

RICHARD KUHN und ADELINE GAUHE

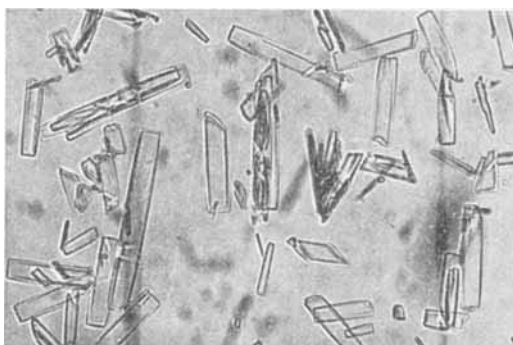
Über ein kristallisiertes, Le^a-aktives Hexasaccharid aus Frauenmilch

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

(Eingegangen am 16. November 1959)

Ein neues, durch Chromatographie an Cellulose-Säulen gewonnenes Hexasaccharid (Lacto-*N*-difucohexaose II) kristallisiert aus Wasser/Methanol in Blättchen, die 4 Moll. Kristallwasser enthalten. Die Hexaose II ist serologisch als Lewis^a-Faktor wirksam. Sie enthält zwei Fucosereste und liefert bei partieller Säurehydrolyse u. a. Lacto-*N*-tetraose. Die Stellung der beiden Fucosereste entsprechend Formel I folgt aus der negativen MORGAN-ELSON-Reaktion und der Bildung von Arabinose nach Oxydation mit Perjodat und anschließender Säurehydrolyse.

Das von uns unter dem Namen Lacto-*N*-difuco-hexaose¹⁾ beschriebene Hexasaccharid, das nicht kristallisiert war, ließ sich durch Säulenchromatographie in zwei Isomere auftrennen. Die Hauptkomponente (von nun an: Lacto-*N*-difucohexaose I) blieb amorph, während die in viel geringerer Menge vorliegende Hexaose (Lacto-*N*-difucohexaose II) in schönen Blättchen (Abbild.) gewonnen werden konnte.



Lacto-*N*-difucohexaose II aus Wasser/Methanol (ca. 600fach)

Für die beiden Hexaosen fanden wir die folgenden, auf Lactose bezogenen *R*-Werte

| | Essigester/Pyridin/Wasser/ Eisessig 5:5:4:1 | Essigester/Pyridin/Wasser 2:1:2 obere Schicht |
|-----------------------------------|--|--|
| Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I | 0.27 | 0.12 |
| Lacto- <i>N</i> -difucohexaose II | 0.30 | 0.14 |

¹⁾ a) R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Liebigs Ann. Chem. **611**, 242 [1958]. b) R. KUHN, Bull. Soc. Chim. biol. **40**, 297 [1958].

Die Hexaose II ist vermutlich identisch mit dem von J. MONTREUIL²⁾ als Polyosid 10 bezeichneten Hexasaccharid.

Jede der beiden von uns aus Frauenmilch isolierten Hexaosen ist aufgebaut aus 1 Mol. *N*-Acetyl-glucosamin, 1 Mol. Glucose, 2 Moll. Galaktose und 2 Moll. Fucose. Demgemäß liefern beide bei der Oxydation mit Chromsäure 3 Moll. Essigsäure (1 *N*-Acetyl- + 2 *C*-Methyl-Gruppen). In beiden Fällen tritt bei partieller Säurehydrolyse unter bevorzugter Abspaltung der zwei Fucosereste die aus 1 Mol. *N*-Acetyl-glucosamin, 1 Mol. Glucose und 2 Moll. Galaktose zusammengesetzte *Lacto-N-tetraose* auf, die kristallisiert erhalten wurde und deren Konstitution durch Permethylierung bereits geklärt ist³⁾. Die Isomerie von Hexaose I und Hexaose II kann somit nur auf einer verschiedenartigen Verknüpfung der Fucosereste mit diesem Tetrasaccharid beruhen.

Da beide Hexaosen MORGAN-ELSON-negativ sind, d. h. nach vorangegangener Einwirkung von verd. heißer Na₂CO₃-Lösung keine Farbreaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd geben, ist anzunehmen, daß in der Hexaose II genau wie in der Hexaose I und in der *Lacto-N-fucopentaose* II, die ebenfalls MORGAN-ELSON-negativ ist, einer der Fucosereste mit dem 4-ständigen Hydroxyl des *Acetylglucosamins* verknüpft ist; eine glykosidische Blockierung dieses Hydroxyls macht nämlich die Bildung eines Acetaminofurans (Chromogens) unmöglich⁴⁾. Angesichts des tiefgreifenden Abbaus, den die Hexaose unter den Bedingungen der alkalischen Vorbehandlung erleidet, ist nicht anzunehmen, daß die Blockierung der Farbreaktion auf der Verknüpfung einer Fucose mit dem 2-ständigen Hydroxyl der kopfständigen Glucose oder der anschließenden Galaktose beruht. Im ersten Fall würde man höchstens eine LOBRY-DE-BRUYN-Umlagerung ohne Abspaltung von Fucose^{1a, 5)} erwarten können, im zweiten Fall eine glucosefreie Difucopentaose. Entsprechende Spaltstücke traten jedoch nicht auf.

Wird die Hexaose II mit Perjodat oxydiert und anschließend mit Säure gespalten, so findet man papierchromatographisch *Arabinose*. Dies kann nur so gedeutet werden, daß der zweite Fucoserest mit dem 3-ständigen Hydroxyl der *Glucose* verknüpft ist und mithin der *Lacto-N-difucohexaose* II, unter Berücksichtigung der für verwandte Oligosaccharide gesicherten Strukturen, die Formel I einer *O*-β-D-Galaktopyranosyl-(1→3)-*O*-[α-L-fucopyranosyl-(1→4)]-2-desoxy-2-acetamino-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-*O*-[α-L-fucopyranosyl-(1→3)]-D-glucopyranose zukommt. Fucose in Verknüpfung mit dem 3-ständigen Hydroxyl der Glucose eines Milchzuckerrestes haben wir bereits für die N-freie *Lacto-difuco-tetraose*⁶⁾ der Frauenmilch nachgewiesen.

Herr Prof. Dr. W. T. J. MORGAN, dem wir Proben der Hexasaccharide sandten, hat am Lister-Institut in London festgestellt, daß die *Lacto-N-difucohexaose* II im serologischen Test noch in einer Verdünnung von 1:10⁵ die Eigenschaften einer Blutgrup-

²⁾ J. MONTREUIL, Bull. Soc. Chim. biol. **39**, 395 [1958].

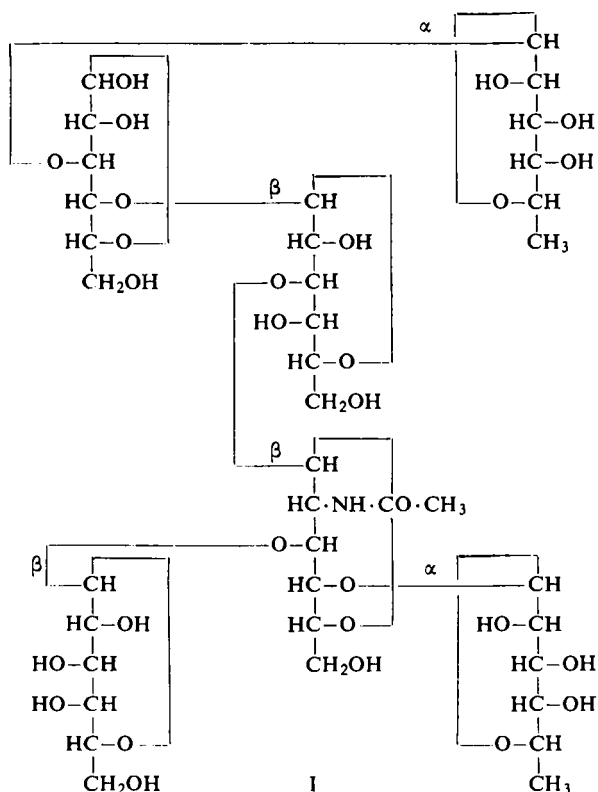
³⁾ R. KUHN und H. H. BAER, Chem. Ber. **89**, 504 [1956].

⁴⁾ R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. **87**, 1138 [1954]; R. KUHN und G. KRÜGER, ebenda **89**, 1473 [1956].

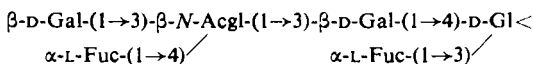
⁵⁾ Vgl. M. L. WOLFROM und W. L. LEWIS, J. Amer. chem. Soc. **50**, 837 [1928].

⁶⁾ R. KUHN und A. GAUHE, Liebigs Ann. Chem. **611**, 249 [1958].

pensubstanz Le^a (Lewis-Faktor a) zeigt⁷⁾. Im Le^b-Test ist sie unwirksam. Von der schwach Le^b-aktiven Lacto-*N*-difucohexaose I ist sie somit auch physiologisch unterscheidbar. Zur chemischen Unterscheidung ist der Perjodat-Säure-Abbau, der mit geringen Substanzmengen papierchromatographisch durchführbar ist und nur im Falle der Hexaose II Arabinose liefert, geeignet.



Abgekürzt (Gl=Glucose, Gal=Galaktose, *N*-Acgl=*N*-Acetyl-D-glucosamin, Fuc=Fucose):



Herrn Prof. Dr. W. T. J. MORGAN haben wir für die serologischen Prüfungen, Frl. D. TSCHAMPEL für vielseitige Unterstützung unserer Arbeit zu danken.

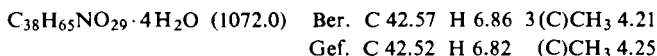
⁷⁾ Briefliche Mitteilung. Es sei vermerkt, daß die von W. M. WATKINS und W. T. J. MORGAN, Nature [London] 180, 1038 [1957], sowie von W. T. J. MORGAN, Naturwissenschaften 46, 181 [1959], gemachten quantitativen Angaben über die Le^a-Aktivität des Hexasaccharids aus Frauenmilch sich auf ein Präparat bezogen, das noch nicht chromatographisch in die Komponenten I und II zerlegt war. Die von II abgetrennte Hexaose I, wie sie jetzt vorliegt, ist viel schwächer aktiv als das frühere Gemisch der Hexasaccharide. Die Le^a-Aktivität der Hexaose I kann durch einen noch immer vorliegenden geringen Gehalt an Hexaose II bedingt sein.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

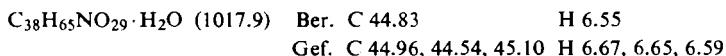
Isolierung: Je 16 g Oligosaccharid-Gemisch (Kohle-Eluat) aus Frauenmilch wurden an Kohle-Celite-Säulen (\varnothing 6.5 cm, Carboraffin C/Celite Nr. 535 1:1, je 200 g) mit Hilfe von Äthanol steigender Konzentration fraktioniert. Die Arbeitstechnik entsprach derjenigen bei der Isolierung der Lacto-*N*-fucopentaose I⁸⁾. Nach Elution der Hauptmenge an Lactose mit 1 / 5-proz. und 1 / 10-proz. Äthanol tritt im Eluat die Lacto-*N*-difucohexaose I auf, zunächst noch von Lactose, dann von Difucotetraose und Fucosidolactose begleitet; im weiteren Verlauf erscheint daneben noch Lacto-*N*-fucopentaose II. Die ersten hexaosehaltigen Fraktionen (10-proz. Äthanol, ca. 900 ccm) enthalten außer Lacto-*N*-difucohexaose I geringe Mengen Lacto-*N*-difucohexaose II, die folgenden Fraktionen (800 ccm) enthalten keine Hexaose II.

Zur Gewinnung des neuen Hexasaccharids haben wir die entsprechenden Fraktionen an Cellulose-Säulen (5 × 50 cm, Linterspulver Nr. 124 Schleicher & Schüll) chromatographiert. Wir brachten ca. 2 g hexaosehaltiges Oligosaccharid-Gemisch als Papieradsorbat auf die mit Essigester/Pyridin/Wasser/Eisessig (5:5:4:1) vorgewaschene Säule auf und entwickelten mit ca. 6.5 l des gleichen Lösungsmittels. Die ersten ca. 4.5 l des Eluats enthielten Lactose, Fucosidolactose, Difucotetraose und mitunter etwas Pentaose II; dann trat die Hexaose II auf, weiterhin ein Gemisch der beiden Hexaosen und zum Schluß Hexaose I. Zur vollständigen Trennung der isomeren Hexasaccharide wurde ein zweites Mal an einer Cellulose-Säule chromatographiert.

Die Hexaose-II-Fractionen haben wir i. Vak. eingengt und mehrfach mit Wasser abgedampft. Der über P₂O₅/KOH getrocknete Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, die Lösung mit Carboraffin entfärbt und über je eine kleine Säule Amberlite IR-120 und IR-45 filtriert. Beim Eindampfen i. Vak. erhielten wir ein kristallines Pulver (300 mg). Umkristallisiert wurde durch Lösen in wenig Wasser, Zufügen von absol. Methanol und Versetzen mit absol. Äthanol in der Wärme bis zur beginnenden Trübung. Beim Erkalten schied sich die Lacto-*N*-difucohexaose II in breiten Stäbchen bzw. rechteckigen dünnen Blättchen (Abbild.) ab. Ausb. 166 mg. Der im Exsikkator getrocknete Zucker enthält 4 Moll. Kristallwasser. $[\alpha]_D^{25} = +68.8^\circ$ ($c = 1$, in Wasser, ohne Mutarotation). Schmp. 218–220° (Zers.).



1 Mol. Kristallwasser wird auch bei energischer Trocknung (24 Stdn. bei 110°, 24 Stdn. bei 130°/10⁻³ Torr) nicht abgegeben.



Ber. Äquiv.-Gew. 1018 Gef. Äquiv.-Gew. 1014 (mit Hypojodit nach MACLEOD)

Totalhydrolyse durch Säure: 5 mg Hexaose II wurden mit 1 ccm *n* H₂SO₄ in einer verschlossenen Ampulle 3 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach Entfernen der Schwefelsäure mit Ba(OH)₂-Lösung wurde gefriergetrocknet. Das Chromatogramm (Essigester/Pyridin/Wasser/Eisessig = 5:5:3:1) zeigte Fucose, Glucose, Galaktose und Glucosamin in denselben Mengenverhältnissen wie nach Hydrolyse der Hexaose I. — In beiden Fällen tritt außerdem eine Substanz mit $R_{\text{Glucosamin} \cdot \text{HCl}} = 0.73$ auf, die mit Anilinphthalat und (schwach) mit Ninhydrin reagiert und die MORGAN-ELSON-Probe gibt. Sie entsteht auch aus anderen Oligosacchariden, in denen *N*-Acetyl-glucosamin- und Galaktose-Reste in bestimmter Weise direkt verknüpft sind, so z. B. aus den Lacto-*N*-triosen I und II, der Lacto-*N*-tetraose, den Lacto-

⁸⁾ R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. **89**, 2514 [1956].

N-fucopentaosen I und II. Es handelt sich um ein Disaccharid mit freier NH₂-Gruppe, dessen Hydrochlorid wir aus den Partialhydrolysaten zusammen mit Glucosamin·HCl durch Ionenaustauscher abtrennen und isolieren konnten. Die Acetylierung mit Acetanhydrid und Triäthylamin in 50-proz. Methanol lieferte *Lacto-N-biose II* [2-Desoxy-2-acetamino-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-galaktose], die wir schon durch partielle Säurehydrolyse von *Lacto-N-tetraose* erhalten hatten^{3,9)}. Die Substanz von $R_{GA} \cdot HCl = 0.73$ ist danach das entsprechende Disaccharid mit freier NH₂-Gruppe.

Partialhydrolyse durch Säure: 10 mg Hexaose II wurden mit 1 ccm $n_{10} HCl$ 10 Min. im siedenden Wasserbad gehalten, rasch abgekühlt und durch Schütteln mit etwas Amberlite IR-45 neutralisiert. Die Lösung wurde gefriergetrocknet. Die Chromatographie des Rückstands zeigte: *Fucose* und *Lacto-N-tetraose* neben geringen Mengen von Lactose, *Lacto-N-biose I* sowie den *Lacto-N-triosen I* und II. Bei kürzerer Hydrolysendauer (5 Min.) findet sich im Chromatogramm überdies eine Substanz, die etwa den gleichen $R_{Lactose}$ -Wert wie *Lacto-N-fucopentaose II* besitzt, im Gegensatz zu dieser aber MORGAN-ELSON-positiv ist. Es dürfte sich um die durch Abspaltung des Fucoserestes vom *N*-Acetyl-glucosaminrest entstandene Pentaose handeln.

Der Trockenrückstand eines auf dieselbe Weise hergestellten Hydrolysats von 60 mg Hexaose II wurde auf 12 halben Bogen Schleicher & Schüll-Papier 2043b aufgetragen und chromatographiert (Essigester/Pyridin/Wasser 2:1:2 ob. Schicht, 3 Tage). Die die *Lacto-N-tetraose* enthaltenden Streifen wurden mit Wasser eluiert. Die mit Carboraffin und Ionenaustauschern behandelte Lösung ergab bei der Gefriertrocknung 18 mg amorphen Rückstand, der aus Wasser/Äthanol Büschel feiner Nadeln lieferte (12 mg). Das IR-Spektrum stimmte mit dem von authentischer *Lacto-N-tetraose* überein.

Alkalischer Abbau: 10 mg Hexaose II wurden mit 1 ccm 0.05 *n* Na₂CO₃ 3 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Die mit Amberlite IR-120 und IR-45 entionisierte Lösung enthielt als Hauptabbauprodukte *Fucose* und *Galaktose*, ferner 3 Substanzen mit $R_{Lactose}$ -Werten < 0.4 (Essigester/Pyridin/Wasser 2:1:2 ob. Sch.). Die langsamste, nur in geringer Menge vorhandene, zeigte eine blaurote Naphthoresorcin-Reaktion und dürfte die der Hexaose II entsprechende Ketose (*Fructose* an Stelle von *Glucose*) sein. Bei längerer Einwirkungsdauer der Natriumcarbonatlösung (10 Min. im siedenden Wasserbad) treten diese 3 langsamen Flecken im Chromatogramm zurück, dafür tritt eine Substanz von etwas geringerem R_F -Wert als *Fucose* auf, die rote Naphthoresorcin-Reaktion gibt (*Tagatose*?).

Perjodat-Oxydation und anschließende Säurehydrolyse: Die Lösung von 50 mg Hexaose II in 1.8 ccm 0.25 *n* NaJO₄-Lösung (9 Moll.) wurde auf 10 ccm aufgefüllt und im Dunkeln aufbewahrt. Nach 5 bzw. 48 Stdn. wurden je 3 ccm entnommen und, nach Zerstörung von überschüssigem Perjodat mit Äthylenglykol, über 2 kleine Säulen (1.4 × 5 cm) IR-120 und IR-45 filtriert. Zur Hydrolyse wurde der Rückstand der gefriergetrockneten Lösung jeweils 4 Stdn. mit 4 ccm 1 *n* H₂SO₄ im siedenden Wasserbad erwärmt. In der mit Ba(OH)₂-Lösung auf *pH* 6.0 gebrachten Lösung findet man chromatographisch *Arabinose*, *Galaktose* und *Glucosamin*; im Kontrollversuch mit Hexaose I nur *Galaktose* und *Glucosamin·HCl*.

⁹⁾ R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 87, 289 [1954].