

Relative fluorescence intensities of 3- and 5-substituted indoles in 3 solvent systems: I, 1 N NaOH; II, 40% formaldehyde/1 N NaOH (1:1); III, 1 N NaOH/acetic anhydride (1:1)

Compound	R ₃	R ₅	I	II	III
Indole	—	—	2.4 (400)	20.3 (380)	2.1 (380)
Indole-3-carboxylic acid	—COOH	—	13.0 (380)	70.6 (340)	7.7 (360)
Indole-3-acetic acid	—CH ₂ —COOH	—	11.6 (420)	100 (380)	1.9 (360)
Tryptophol	—CH ₂ —CH ₂ OH	—	7.4 (420)	102 (380)	2.7 (360)
Tryptamine	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₂	—	8.5 (420)	158 (370)	3.0 (360)
Tryptophan	—CH ₂ —CH(COOH)—NH ₂	—	9.0 (420)	205 (360)	1.3 (360)
5-Methyltryptophan	—CH ₂ —CH(COOH)—NH ₂	—CH ₃	11.8 (400)	186 (360)	7.1 (360)
N-Acetyltryptamine	—CH ₂ —CH ₂ —NH—CO—CH ₃	—	9.1 (420)	77.3 (380)	2.3 (360)
N-Acetyltryptophan	—CH ₂ —CH(COOH)—NH—CO—CH ₃	—	6.5 (420)	87.6 (380)	1.5 (340)
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	—CH ₂ —COOH	—OH	74.4 (460)	64.7 (380)	8.6 (340) 2.3 (560)
Serotonin (5-hydroxytryptamine)	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₂	—OH	6.2 (380)	32.8 (380)	9.3 (360) 2.2 (560)
5-Hydroxytryptophan	—CH ₂ —CH(COOH)—NH ₂	—OH	8.0 (380)	40.9 (380)	8.3 (340) 2.1 (560)
N-Acetylserotonin	—CH ₂ —CH ₂ —NH—CO—CH ₃	—OH	9.1 (380) 12,6 (460)	56.7 (380)	13.0 (360) 3.4 (560)
5-Methoxyindole-3-acetic acid	—CH ₂ —COOH	—OCH ₃	64.9 (430)	455 (360)	17.8 (340) 28.9 (545)
5-Methoxytryptamine	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₂	—OCH ₃	117 (430)	850 (360)	109 (340) 95.3 (545)
Melatonin	—CH ₂ —CH ₂ —NH—CO—CH ₃	—OCH ₃	74.8 (430)	672 (360)	81.2 (340) 61.0 (545)

Values in parentheses represent the fluorescence maximum in nm. Excitation wave-length: 307 nm. Excitation and emission slit: 1 mm

felt of having a fluorescence reaction making it possible to distinguish between the 5-methoxyindoles and the other indolic compounds present.

In attempting to obtain a more or less specific fluorescence reaction for the 5-methoxyindoles, we studied the fluorescence properties of a number of indoles in different solvent systems. All compounds were measured in a concentration of 5×10^{-5} molar. A Zeiss spectrofluorometer (ZFM4C) was used. An excitation wave-length of 307 nm and slits of 1 mm were applied. The amplification factor of the instrument was kept constant during all measurements. Starting from the fluorescence properties in alkaline media, a marked increase was observed in the fluorescence of the methoxyderivatives, using a mixture of 40% formaldehyde and 1 N NaOH (Table, column II). A far better distinction between methoxy- and hydroxyindoles was found by adding acetic anhydride to an alkaline indole solution (Table, column III). In this solvent system the methoxy compounds show a fluorescence in the yellow part of the spectrum at 545 nm. The 5-hydroxyindoles, including serotonin, do not show any appreciable fluorescence, whereas the indoles without a substituent in the 5-position also have a low fluorescence between 340 and 440 nm.

The mechanism of this reaction deserves further investigation. Work is in progress to use this visible fluorescence of 5-methoxyindoles for the localization of melatonin in pineal organs of mammals and lower vertebrates¹³.

Zusammenfassung. Die Verwendung von 1 N Natronlauge und Essigsäureanhydrid bei der Bestimmung von Indolderivaten mit Hilfe der Fluoreszenzmethode erlaubt eine gute Differenzierung zwischen 5-Methoxyindolderivaten (z.B. Melatonin) und anderen Indolen. Versuche zur Verwendung der neuen Methode in biologischem Material, z.B. Epiphysenschnitten, sind im Gange.

M. G. M. BALEMANS and F. C. G. VAN DE VEERDONK

Zoological Laboratory, University of Utrecht
(The Netherlands), 8th May 1967.

³ The authors are indebted to Prof. J. C. VAN DE KAMER for his encouragement and interest in these studies.

Zur Immunchemie der Klebsiella-Antigene

Bei der serologischen Typendifferenzierung der Klebsiellen sind zwei Antigene von Bedeutung, die somatischen (O-)Antigene und die Kapsel-(K-)Antigene. Mit der spezifischen Kapselreaktion oder durch Agglutination sind bis heute 80 verschiedene K-Typen gefunden worden, die 10 O-Serogruppen angehören¹⁻⁴. Dabei sind alle K-Typen mit gleichem O-Antigen in einer O-Gruppe zusammengefasst. Immunchemische Untersuchungen zu diesem Problem liegen nur von ERIKSEN vor⁵.

Wir haben mit einer systematischen Untersuchung der Klebsiella-Antigene begonnen und an über 70 serologisch

klassifizierten unterschiedlichen Klebsiella-Stämmen Antigenextraktionen vorgenommen, die K- und O-Antigene in reiner Form isoliert und sowohl chemisch als auch serologisch näher untersucht. Eine Trennung der durch

¹ F. KAUFFMANN, Acta path. microbiol. scand. 26, 381 (1949).

² I. ØRSKOV, Acta path. microbiol. scand. 34, 145 (1954).

³ I. DURLAKOVA, A. PRZONDO-HESSEK und J. MARESZ-BABCZYŹYŹN, Arch. Immun. Ter. dosw., Warszawa 8, 645 (1960).

⁴ J. MARESZ-BABCZYŹYŹN, Arch. Immun. Ther. exp., Warszawa 10, 589 (1962).

⁵ J. ERIKSEN, Acta path. microbiol. scand. 66, 71 (1966).

das Phenol-Wasser-Verfahren⁶ gewonnenen Antigene konnten wir in allen Fällen mit Cetavlon⁷ herbeiführen. Cetavlon bildet bekanntlich mit Nucleinsäuren und sauren Polysacchariden in Wasser unlösliche Salze.

Aus den Cetavlon-salzen haben wir nach dem Abtrennen der Nucleinsäure saure Heteropolysaccharide isoliert und deren Bausteine chromatographisch und mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen ermittelt. Als saure Komponente fungiert in den meisten Fällen Glucuronsäure, seltener Galacturonsäure. Die Polysaccharide enthalten ausserdem mindestens 2, maximal 4 weitere Bausteine. Glucose und Galactose sind am häufigsten, dann folgen Mannose, Rhamnose und Fucose. Oft sind mehrere Polysaccharide qualitativ aus den gleichen Bausteinen zusammengesetzt. So kommen in den 9 Klebsiella-Typen K12, 18, 19, 23, 36, 41, 45, 55 und 70 die gleichen Hauptbestandteile Glucuronsäure, Galactose, Glucose und Rhamnose vor. Da serologische Kreuzreaktionen unter diesen Stämmen nur zwischen K12 und K41 beobachtet wurden⁸, dürfte die serologische Spezifität dieser Antigene auf strukturellen Unterschieden beruhen. – In der Agargelpräzipitation reagieren die sauren Polysaccharide nur mit homologen Antiseren, während mit K-heterologen Seren, abgesehen von den bekannten Kreuzreaktionen, keine Präzipitationslinien gebildet werden. Die sauren Polysaccharide sind demnach die K-Antigene der Klebsiellen. Die bereits beschriebenen extrazellulären sauren Polysaccharide von Klebsiellen^{9,10} sind nach unseren Untersuchungsergebnissen als Träger der K-Spezifität anzusehen.

Die O-Antigene, die wir aus den Überständen der Cetavlonfällungen durch Ultrazentrifugation⁶ erhielten, haben demgegenüber eine ganz andere Zusammensetzung. Es handelt sich hierbei um Lipopolysaccharide, die offenbar nach einem ähnlichen, wenn nicht gleichen Prinzip aufgebaut sind wie z.B. die O-Antigene der Salmonellen¹¹. Wir stellten fest, dass die Lipopolysaccharide aller Klebsiella-Typen einer jeweiligen O-Gruppe die gleichen Zuckerbausteine enthalten. In allen untersuchten Klebsiella-O-Antigenen konnten wir 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO), Heptose und Glucosamin nachweisen, wobei wir nicht unterschieden haben zwischen lipoidalem und polysaccharidischem Glucosamin. Dazu kommen als weitere Bestandteile der untersuchten 9 O-Gruppen: Galactose, Glucose, Mannose, Ribose, Rhamnose und eine noch unbekannte Komponente. Bemerkenswert erscheint im Vergleich zur Zusammensetzung der O-Antigene anderer Enterobacteriaceen der relativ hohe Gehalt an Galactose

(ca. 30–45%) in den Klebsiella-O-Gruppen 1, 2, 6, 8 und 9, während Glucose generell nur sehr wenig gefunden wurde. Ob sich hieraus Konsequenzen allgemeinerer Art ergeben hinsichtlich der zur Diskussion stehenden gemeinsamen Polysaccharid-Basalstruktur¹¹ aller Enterobacteriaceen – eine eventuelle direkte Bindung von Galactose an die Heptosephosphat-Grundkette, wie sie für Klebsiella aerogenes A3 bereits vorgeschlagen wurde¹² – bleibt weiteren Untersuchungen, insbesondere der Isolierung und Analyse von Partialhydrolyseprodukten vorbehalten. – In der Agargelpräzipitation und der indirekten Hämagglutination zeigten alle hergestellten O-Antigene gegenüber K-heterologen gruppengleichen Antiseren übereinstimmendes serologisches Verhalten.

Somit besteht zwischen der serologischen Zuordnung der Klebsiellen und der chemischen Zusammensetzung ihrer Antigene ein enger Zusammenhang¹³.

Summary. The capsular (K) and somatic (O) antigens of 72 Klebsiella-type strains were isolated and investigated with respect to their chemical composition and their serological behaviour. The K antigens were found to be acidic heteropolysaccharides carrying serological K specificity. The O antigens are lipopolysaccharides which are O group-specific.

W. NIMMICH und W. MÜNTER

Mikrobiologisch-Immunologische Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie der Universität, Rostock (DDR), 8. Mai 1967.

⁶ O. WESTPHAL und K. JANN, *Meth. Carbohydr. Chem.* 5, 83 (1965).

⁷ A. S. JONES, *Biochim. biophys. Acta* 10, 607 (1953).

⁸ P. R. EDWARDS und W. H. EWING, in *Identification of Enterobacteriaceae* (Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1955), p. 164.

⁹ W. F. DUDMAN und J. F. WILKINSON, *Biochem. J.* 62, 289 (1956).

¹⁰ S. A. BARKER, A. B. FOSTER, S. J. PIRT, I. R. SIDDIQUI und M. STACEY, *Nature* 187, 999 (1958).

¹¹ O. LÜDERITZ, A. M. STAUB und O. WESTPHAL, *Bact. Rev.* 30, 192 (1966).

¹² I. W. SUTHERLAND und F. J. WILKINSON, *Biochim. biophys. Acta* 117, 261 (1966).

¹³ Wir danken Frau Dr. I. ØRSKOV, Statens Seruminstitut Kopenhagen, für die Überlassung der Typenstämmen und Herrn Dr. KLEIST, Institut für Physiologische Chemie der Universität Rostock, für die Durchführung der Ultrazentrifugationen.

Age-Dependent Changes of Acid Mucopolysaccharide Excretion Patterns in Human Urine

Earlier investigations in children^{1,2} established the decrease with advancing age of urinary acid mucopolysaccharide (AMP) excretion/U of creatinine. No studies have been reported as yet showing the age dependent changes of AMP excretion patterns, although several reports have appeared concerning the different AMP contents at various ages^{3–5} of human cartilage and arterial vessels.

Materials and methods. 24 h urines were collected without preservatives from 37 healthy persons of different ages: 7 infants, 7 small children, 7 preadolescents (stage 1–2 according to TANNER⁶), 7 adolescents (stage 5) and 9

adults. The urine specimens were kept deep frozen until processing. The fractionation of AMP was achieved by the following procedure: dialysis of the total 24 h-urine against normal saline → precipitation with cetyltrimethylammonium bromide → washing of the precipitate with

¹ N. DI FERRANTE und C. RICH, *J. Lab. clin. Med.* 48, 491 (1956).

² W. M. TELLER, E. C. BURKE, J. W. ROSEVEAR und B. F. MCKENZIE, *J. Lab. clin. Med.* 59, 95 (1962).

³ M. B. MATHEWS und S. GLAGOV, *J. clin. Invest.* 45, 1103 (1966).

⁴ D. KAPLAN und K. MEYER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 105, 78 (1960).

⁵ E. BUDDHECKE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 318, 33 (1960).

⁶ J. M. TANNER, *Wachstum und Reifung des Menschen* (Thieme Verlag, Stuttgart 1962).