleichbaren Ausbeuten hergestellt werden. Für eine Kristallstrukturanalyse geeignete Kristalle wurden aus CH_2Cl_2 erhalten. Elementaranalyse für $\text{W}_4\text{P}_8\text{O}_{17}\text{C}_{46}\text{H}_{64}$, ber. (gef.): C 21.21 (20.83), H 4.38 (4.43); $^1\text{H-NMR}$ (22°C , $[\text{D}_3]\text{Pyridin}$): $\delta = 0.900$, 2.23 (16 Dubletts, die auf das Vorliegen von zwei Rotameren im ungefähren Verhältnis von 1.0:1.2 hinweisen); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (22°C , D_2O): $\delta = 13.9$ (m, 1P), 8.5 (m, 1P), 0.767 (m, 2P); IR (KBr): $\nu_{\text{CO}} = 1800$, $\nu_{13\text{CO}} = 1755$ cm^{-1} ; Kristalldaten von 3: 4 CH_2Cl_2 ; $T = -169^\circ\text{C}$, $a = 13.282(2)$, $b = 14.308(3)$, $c = 15.319(3)$ Å, $\beta = 97.88(1)^\circ$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.105$ g cm^{-3} , Raumgruppe $P2_1/n$, $R(F) = 0.0245$, $R_w(F) = 0.027$ [7].

Eingegangen am 28. September 1994 [Z 7365]

Stichworte: Komplexe mit Phosphorliganden · Komplexe mit Sauerstoffliganden · Metall-Metall-Bindungen · Wolframverbindungen

- [1] M. Herberhold, G. Jin, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1016; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 964.
- [2] M. H. Chisholm, K. S. Kramer, W. E. Streib, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3571.
- [3] M. H. Chisholm, K. S. Kramer, unveröffentlicht.
- [4] M. H. Chisholm, J. C. Huffman, W. G. Van Der Sluys, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2514.
- [5] G. A. Orpen, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1980**, 2509, zit. Lit.
- [6] M. H. Chisholm, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 419.
- [7] Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter der Hinterlegungsnummer CSD-58696 angefordert werden.

Ein Multienzymsystem zur Eintopfsynthese des Sialyl-T-Antigens**

Vladimir Křen* und Joachim Thiem

Die mannigfaltige Rolle der Kohlenhydrate bei zahlreichen biologischen Erkennungsprozessen wird zunehmend erforscht^[1]. Als weit verbreitetes Strukturelement in Glykokonjugaten ist die Sialinsäure besonders wichtig, weil sialylierte Strukturen für eine Vielzahl von Bioprozessen von zentraler Bedeutung sind^[2], z.B. bei Zell-Zell-Wechselwirkungen^[3], bei Immunreaktionen und beim Abbau von Glykoproteinen^[4]; sie sind ferner entscheidende Struktureinheiten bei einigen Antigendeterminanten in Tumoren^[5]. Das Thomsen-Friedenreich-Antigen (T-Antigen) Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ GalNAc- α -O-Ser gehört zu den Antigenen, die mit den Blutgruppen-Determinanten verwandt sind und die in Epitheltumoren gebildet werden^[6]. Ein sialyliertes Epitop, Neu5Ac $\alpha(2 \rightarrow 3)$ Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ GalNAc 3 (Schema 1), findet sich in GM₁-Glykolipiden, menschlichen Erythrocyten^[5,7] und in einem Knochenmark-Makrophagenlektin^[7]. Die Herstellung dieses Epitops ist besonders für immunologische Untersuchungen und die Gewinnung von künstlichen Antitumor-Impfstoffen von Bedeutung^[8].

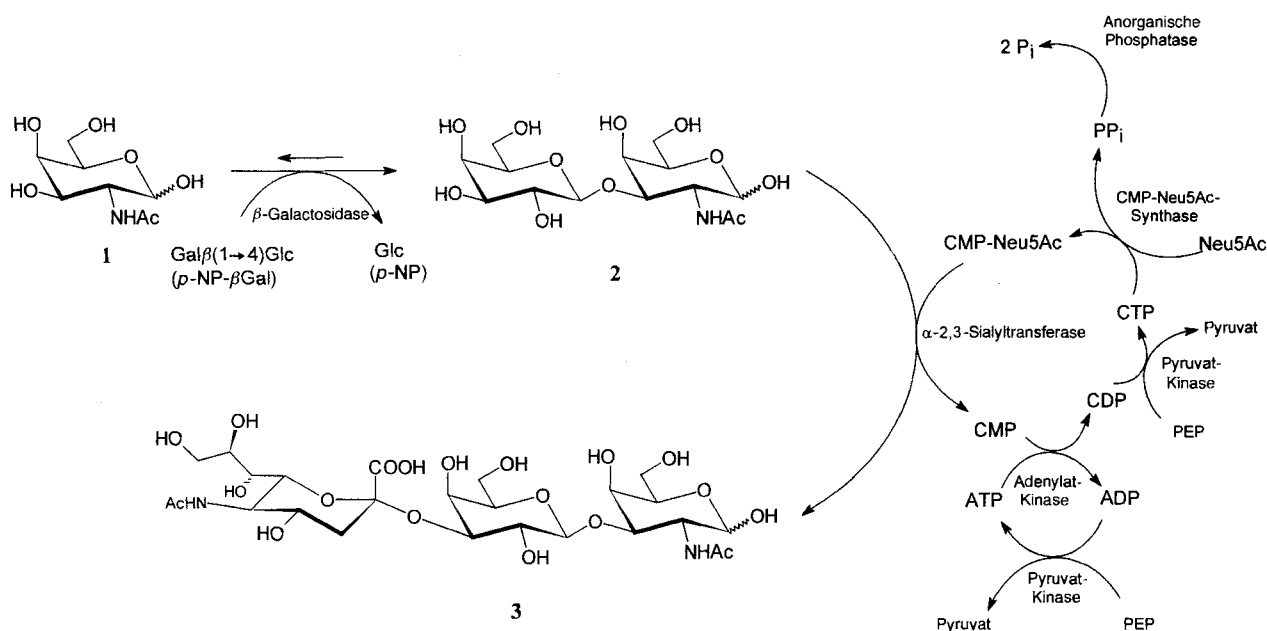
Die enzymatische Synthese derartiger Epitopstrukturen und ihrer Derivate hat sich vor allem dann als vorteilhaft erwiesen^[9,10], wenn Glycosyltransferasen mit einer In-situ-Regenerierung der Zuckernucleotide eingesetzt wurden^[11,12]. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Verbindung 3 wurde Gal $\beta(1 \rightarrow 3)$ GalNAc 2 benötigt. Dieses konnte entweder in einer aufwendigen Vielstufensynthese^[13] oder durch enzymatische Transglycosylierung mit β -Galactosidasen aus Rinderhoden und *Escherichia coli* in allerdings nur 21 % Ausbeute^[14] gewonnen werden. Beide Methoden sind ziemlich kompliziert, und entsprechend teuer ist das Disaccharid (ca. 100 DM/1 mg). Ein kombinierter sequentieller Einsatz von Glycosyltransferasen^[12] oder von Glycosidasen und Glycosyltransferasen unter Einbeziehung der Cofaktorregenerierung^[16] überführt den komplizierten Mehrstufenprozeß in eine Eintopfreaktion und vermeidet aufwendige Reinigungsverfahren bei Zwischenprodukten. Die Hydrolyse der Disaccharid-Intermediate wird durch deren Glycosyltransferase-vermittelte Umwandlung in ein Oligosaccharid unterbunden, das selbst kein Substrat für die Glycosidase ist. Über eine derartige chemoenzymatische Synthese von Neu5Ac $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -LacNAc unter Einsatz kommerziell verfügbarer β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* und α -2,6-Sialyltransferase aus Rattenleber ist kürzlich berichtet worden^[16]. Wir beschreiben hier die Herstellung des sialylierten antigenen T-Epitops 3 durch eine Multienzymsynthese mit Cofaktorregenerierung im Eintopfverfahren (Schema 1).

Im kürzlich bearbeiteten Fall^[16] lagen die pH-Optima der Enzyme in einem engen Bereich, was die Durchführung einer Multienzymsynthese erleichtert. Das pH-Optimum der CMP-Neu5Ac-Synthase (CMP = Cytosinmonophosphat) aus Kalbshirn liegt bei 9.0^[17,18], das der α -2,3-Sialyltransferase (ST) aus

[*] Dr. V. Křen^[+], Prof. Dr. J. Thiem
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg
Telefax: Int. + 40/4123-4325

[+] Ständige Adresse: Institut für Mikrobiologie der Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Laboratorium für Biotransformationen
Videňská 1083, CZ-14220 Prag 4 (Tschechische Republik)
Telefax: Int. + 2/471-57 43
E-mail: kren@biomed.cas.cz

[**] Diese Arbeit wurde durch ein Forschungsstipendium der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für V. K. sowie den Fonds der Chemischen Industrie gefördert.



Schema 1.

Schweineleber bei 6.5 und das der β -Galactosidase aus Rinderhoden (BTG) bei 4.3^[15]. Obwohl das pH-Optimum der α -2,3-ST bei 6.5 liegt, werden die präparativen Ansätze durchweg bei pH 7.5 durchgeführt, damit die Zersetzung der aktivierten Neuraminsäure (CMP-Neu5Ac) bei niedrigerem pH vermieden wird. Offenbar ist dieser pH-Wert für die CMP-Neu5Ac-Synthase sowie für die meisten Enzyme zur Regeneration von CTP noch immer tolerabel. Die entscheidende Frage war nun, ob BTG bei einem weit vom Optimum entfernten pH-Wert zur Synthese der Disaccharid-Intermediate geeignet ist.

Nach Distler und Jourdan^[15] zeigt BTG bei pH 7.5 für das Substrat Lactose noch etwa 19% der maximalen Aktivität. Wird *p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (*p*-NP-Gal) verwendet, kann der Anteil an freigesetzter Galactose auf etwa 30% gesteigert werden. Tatsächlich ist die Transglycosylierungsaktivität von Glycosidasen häufig unter basischeren Bedingungen nachhaltiger ausgeprägt als am pH-Optimum^[19]. Daher sollte eine entsprechende pH-Verschiebung die Transglycosylierung begünstigen. Dazu kommt, daß die Aktivität von BTG in Gegenwart von *N*-Acetylactosamin etwa doppelt so hoch ist wie ohne diese Verbindung^[15], die offenbar als Acceptor für die abgespaltene Galactose dient und damit das Gleichgewicht verschiebt.

Beide Befunde sollten die Umsetzung günstig beeinflussen. Das Konzept wurde unter realen Bedingungen (Na-Kakodylat-Puffer 25 mM, MnCl₂ 20 mM, NaCl 75 mM, Triton-X-100, 1.4% w/v) mit *p*-NP-Gal als Substrat überprüft. Im Vergleich zur optimalen Aktivität bei pH 4.5 ergaben sich bei pH 6.5, 7.0 und 7.5 die BTG-Aktivitäten zu 42%, 30% bzw. 26%. GalNAc mit einer Endkonzentration von 250 mM bei pH 7.5 erhöhte die Aktivität auf das 3.6fache. Dünnschichtchromatographisch (*n*-Propanol:1 mM NH₃:H₂O = 6:2:1) ließ sich die rasche Bildung der erwünschten Disaccharidkomponente 2 in der Reaktionsmischung nachweisen.

Zur Überprüfung des Ablaufs der ST-Reaktion in Gegenwart des aus *p*-NP-Gal abgespaltenen *p*-Nitrophenols sowie der Verknüpfung der Transgalactosylierung von GalNAc mit dem Transfer von Neu5Ac auf das Acceptor-disaccharid wurde radioaktiv markierte CMP-Neu5Ac verwendet. Wurde Lactose anstatt *p*-NP-Gal als Galactosedonor eingesetzt, fiel die (analyti-

sche) Ausbeute an 3 zwar 20% höher aus, allerdings wurde für präparative Ansätze doch *p*-NP-Gal genutzt, da die Aufarbeitung einfacher war. Auch dieser Teil der Reaktionsabfolge ohne CMP-Neu5Ac-Regeneration wurde mit radioaktiv markierten Substraten optimiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die verwendete BTG-Präparation^[14] CMP-Neu5Ac nicht hydrolysiert.

Anschließend wurden diese Reaktionsschritte mit dem modifizierten Multienzymsystem zur Regenerierung von CMP-Neu5Ac^[12] verknüpft (Schema 1). Die Endzusammensetzung der Reaktionsmischung im halbpräparativen Maßstab ist im experimentellen Teil beschrieben. Die analytische Ausbeute an Trisaccharid 3 bezogen auf Neu5Ac betrug 45%, die Ausbeute an isoliertem Produkt 36%.

Der Reaktionsverlauf ließ sich mit einem neuen kolorimetrischen System verfolgen, das die Bestimmung der Anteile an Neuraminsäure (Neu5Ac), CMP-Neu5Ac und dem Produkt 3 zu jeder Zeit ermöglichte, so daß der Reaktionsverlauf und die Zugabe der Reaktanten optimiert werden konnten (Abb. 1).

Im Reaktionsgemisch findet sich die Neuraminsäure in dreierlei Form: frei als Neu5Ac, gebunden in CMP-Neu5Ac und als Struktureinheit im Trisaccharid 3. Die Gesamtmenge an Neu5Ac läßt sich nach der Hydrolyse (pH 1, 80 °C, 1 h) mit der Thiobarbitursäuremethode^[21] ermitteln. Die im Produkt 3 ge-

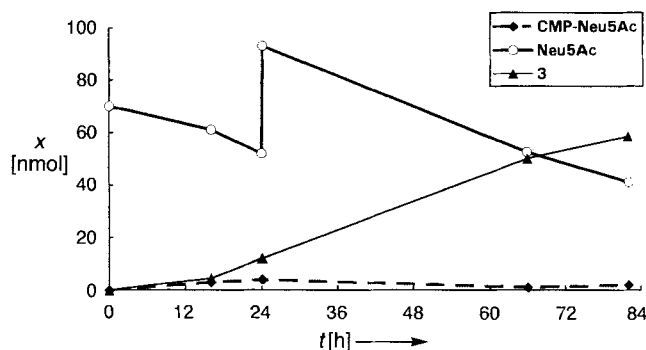


Abb. 1. Synthese von 3 durch Einbau von Neu5Ac in 2 (siehe Schema 1) durch eine Multienzym-Eintopfreaktion. *x* ist die Stoffmenge, *t* die Reaktionszeit.

bundenen Neu5Ac, d.h. zugleich die analytische Ausbeute der Umsetzung, läßt sich nach Durchlauf einer mit 5 mm Phosphatpuffer bei pH 6.9 verdünnten Probe durch eine Pasteurpipette mit Dowex 1 × 8 (200–400 mesh/ PO_4^{3-}) ermitteln. Am Ionenaustauscher bleiben Neu5Ac und CMP-Neu5Ac haften, so daß die im Produkt enthaltene Neu5Ac nach Säurespaltung mit der Thiobarbitursäuremethode bestimmt werden kann. Die Summe aus Neu5Ac im Produkt **3** und in CMP-Neu5Ac läßt sich nach Umsetzung der Reaktionsmischung mit NaBH_4 durch nachfolgende Säurespaltung und Thiobarbitursäureassay bestimmen. Dabei wird Neu5Ac zum entsprechenden Alditol reduziert, das mit Thiobarbitursäure keine Farbreaktion gibt. Die Befunde ermöglichen eine Optimierung des Reaktionsverlaufs und eine Bestimmung der analytischen Ausbeute. Dieses Multienzymssystem dürfte auf weitere Transsilylierungsreaktionen anwendbar sein, bei denen sowohl Sialyltransferasen als auch Sialidasen notwendig sind.

Zur sequentiellen Synthese komplexer Heterooligosaccharide eignen sich also Multienzymreaktionen mit integrierter Cofaktorregenerierung. Außerdem ließ sich nachweisen, daß auch Enzyme mit sehr unterschiedlichen pH-Optima verwendet werden können. Die Ergebnisse weisen neue Perspektiven für die Eintopfsynthese von Glycosiden aus drei bis vier Glycosyleinheiten.

Experimentelles

Enzymatische Synthese von **3**: Neu5Ac (70 µmol; 0.7 mL einer 0.1 M Lösung mit NaHCO_3 auf pH 7.5 neutralisiert), CMP (50 mg, 100 µmol), ATP (5 µmol), CTP (0.5 µmol), Phosphoenolpyruvat (K-Salz, 300 mg, 200 µmol), 1 (150 mg, 0.7 mmol), *p*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (300 mg, 1 mmol), MnCl_2 (60 µmol; 60 µL einer 1 M Lösung), MgCl_2 (0.12 mmol; 120 µL einer 1 M Lösung), KCl (0.2 mmol; 200 µL einer 1 M Lösung), Na-Kakodylat-Puffer (1 mL; 0.25 M, pH 7.5 mit 2% Triton-X-100) wurden gemischt und mit H_2O auf etwa 5 mL verdünnt; der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.5 eingestellt. Es wurden die folgenden Enzyme zugegeben: Myokinase aus Schweinemuskel (EC 2.7.4.3, 600 U), Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40, 1200 U), Anorganische Phosphatase (EC 3.6.1.1, 5 U), CMP-Neu5Ac-Synthase aus Kalbshirn immobilisiert an CNBr-Sepharose [20] (EC 2.7.7.43, 1 U), β-Galactosidase (aus Rinderhoden [14], EC 3.2.1.23, 1.5 U), α-2,3-Sialyltransferase (aus Schweineleber, EC 2.4.99, 0.1 U) [9, 17, 22]. Die Mischung wurde mit Wasser auf 10 mL verdünnt. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden weitere *p*-NP-Gal (300 mg, 200 µmol) und β-Galactosidase (0.7 U) zugegeben und der pH erneut auf 7.5 eingestellt; nach weiteren 24 h wurden Neu5Ac (40 µmol), CMP-Neu5Ac-Synthase (0.2 U) und Sialyltransferase (0.07 U) zugefügt. Die Zugabe von Sialyltransferase (0.07 U) wurde nach weiteren 24 h wiederholt und die Reaktion nach insgesamt 82 h abgebrochen. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt, dann wurden etwa 7 mL Dowex 1 × 2 (200–400 mesh) (PO_4^{3-}), äquilibriert in 5 mm Na_2P_i -Puffer bei pH 6.9) zugegeben. Nach 20 min wurde der Überstand gewonnen und der Ionenaustauscher mit 15 mL äquilibriertem Puffer nachgewaschen. Durch dieses Verfahren werden freie Neu5Ac, CMP-Neu5Ac und *p*-Nitrophenol entfernt. Die gesammelten Eluate wurden bis auf etwa 2 mL lyophilisiert und der Rückstand über eine Säule (4 × 100 cm) BioGel P2 (200–400 mesh) mit Wasser eluiert. Die Fraktionen mit dem Trisaccharid (Refraktionsindex, Thiobarbitursäure-Assay [21]) wurden gesammelt und lyophilisiert. Bezogen auf Neu5Ac ergab sich eine analytische Ausbeute von 45%, die Ausbeute an isoliertem **3** belief sich auf 27 mg (36%). – $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O ; Gleichgewicht in Wasser: α:β = 5:4): δ = 1.72 (t, 0.56 H, $J_{3''\text{a},4''} = J_{3''\text{a},3''\text{e}} = 12.2$ Hz, H-3''a-β-Anomer), 1.73 (t, 0.44 H, $J_{3''\text{a},4''} = J_{3''\text{a},3''\text{e}} = 12.2$ Hz, H-3''a-α-Anomer), 1.97 (s, 3 H, 5'-Nac), 1.99 (s, 1.7 H, 2-Nac-β-Anomer), 1.99 (s, 1.3 H, 2-Nac-α-Anomer), 2.69 (dd, 1 H, $J_{3''\text{e},4''} = 4.1$ Hz, H-3''e), 4.44 (d, 0.44 H, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, H-1'-β-Anomer), 4.51 (d, 0.56 H, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, H-1'-α-Anomer), 4.63 (d, 0.44 H, $J_{1,2} = 9.2$ Hz, H-1β-Anomer), 5.17 (d, 0.56 H, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, H-1α-Anomer). Die Daten stehen mit denen des früher publizierten Spektrums (250 MHz) [9] von **3** in Einklang.

Eingegangen am 15. November 1994 [Z 7479]

Stichworte: Enzymkatalyse · β-Galactosidase · Oligosaccharidsynthesen · Sialyltransferase · T-Antigen

- [1] J. B. Lowe, L. M. Stolman, R. P. Nair, T. L. Berhend, R. M. Marks, *Cell* **1990**, 63, 475–484; T. Feizi, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 84–86.
- [2] R. Schauer, *Sialic Acid Chemistry, Metabolism and Function*, Springer, Wien, **1982**, zit. Lit.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, 40, 131–234; *Methods Enzymol.* **1987**, 138, 132–161.
- [3] G. Ashwell, J. Hartfort, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 531–554.

- [4] T. A. Springer, L. A. Lasky, *Nature* **1991**, 349, 196–197; C. Foxall, S. R. Watson, B. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasagawa, D. Asa, B. K. Brandley, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 895–902.
- [5] S. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.* **1984**, 2, 103–126; A. M. Cohen, A. Al-laouf, M. Djaldetti, K. Weigl, N. Lehrer, H. Levinski, *Eur. J. Haematol.* **1989**, 43, 191–194; F. Dall'Olio, N. Mallagoli, G. DeStefan, F. Minni, D. Marrano, F. Serafini, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 434–439; J. C. Jamieson, G. McCaffrey, P. G. Harder, *Comp. Biochem. Physiol. B* **1993**, 105, 29–33.
- [6] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198–1206.
- [7] O. Prokop, G. Uhlenbruck, *The Thomsen Phenomenon in Human Blood and Serum Groups*, MacLaren, London **1969**, S. 102–110; G. Uhlenbruck, G. I. Pardoe, G. W. G. Bird, *Z. Immunitätsforsch. Allg. Klin. Immunol.* **1969**, 38, 423–433; Y. Ito, J. J. Gaudino, J. C. Paulson, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 753–762.
- [8] P. O. Livingston, *Curr. Opin. Immunol.* **1992**, 4, 624–629; J. Cohen, *Science* **1993**, 262, 841–843.
- [9] A. Lubineau, C. Augé, P. Francois, *Carbohydr. Res.* **1992**, 228, 137–144.
- [10] J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1096–1097; S. Sabesan, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2068–2080.
- [11] C. Augé, C. Mathieu, C. Merienne, *Carbohydr. Res.* **1986**, 151, 147–156; J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1184–1185; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1163–1164; Y. Ichikawa, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4698–4700.
- [12] P. Stangier, W. Treder, J. Thiem, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 26–33.
- [13] A. Lubineau, H. Bienaymé, *Carbohydr. Res.* **1991**, 212, 267–271.
- [14] L. Hedbys, E. Johansson, K. Mosbach, P.-O. Larsson, *Carbohydr. Res.* **1989**, 186, 217–223.
- [15] J. J. Distler, G. W. Jourdan, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6772–6780.
- [16] G. F. Herrmann, Y. Ichikawa, C. Wandrey, F. C. A. Gaeta, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3091–3094.
- [17] C. Augé, R. Fernandez-Fernandez, C. Gautheron, *Carbohydr. Res.* **1990**, 200, 257–268.
- [18] R. Schauer, M. Wember, C. Ferreira do Amaral, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, 353, 883–886.
- [19] V. Křen, *Biotechnol. Lett.* **1992**, 14, 769–772; V. Křen, M. Flieger, P. Sajdl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, 32, 645–650.
- [20] S. David, C. Augé, C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1991**, 49, 175–237.
- [21] L. Warren, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 1971–1975.
- [22] W. Gillespie, S. Kelm, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21004–21010.

Supra, supra-faciale [4 + 2]-Dimerisierung von (E)-1,3-Diphenyl-1,3-butadien: Hinweis auf einen konzertierten Mechanismus

Johann Mulzer* und Katja Melzer

Der stereochemische Verlauf der Dimerisierung von 1,3-Butadien und seinen Derivaten ist während der letzten zwanzig Jahre intensiv untersucht worden, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen: Stephenson et al.^[1] stellten eine auf 90% verringerte Stereoselektivität fest, die sie mit einer Konkurrenz zwischen der erlaubten $[4_s + 2_s]$ - und der verbotenen $[4_s + 2_a]$ -Addition im Verhältnis 9:1 interpretierten. Nach einer neueren Analyse von Klärner et al.^[2,3] weist die Reaktion allerdings eine Stereoselektivität von 97% auf! Zum gleichen Ergebnis kamen Berson und Malherbe^[4] bei Untersuchungen von Piperylen. Aufgrund dieser Befunde wurde ein konzertierter Prozeß für die Dimerisierung von Butadien postuliert, mit dem mehrstufige Prozesse in geringem Umfang konkurrieren. In ähnlicher Weise konkurriert bei der Dimerisierung von 2,3-Dimethyl-1,3-butadien ein zweistufiger Reaktionsweg über eine diradikalische Zwischenstufe mit dem konzertierten Prozeß^[5], und für eines

[*] Prof. Dr. J. Mulzer, Dipl.-Chem. K. Melzer
Institut für Organische Chemie der Freien Universität
Takustraße 3, D-14195 Berlin
Telefax: Int. + 30/838-5163