

RICHARD KUHN und HERBERT WIEGANDT

Die Konstitution der Ganglio-N-tetraose und des Gangliosids G_I

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

(Eingegangen am 21. September 1962)

Aus Rinder- und Menschenhirn wurden fünf Ganglioside isoliert, die je 1 Mol. Glucose, 2 Mol. Galaktose und 1 Mol. N-Acetyl-galaktosamin enthalten. Das aus diesen vier Zuckern aufgebaute Tetrasaccharid (Ganglio-N-tetraose) ließ sich in Substanz gewinnen und seine Struktur klären; dabei wurden auch beide Trisaccharide (Ganglio-N-triose I und II) sowie alle drei Disaccharide (Ganglio-N-biose I und II, Lactose) erhalten, die am Aufbau des Tetrasaccharids beteiligt sind. — Die Ganglioside G_{II} und G_{III}, die je 2 Mol. Lactaminsäure (N-Acetyl-neuraminsäure) enthalten, und das Gangliosid G_{IV} werden durch RDE (Neuramidase) nur bis zum Gangliosid G_I abgebaut. Die Unspaltbarkeit des letzteren (Formel S. 875) wird darauf zurückgeführt, daß das Ferment die ketosidische Bindung an C-3 nicht zu lösen vermag, wenn sich an C-4 des Galaktoseres (in *cis*-Stellung) der raumbeanspruchende Rest der Ganglio-N-biose I befindet. Die aus dem unspaltbaren Gangliosid G_I erhaltene 3-Lactaminygalaktose ist durch RDE leicht spaltbar*).

Vor einem Jahr haben wir kurz über eine Gruppe von Gangliosiden berichtet, die vier Zuckerreste pro Mol. enthalten¹⁾. Die seither gewonnenen Einblicke in deren Konstitution werden hier beschrieben^{*)}. Vor kurzem haben J. A. DAIN, H. WEICKER, G. SCHMIDT und S. J. TANNHAUSER²⁾ durch Fraktionierung von Gangliosiden aus Rinderhirn an Kieselgel-Säulen vier Komponenten erhalten, deren Bausteinanalysen wie die unsrigen für ein molares Verhältnis von Glucose:Galaktose:Galaktosamin = 1 : 2 : 1 sprechen. Auch die für den Gehalt an Lactaminsäure (N-Acetyl-neuraminsäure) angegebenen Zahlen stimmen mit den von uns ermittelten weitgehend überein. Es ist daher wahrscheinlich, daß die in beiden Laboratorien isolierten vier Ganglioside hinsichtlich des Kohlenhydratbereichs identisch sind. E. KLENK, dem man die Grundlagen der Chemie der Ganglioside verdankt, kam in Einzelheiten zu andersartigen Ergebnissen, auf die S. 870 eingegangen wird.

ISOLIERUNG DER GANGLIOSIDE

Die Ganglioside wurden sowohl aus Menschen- wie aus Rinderhirn auf drei verschiedenen Wegen erhalten: A. Extraktion mit Phosphatpuffer und Chromatographie

^{*)} Die hauptsächlichen Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorgetragen von R. KUHN auf dem Internat. Symposium on Carbohydrate Chemistry in Birmingham, England, am 17. Juli 1962.

¹⁾ R. KUHN und H. WIEGANDT, gem. mit H. EGGE, Angew. Chem. 73, 580 [1961].

²⁾ Cerebral Sphingolipidoses A Symposium on Tay Sachs' Disease and Allied Disorders, Academic Press, New York, 1962, S. 289. H. WEICKER, J. A. DAIN, G. SCHMIDT und S. J. TANNHAUSER, Federat. Proc. 19 A, 21 g [1960].

an Calciumphosphat-Säulen, B. Phenolextraktion, C. Extraktion mit Chloroform/Methanol. Die Auf trennung in die einzelnen Komponenten erfolgte im Falle B und C an Silicagel-Säulen.

Aus beiden Ausgangsmaterialien wurden, neben einem als G₀ bezeichneten, sialinsäurehaltigen Sphingolipid, das nur in geringer Menge anfiel, fünf Ganglioside rein dargestellt (Dünnschichtchromatogramme in Abbild. 1). Sie werden, nach der Aufeinanderfolge auf dem Chromatogramm, bezeichnet¹⁾ als: G₀, G_I, G_{II}, G_{III}, G_{IV} und G_V.

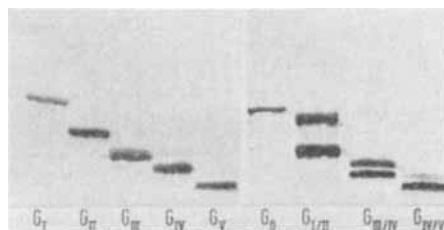


Abbildung 1. Dünnschichtchromatogramme der Ganglioside auf Kieselgel G (nach E. STAHL; E. Merck, 3 Std. bei 130° aktiviert) in Propanol/Wasser (7 : 3)^{1)*}. Laufzeit 5 Std., Anfärbung mit Ehrlich-Reagenz bei 110°

Die Aufbereitungsmethoden A und B ergaben praktisch kein G_I, sondern nur die höheren Ganglioside. Das Gangliosid G_I, auch mittlere Ganglioside, können aus höheren während der Extraktion mit CHCl₃/CH₃OH in der Hitze (Methode C) entstanden sein. Es wurde gefunden, daß schon geringe Mengen Wasser bei höherer Temperatur mit Leichtigkeit aus G_{II}, G_{III}, G_{IV} und G_V Lactaminsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) abspalten, wobei G_I entsteht. Von diesem leiten sich alle höheren Ganglioside, die hier beschrieben werden, ab. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Komponenten beruhen auf der Zahl bzw. Stellung der Lactaminsäure-Reste. Die Elementaranalysen und den Gehalt an Lactaminsäure (LS) findet man in Tab. 4 (S. 878). Danach sind die Ganglioside G_{II} und G_{III} Isomere, die je zwei LS-Reste enthalten, während G_{IV} drei LS-Reste enthält.

In wäßrigen Medien spalten die freien Ganglioside, die stark sauer reagieren, Lactaminsäure ab. Die „Eigenhydrolyse“ ist von der Temperatur und von der Konzentration der Lösungen bzw. vom pH-Wert abhängig. In Form ihrer Salze bzw. in neutralen wäßrigen Lösungen sind auch die LS-reichen Ganglioside bei Raumtemperatur stabil.

SPALTUNG DER GANGLIOSIDE DURCH RDE

Bei pH 5 – 6 werden die Ganglioside II – V durch das receptor destroying enzyme aus Choleravibrionen (RDE, Neuraminidase) leicht unter Freisetzung von Lactaminsäure bis zu G_I gespalten, das auch bei hoher Dosierung des Enzyms unverändert

*¹⁾ E. STAHL, Angew. Chem. 73, 646 [1961].

bleibt. Es wurde gefunden (Abbild. 2), daß bei der enzymatischen Hydrolyse von G_V neben LS zunächst G_{IV} entsteht, das seinerseits durch RDE zu LS und G_{III} , und dieses weiter zu LS und G_I gespalten wird; das intermediäre Auftreten von G_{II} läßt sich

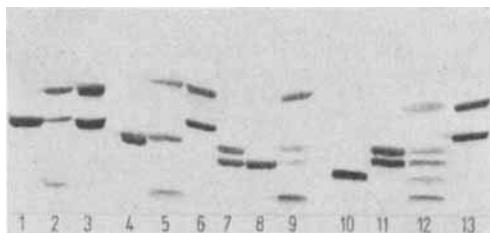


Abbildung 2. Dünnschichtchromatogramme (Technik vgl. Abbild. 1) des RDE-Abbaus der Ganglioside II—V. Je 2 mg Gangliosid in 150 µl Wasser, mit Na_2CO_3 auf pH 5.5 gebracht. Davon je 100 µl mit 10 µl Enzymlösung (1 Ampulle RDE, Behring-Werke/Marburg, Op. Nr. 21A, mit Glucose und Lactose stabilisiert; gelöst in 2.5 ml 0.01 M CaCl_2) bei 37° inkubiert. Die 50 µl-Blindproben (ohne Enzym) wurden in gleicher Weise inkubiert.

- 1: Gangliosid G_{II} (Blindprobe nach $1\frac{1}{2}$ Stdn.)
- 2: G_{II} nach $1\frac{1}{2}$ stdg. Einwirkung von RDE; Bildung von G_I und LS. Nach 12stdg. Einwirkung war kein G_{II} mehr sichtbar
- 3: Gemisch von G_I und G_{II}
- 4: Gangliosid G_{III} (Blindprobe nach $1\frac{1}{2}$ Stdn.)
- 5: G_{III} nach $1\frac{1}{2}$ stdg. Einwirkung von RDE; Bildung von G_I und LS. Nach 12stdg. Einwirkung war alles G_{III} verschwunden
- 6: Gemisch von G_I und G_{II}
- 7: Gemisch von G_{III} und G_{IV}
- 8: Gangliosid G_{IV} (Blindprobe nach $1\frac{1}{2}$ Stdn.)
- 9: G_{IV} nach $1\frac{1}{2}$ stdg. Einwirkung von RDE; Bildung von G_I , G_{III} und LS. Nach 12stdg. Einwirkung waren nur noch G_I und LS sichtbar
- 10: Gangliosid G_V (Blindprobe nach $1\frac{1}{2}$ Stdn.)
- 11: Gemisch von G_{III} und G_{IV}
- 12: G_V nach $1\frac{1}{2}$ stdg. Einwirkung von RDE; neben etwas unangegriffenem G_V sind zu erkennen G_{IV} , G_{III} , G_I und LS. Mit nur 2 statt 10 µl Enzymlösung beobachtete man nach $3/4$ Stdn. noch kein G_I und G_{III} , aber schon stark G_{IV} und LS; nach $4\frac{1}{4}$ Stdn. war G_V verschwunden, G_{IV} nur noch schwach, G_{III} und G_I stark sichtbar
- 13: Gemisch von G_I und G_{II}

dabei nicht nachweisen. Die Ganglioside G_{IV} und G_V leiten sich demnach von G_{III} ab. Im Gangliosid G_{II} ist die Stellung des zweiten LS-Restes offenbar eine andere als in G_{III} :



Die Einwirkung von RDE auf die LS-haltigen Oligosaccharide, die aus den Gangliosiden G_I bis G_{IV} nach Entfernung von Fettsäure und Sphingosin erhalten wurden (vgl. S. 871 ff.), ergab ein genau analoges Bild der wechselseitigen Beziehungen.

BESTIMMUNG DER ZUCKER-BAUSTEINE NACH TOTALHYDROLYSE

Zur Spaltung diente 80-proz. Ameisensäure bei 100°. Nach diesem Verfahren, das die Zucker schont aber wegen des Eintritts von Formylgruppen eine Nachhydrolyse mit 0.2 n HCl erfordert (S. 879), fand Herr E. RÖHM, daß die Ganglioside G_I bis G_{IV} je vier Moll. Zucker enthalten, nämlich Glucose, Galaktose und Galaktosamin im Molverhältnis 1 : 2 : 1 (Tab. 1).

Tab. 1. Quantitative Bestimmung der Zucker in den Gangliosiden G_I bis G_{IV}. Angegeben sind mg Zucker, die einerseits nach Spaltung mit Ameisensäure gefunden wurden, andererseits aus den Einwagen berechnet waren, wenn man die in Tab. 4 angegebenen Mol.-Gewichte und ein Verhältnis G_I : Gal : GalN = 1 : 2 : 1 annahm

	G _I	Gal	GalN	G _I : Gal : GalN
G _I	Ber. 3.12	6.24	3.10	
	Gef. 2.32	4.84	2.52	1.00 : 2.08 : 1.08
G _{II}	Ber. 3.44	6.88	3.42	
	Gef. 3.42	6.10	2.29	1.00 : 1.79 : 0.67
	Gef. 3.00	5.94	2.37	1.00 : 1.98 : 0.79
G _{III}	Ber. 2.97	5.94	2.95	
	Gef. 2.98	5.90	2.71	1.00 : 1.98 : 0.90
G _{IV}	Ber. 0.71	1.43	0.71	
	Gef. 0.62	1.28	0.97	1.00 : 2.06 : 0.97

In Übereinstimmung mit diesen Verhältniszahlen stehen diejenigen, die für Ganglio-N-tetraose (gef. 1.00 : 1.86 : 0.73) in gleicher Weise ermittelt wurden. Für Lacto-N-tetraose ergab eine Parallelbestimmung G_I : Gal : GN = 1.00 : 1.82 : 0.96.

PARTIELLE SÄUREHYDROLYSE

Das Gangliosid G_I verliert beim Erwärmen mit verd. Mineralsäure (z. B. n/100 H₂SO₄) die durch RDE nicht abspaltbare Lactamsäure, wodurch das Des-LS-gangliosid in Substanz erhältlich ist. Dieses enthält, neben Fettsäuren und Sphingosin, noch alle vier Zucker, gibt aber keine Sialinsäure-Reaktionen mehr. Mit stärkerer Säure (z. B. n/10 H₂SO₄ bei 100°) wird Sphingosin abgespalten und es treten freie Zucker auf, darunter zwei Disaccharide. Das eine davon ist Lactose ($[\alpha]_D^{25} : +53.6^\circ$ in Wasser, R_F-Wert, spaltbar durch krist. β-Galaktosidase zu Glucose und Galaktose). Das zweite Disaccharid, die Ganglio-N-biose I, kristallisiert aus wäßrigem Methanol in strahligen Kristallbündeln, $[\alpha]_D^{25} : +24^\circ$ (in Wasser), und gibt bei der Säurehydrolyse Galaktose und Galaktosamin.

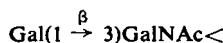
KONSTITUTION DER GANGLIO-N-BIOSE I

Für die Struktur Gal → GalNAc < mit reduzierendem Aminozucker sprechen:

- Das Disaccharid wird durch krist. β-Galaktosidase, wenn auch bedeutend langsamer als Lactose, gespalten; dabei treten Galaktose und N-Acetyl-galaktosamin auf.
- Nach Hydrierung mit NaBH₄ oder mit Pt/H₂ und saurer Hydrolyse findet man als einzige anilinphthalat-positive Substanz Galaktose.
- Bei Einwirkung von verd. Alkali wird das N-Acetyl-galaktosamin schon bei Raumtemperatur unter Chromogenbildung zerstört und es ist nur noch Galaktose mit Anilinphthalat nachweisbar. Die Struktur GalNAc → Gal < ist nach diesen Befunden auszuschließen.

Hinsichtlich der Verknüpfungsstelle ergab sich: d) Beim Perjodat-Abbau der Ganglio-*N*-biose I bleibt *N*-Acetyl-galaktosamin erhalten, sofern man das Perjodat nicht zu lange³⁾ einwirken läßt; dies spricht gegen 5- oder 6-Stellung von Galaktose am Galaktosamin. e) Die Morgan-Elson-Reaktion wird vom Disaccharid schon in der Kälte gegeben, wobei freies Chromogen (nicht Galaktosido-Chromogen) auftritt; bei 6-Stellung des Galaktoserestes war, erst in der Wärme, die Bildung von Galaktosido-Chromogen zu erwarten; bei 4-Stellung sollte die Morgan-Elson-Reaktion ausbleiben⁴⁾. Der Galaktoserest kann demnach nur in 3-Stellung stehen, worauf schon die unter c) angeführte Alkalilabilität hinwies.

Die Ganglio-*N*-biose I bildet mit $K_2B_4O_7$ -Lösung bei 100° Chromogen⁵⁾, was den Nachweis geringer Mengen auf Papier (vgl. S. 879) erlaubt. Lacto-*N*-tetraose, Ganglio-*N*-tetraose, Lacto-*N*-triose I und II und Ganglio-*N*-biose II geben die Reaktion nicht, obwohl sie nach Erhitzen mit Na_2CO_3 -Lösung mit Ehrlich-Aldehyd Farbstoff liefern. Mit $K_2B_4O_7$ bilden Chromogene: *N*-Acetyl-glucosamin und *N*-Acetyl-galaktosamin sowie Oligosaccharide, welche diese Acetaminozucker, die nicht in 4-Stellung substituiert sein dürfen, als reduzierendes Ende tragen: $Gal(1 \rightarrow 6)GNAc$, Lacto-*N*-biose I, Ganglio-*N*-biose I. Daraus und aus der Spaltbarkeit durch β -Galaktosidase sowie dem geringen Drehungsvermögen ($[\alpha]_D: +24^\circ$) folgt, daß die Ganglio-*N*-biose I das folgende β -Disaccharid ist:



Das entsprechende α -Disaccharid war als Spaltstück von Blutgruppensubstanzen kurz erwähnt⁶⁾. Eine von Herrn Prof. W. T. J. MORGAN freundlichst überlassene Probe (amorph) war mit unserem, aus Gangliosiden erhaltenen, krist. β -Disaccharid nach dem Verhalten gegen Alkali, der $K_2B_4O_7$ -Reaktion und dem R_F -Wert ($R_{Lactose} = 1.22$ in Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser = 5 : 5 : 1 : 3) identisch. Neuerdings⁷⁾ wurde die Substanz auch am Lister-Institut kristallisiert erhalten.

Einem alkalilabilen Disaccharid der Struktur GalNAc(1 → 3)Gal, das E. KLENK⁸⁾ als Produkt der partiellen Hydrolyse von Gangliosiden beschreibt, sind wir nicht begegnet. Unter den von uns isolierten Gangliosiden befindet sich auch keines, das frei von Galaktosamin⁹⁾ ist. Eine weitere Diskrepanz besteht darin, daß wir unter den durch verschiedene Abbaureaktionen gewonnenen Oligosacchariden in keinem Falle eine Galaktosido-galaktose⁸⁾ erkennen konnten. Die von E. KLENK⁹⁾ angenommene Bindung von *N*-Acetyl-neuraminsäure an *N*-Acetyl-galaktosamin kommt aus den S. 876 erörterten Gründen für das Gangliosid G₁ nicht in Betracht. — Unser G₁ ist ohne Zweifel identisch mit der früher als G₂ bezeichneten Komponente, die nur

³⁾ Vgl. R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. 87, 292, 1556 [1954].

⁴⁾ R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 87, 1138 [1954].

⁵⁾ J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER und L. F. LELOIR, J. biol. Chemistry 217, 959 [1955].

⁶⁾ W. T. J. MORGAN, Naturwissenschaften 46, 187 [1959]; W. T. J. MORGAN, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B. 151, 320 [1960].

⁷⁾ Briefliche Mitteil. von Prof. W. T. J. MORGAN (14. Aug. 1962), in der die Verbindung als β -Disaccharid bezeichnet wird.

⁸⁾ E. KLENK und W. GIELEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 326, 144 [1961].

⁹⁾ E. KLENK und W. GIELEN, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 283 [1960]; 323, 126 [1961].

einen Galaktoserest zu enthalten schien und für die eine Bindung von *N*-Acetylgalaktosamin an Glucose angenommen worden war¹⁰⁾.

Die Bildung von Gal(1→3)GalNAc [Ganglio-*N*-biose I] und von Gal(1→4)Gl [Lactose] bei der partiellen Säurehydrolyse beweist, daß damit beide Gal-Reste der von uns isolierten Ganglioside erfaßt sind. Ein und derselbe Gal-Rest kann nicht Baustein der beiden Disaccharide sein. Das Ergebnis der Bausteinanalyse (2 Moll. Galaktose) wird somit durch dasjenige der partiellen Säurehydrolyse bestätigt. In welcher Weise die Ganglio-*N*-biose I mit der Lactose zur Ganglio-*N*-tetraose vereinigt ist, ließ sich durch weitere Abbaureaktionen klären.

ACETOLYSE

Beim Abbau mit Eisessig/Acetanhydrid und etwas konz. Schwefelsäure wird nur teilweise Lactaminsäure abgespalten, so daß LS-haltige Oligosaccharide auftreten¹¹⁾. Durch verd. Mineralsäuren (z. B. 0.1*n* H₂SO₄ bei 80°) lassen sich daraus die LS-Reste abspalten, so daß auch die entsprechenden freien Oligosaccharide erhältlich sind; darunter das intakte Tetrasaccharid, das wir in Analogie zur Lacto-*N*-tetraose¹²⁾ als Ganglio-*N*-tetraose bezeichnen, sowie weitere Bruchstücke, in denen die gegen saure Hydrolyse anfällige Bindung zwischen Lactose und Ganglio-*N*-biose I noch intakt ist.

Die erhaltenen LS-haltigen Zucker sind in Tab. 2 geordnet nach ihren *R*-Werten, bezogen auf LS(2→3')Lactose (*R*_{LS-L} = 1.00) in Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser = 5:5:1:3 (Laufmittel A). In dieser Reihenfolge wurden gefunden:

1) LS(2→3)Galaktose als einziges LS-Monosaccharid. Dieselbe Substanz, die bei der Hydrolyse nur LS und Gal liefert, konnten wir auch durch Acetolyse von LS(2→3')-

Tab. 2. LS-haltige Zucker aus den Gangliosiden G_I–G_{IV}

Nr.	Substanz	<i>R</i> _{LS-L}	% LS Ber.	% LS Gef.	RDE- Spaltung	Perjodat- Abbau
	Lactaminsäure (LS)	1.66				
1	LS(2→3)Galaktose	1.33	65.6	55.3	++++	Lyxose
2	LS-Ganglio- <i>N</i> -biose II	1.08			(-)	
3	LS(2→3')Lactose	1.00			+++	Gal
4	LS-Ganglio- <i>N</i> -triose II	0.85 *)			(-)	
5	LS-Ganglio- <i>N</i> -tetraose	0.56	31.0	30.1	(-)	Gal, GalN
6	LS.LS-Ganglio- <i>N</i> -tetraose aus Gangliosid G _{II}	0.47	47.8	46.9	+++ **)	Gal, GalN
7	LS.LS.Ganglio- <i>N</i> -tetraose aus Gangliosid G _{III}	ca. 0.20	47.8	44.4	+++ **)	Gal, GalN
8	LS.LS.LS-Ganglio- <i>N</i> -tetraose aus Gangliosid G _{IV}	ca. 0.12	55.3	53.2	+++ **)	Gal, GalN

*) Aus Gangliosid G_I; aus G_I wurde durch Acetolyse bisher nur ein Gemisch der LS-Triosen I und II mit einem Doppelfleck von 0.76–0.93 erhalten.

**) Spaltbar nur bis zu LS-Ganglio-*N*-tetraose.

10) R. KUHN und Mitarbb., Angew. Chem. 72, 805 [1960]. Die dort S. 809 angegebene Strukturformel ist zu ersetzen durch diejenige auf S. 875 dieser Arbeit.

11) Diese lassen sich zum Teil auch durch Ozon-Abbau der Ganglioside gewinnen. Auf die Technik des Abbaus, die Theorie der Fragmentierungsreaktion und weitere Beispiele wird H. WIEGANDT gesondert eingehen.

12) R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 86, 827 [1953].

Lactose (aus Frauenmilch bzw. Kuhcolostrum)¹³⁾ gewinnen. Da die LS-Galaktose nach Abbau mit Perjodat und Säurehydrolyse Lyxose liefert, steht die Lactaminsäure in 3-Stellung der Galaktose. Sie wird durch RDE (Neuraminidase) sehr leicht abgespalten.

In Tab. 2 folgen die beiden LS-Disaccharide Nr. 2 und 3, deren Trennung schwierig ist, während die daraus durch partielle Säurehydrolyse hervorgehenden Disaccharide gut trennbar sind.

2) LS-Ganglio-*N*-biose II überwiegt bei weitem im Gemisch der LS-Disaccharide. Sie ist durch RDE nicht spaltbar, liefert aber mit verd. Säure ein anilinphthalat- und Morgan-Elson-positives Disaccharid, dessen *R*_F-Wert zwischen dem der Lactose und der Ganglio-*N*-biose I liegt. Die Ganglio-*N*-biose II gibt bei 7 stdg. Hydrolyse mit 1*n* H₂SO₄ bei 100° Galaktose und Galaktosamin. Ihre Stabilität gegen Alkali ist sehr viel größer als die der *N*-Biose I (nach 1 Stde. mit 0.1*n* Na₂CO₃ bei 100° war noch nicht alle *N*-Biose II zerfallen; man fand daneben GalNAc und dessen drei Chromogene, aber keine Galaktose). Mit K₂B₄O₇-Lösung bei 100° bildet die *N*-Biose II kein Ehrlich-positives Chromogen.

3) LS(2→3')Lactose entsteht bei der Acetolyse nur in geringen Mengen.

4) LS-Ganglio-*N*-triose II entsteht aus dem Gangliosid G_I neben LS-Ganglio-*N*-triose I, deren völlige Abtrennung noch nicht gelang. In Tab. 2 ist unter Nr. 4 ein *R*-Wert angegeben für ein Präparat von LS-Ganglio-*N*-triose II, das aus dem S. 876 erwähnten Gangliosid G₀ gewonnen war. Da in G₀ der endständige Galaktoserest der Tetraose fehlt, tritt hier die LS-Triose II frei von LS-Triose I auf.

Die beiden LS-freien Ganglio-*N*-triosen lassen sich gut trennen. Sie sind anilinphthalat- und Morgan-Elson-positiv, geben aber kein Chromogen mit K₂B₄O₇-Lösung bei 100°. Die *N*-Triose I bildet im Gegensatz zur *N*-Triose II bei der Säurehydrolyse keine Glucose.

5) LS-Ganglio-*N*-tetraose. Diese ist gut in größeren Mengen darstellbar. Sie setzt sich aus 1 Mol. Glucose, 2 Moll. Galaktose, 1 Mol. *N*-Acetyl-galaktosamin und 1 Mol. Lactaminsäure zusammen. Durch Säurehydrolyse (nicht durch RDE-Einwirkung) geht aus ihr das LS-freie Tetrasaccharid, die Ganglio-*N*-tetraose, hervor.

6) Die aus G_{II} erhaltene LS.LS-Ganglio-*N*-tetraose ist isomer mit der

7) LS.LS-Tetraose, die aus G_{III} erhalten wurde. Der Unterschied der *R*-Werte ist beträchtlich.

8) Eine LS.LS.LS-Tetraose, die durch Abbau von G_{IV} gewonnen werden konnte. Durch RDE werden nur zwei von den drei LS-Resten abgespalten.

Für die aus den 8 LS-haltigen Zuckern durch verd. Säure erhaltenen LS-freien Zucker bringt Abbild. 3 die chromatographische Charakteristik. Es sei hervorgehoben, daß die Ausbeuten an Ganglio-*N*-tetraose und an den beiden *N*-Triosen bei partiellen Hydrolysen sehr viel geringer sind, solange das Oligosaccharid noch an Sphingosin gebunden ist.

¹³⁾ R. KUHN und R. BROSSMER, Chem. Ber. 92, 1667 [1959].

Tab. 3. Die aus Gangliosid G_I erhaltenen Oligosaccharide

Name	Formel	<i>R</i> _{Gal} ^{a)}	[α] _D
Ganglio- <i>N</i> -tetraose	Gal(1→3)GalNAc(1→4)Gal(1→4)Gl	0.20	+13.9°
Ganglio- <i>N</i> -triose I	Gal(1→3)GalNAc(1→4)Gal	0.38	+12°
Ganglio- <i>N</i> -triose II	GalNAc(1→4)Gal(1→4)Gl	0.52	+17°
Ganglio- <i>N</i> -biose I	Gal(1→3)GalNAc	0.85	+24°
Ganglio- <i>N</i> -biose II	GalNAc(1→4)Gal	0.78	
Lactose	Gal(1→4)Gl	0.70	+54°

^{a)} in Laufmittel A.

- 1 und 9: Glucose, Galaktose und Lactose
 (zur Markierung)
 2 Ganglio-*N*-tetraose
 3 Ganglio-*N*-triose I
 4 Ganglio-*N*-triose II
 5 Lactose
 6 Ganglio-*N*-biose II
 7 Ganglio-*N*-biose I
 8 Glucose und Galaktose (durch Abbau gewonnen)

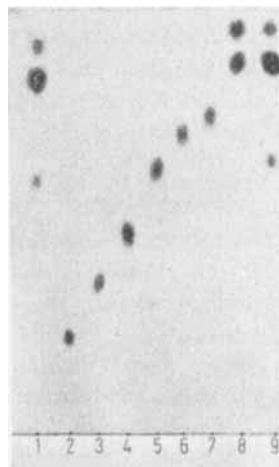


Abbildung 3. Papierchromatogramm [Schleicher & Schüll 2043 b mgl., in Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser (5 : 5 : 1 : 3); Laufzeit 42 Stdn., Anfärbung mit Anilinhydrogenphthalat] der aus dem Gangliosid G_I gewonnenen lactaminsäure-freien Oligosaccharide

PERJODAT-SPALTUNGEN

Im Gangliosid G_I wird ein Gal-Rest (rasch) und der Gl-Rest (langsamer) von Perjodat zerstört. Abgesehen vom 4-ständigen Gal-Rest (Lactose) trägt also die Glucose keinen weiteren Substituenten in 2- oder 3-Stellung. Der andere Gal-Rest von G_I bleibt bei der Perjodat-Spaltung erhalten. Auch in der LS-Ganglio-*N*-tetraose wird ein Gal-Rest nicht angegriffen.

Wird jedoch Ganglio-*N*-tetraose mit Perjodat behandelt (und anschließend mit Säure hydrolysiert), so werden neben Gl beide Gal-Reste gespalten und man findet nur noch Galaktosamin unverändert. Letzteres hat durch die Substitution in 3-Stellung (vgl. die Konstitution der Ganglio-*N*-biose I, S. 869) keine Glykol-Gruppierung mehr. Daß Galaktose im Falle der LS-Ganglio-*N*-tetraose übrig bleibt, nicht aber im Falle der Ganglio-*N*-tetraose, ist ein weiterer Beweis für die Bindung von LS an Galaktose.

Wurde nach Perjodat-Spaltung der *N*-Tetraose mit KBH₄ reduziert, so fand man an weiteren Bruchstücken: Erythrit (aus dem Gl-Rest, der in 4-Stellung substituiert ist; vgl. die Isolierung von Lactose), Glycerin (aus dem endständigen Gal-Rest) und Threit, der nur dem mittelständigen Gal-Rest entstammen kann. Reduzierte man

die *N*-Tetraose schon vor der Perjodat-Spaltung mit KBH_4 , so trat nach erfolgtem Abbau und neuerlicher Reduktion mit KBH_4 erwartungsgemäß kein Erythrit mehr auf, sondern nur Glycerin und Threit. Auch aus Ganglio-*N*-triose I und Ganglio-*N*-biose II wurden mit $\text{KJO}_4/\text{KBH}_4$ Glycerin und Threit erhalten. Der zur chromatographischen Identifizierung dienende Threit war aus (+)-Weinsäure-diäthylester durch Reduktion mit LiAlH_4 gewonnen worden. Zum Vergleich haben wir auch Gl(1→4)Gal (Lyco-biose)¹⁴⁾ gespalten, die ebenfalls Threit lieferte.

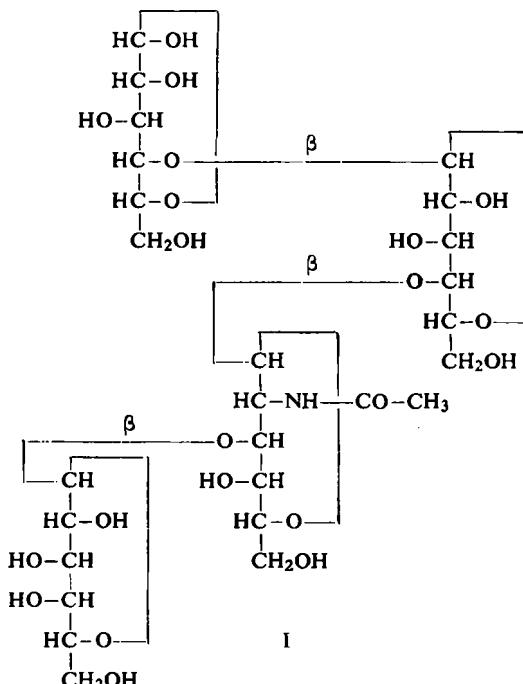
STRUKTUR DER GANGLIO-*N*-TETRAOSE

Die Bildung von Threit aus Ganglio-*N*-tetraose usw. zeigt, daß die Ganglio-*N*-biose I mit dem C-Atom 4 im Galaktoserest der Lactose zum Tetrasaccharid vereinigt ist. Die Drehwerte von Ganglio-*N*-tetraose und von Ganglio-*N*-triose II sprechen dafür, daß diese zentrale Bindung in der Tetraose β -glykosidisch ist:

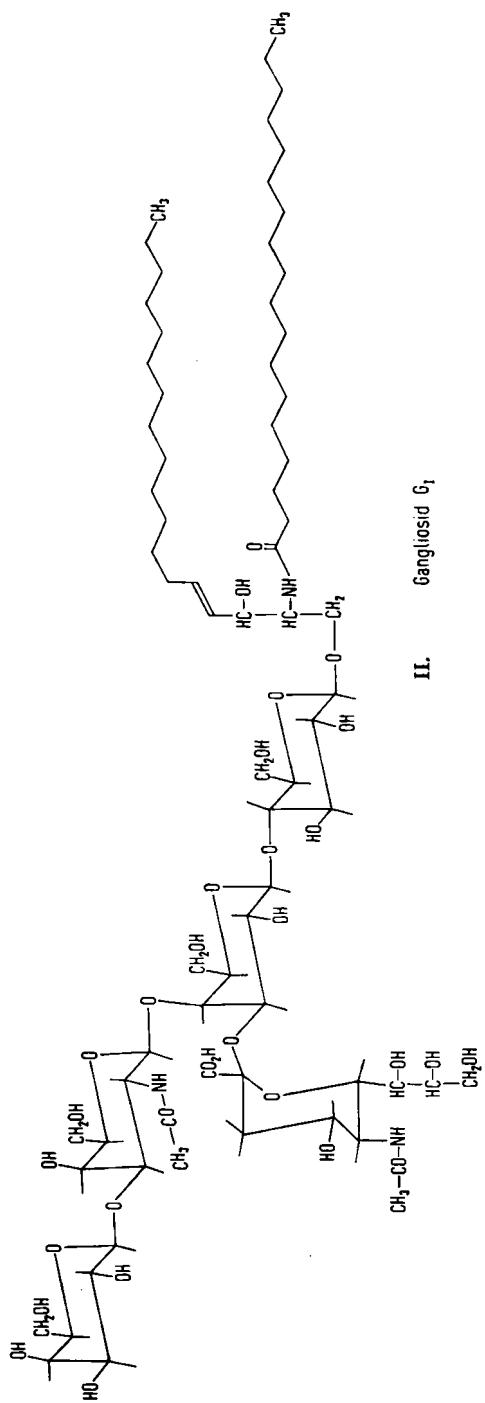
Gleichgewichts-Lösung von	$[\alpha]_D$ ber. für α -Bindung	$[\alpha]_D$ ber. für β -Bindung	$[\alpha]_D$ gef.
Ganglio- <i>N</i> -triose II	+121.5°	+29.7°	+17.3°
Ganglio- <i>N</i> -tetraose	+ 93.6°	+22.9°	+13.9°

Berechnet wurden diese $[\alpha]_D$ -Werte nach C. L. HUDSON aus folgenden $M_{[\alpha]}$ -Werten: Lactose = +18 468° (Gleichgewichtslösung), α - bzw. β -Äthyl-2-acetamino-2-desoxy-galaktopyranosid = +47 750 bzw. -2 520°, Ganglio-*N*-triose II = +16 218° (Gleichgewichtslösung) und β -Methyl-galaktopyranosid = 0°.

So gelangt man zu den in Tab. 3 angegebenen Formeln der Oligosaccharide und für die Tetraose zum Strukturbild I.



¹⁴⁾ R. KUHN und I. Löw, Chem. Ber. 86, 1027 [1953].



DIE KONSTITUTION DES GANGLIOSIDS G_I

Die beschriebenen LS-haltigen Zucker sowie die Abbauversuche mit Perjodat zeigen, daß die Lactaminsäure mit dem C-Atom 3 derjenigen Galaktose verbunden ist, die zur Lactose-Hälfte der Tetraose gehört. Dem Gangliosid G_I kommt daher Formel II zu. Der LS-Rest steht somit in *cis*-Stellung zum Rest der Ganglio-*N*-biose I, die mit dem C-Atom 4 derselben Galaktose verknüpft ist. Auf die dadurch bedingte räumliche Nähe großer Substituenten führen wir die Unspaltbarkeit des Gangliosids G_I durch RDE zurück. Für diese Vorstellung spricht, daß nicht nur G_I, sondern auch die daraus erhaltenen LS-haltigen Oligosaccharide, soweit sie noch Substituenten an C-4 dieser Galaktose tragen, von RDE nicht angegriffen werden, während LS(2→3)Galaktose und LS(2→3')Lactose, die keinen Substituenten in 4-Stellung besitzen, leicht enzymatisch gespalten werden.

Die Verknüpfung der Ganglio-*N*-tetraose mit der endständigen Hydroxylgruppe des Sphingosins hat sich durch Ozonisierung und anschließende Fragmentierung belegen lassen¹¹⁾. So wie die von E. KLENK beschriebenen Ganglioside, enthalten auch die von uns isolierten als Fettsäure ganz überwiegend Stearinsäure.

Das eingangs erwähnte Gangliosid G₀, das nur in sehr geringer Menge erhalten wurde, ist durch RDE ebenfalls unspaltbar. Der dem G₀ zu Grunde liegende Zuckerteil konnte als LS-Ganglio-*N*-triose II (vgl. Tab. 3) identifiziert werden. G₀ unterscheidet sich von G_I nur durch das Fehlen der endständigen Galaktose. Ob es sich um ein Zwischenprodukt beim physiologischen Aufbau bzw. Abbau der Ganglioside handelt, ist noch unbekannt.

BINDUNG VON TETANUSTOXIN

Die hier beschriebenen Ganglioside hat W. E. VAN HEYNINGEN, Oxford, auf ihr Bindungsvermögen gegenüber Tetanustoxin in der Ultrazentrifuge untersucht. Er fand *), daß folgende Toxinmengen von je 1 mg Gangliosid gebunden werden:

$$G_I: 2.59 \text{ mg} \quad G_{II}: 3.64 \text{ mg} \quad G_{III}: 19.3 \text{ mg} \quad G_{IV}: 19.0 \text{ mg}$$

G_I und G_{II} entsprechen in ihrem Bindungsvermögen Gangliosid-Gemischen üblicher Aufarbeitung, die ca. 4 mg Toxin je mg binden. G_{III} und G_{IV} binden viel mehr Toxin als es ihrem LS-Gehalt entspricht.

Fräulein Dr. A. GAUHE sind wir für vielfältige Beratung und hilfsbereite Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Herrn B. KÜCHLER haben wir für eifrige experimentelle Mitarbeit und Herrn E. RÖHM für die Ausführung der Bausteinanalysen zu danken.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Laufmittel für Papierchromatographie waren Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser-Gemische: A wie 5:5:1:3, B wie 5:5:1:4.

Darstellung der Rohganglioside

Methode A: Frisches, von anhaftendem Blut möglichst befreites Rinder- bzw. Menschenhirn wurde mit dem doppelten Vol. 0.01 m Phosphatpuffer von pH 7 im Starmix und anschließend im Glashomogenisator homogenisiert und 2 Stdn. bei 21 000 U/Min. in einer Spinco-Zentrifuge zentrifugiert; die abgesetzte, salbenartige Masse nochmals mit dem glei-

*) Persönliche Mitteilung vom 3. 8. 1962.

chen Vol. Puffer homogenisiert und bei 30 000 U/Min. abzentrifugiert. Die überstehenden Lösungen wurden vereinigt, etwa 2 Tage bei +4° gegen dest. Wasser dialysiert und ausgeflocktes Globulin abgetrennt. Bei 35° wurde i. Vak. eingeengt und zuletzt gefriergetrocknet. Der Rückstand (ca. 4 g aus 1 kg Frischhirn) wurde in wenig Wasser aufgenommen und an einer Calciumphosphatsäule ^{*)}, mit steigenden Phosphatpuffer-Konzentrationen (0.003 m bis 0.01 m), chromatographiert. Die Gangliosid enthaltenden Fraktionen, die nicht frei von Eiweißstoffen waren, wurden gegen Wasser dialysiert und i. Vak. zur Trockne gebracht. G_I konnte nicht beobachtet werden, sondern nur die höheren Ganglioside.

Methode B: Acetongetrocknetes Hirnpulver wurde mit dem 5fachen Gewicht an 50-proz. währ. Phenol 12 Stdn. geschüttelt. Daraufhin wurde 1 Stde. bei ca. 3000 U/Min. zentrifugiert, die währ. Schicht dekantiert und gegen mehrfach gewechseltes dest. Wasser in Cellophanschläuchen (Kalle, Wiesbaden) bis zur völligen Entfernung des Phenols dialysiert. Nach Einengen i. Vak. wurde lyophilisiert. Man erhielt z. B. aus 42 g Hirnpulver 0.34 g Rohgangliosid, welches ca. 10% Ganglioside enthielt.

Methode C: Acetongetrocknetes Hirnpulver (z. B. 322 g aus 1078 g frischem Rinderhirn) wurde mit CHCl₃/CH₃OH (1:1) im Soxhlet heiß extrahiert (ca. 72 Stdn.) und der Extrakt nach einer von H. FOLCH ^{**)} entwickelten Art in Cellophanschläuchen ca. 2–3 Tage gegen Wasser verteilt. Die gesammelten währ. Schichten wurden i. Vak. weitgehend eingedampft und gegen dest. Wasser dialysiert. Nach weiterem Eindampfen i. Vak. wurde gefriergetrocknet. Zum Entfernen von Cholesterin und Fettstoffen wurde heiß mit Aceton extrahiert. Das so gewonnene Rohprodukt (z. B. 3.5 g) enthält ca. 10% an Gangliosiden, unter denen G_I vorherrscht: G_I>G_{II}≈G_{III}>G_{IV}>G_V.

Trennung der Ganglioside

Die Rohpräparate wurden an unvorbehandeltem Kieselgel („Zur Chromatographie“ 0.05–0.2 mm, E. Merck) mit Propanol/Wasser (8:2) und an Cellulosepulver mit Butanol/Pyridin/Wasser (6:2:2) in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Es war zur Gewinnung reiner Präparate notwendig, mehrere Male zu chromatographieren. Die eluierten Fraktionen wurden zur Trockne gebracht, nach Behandeln mit Äther mit Wasser aufgenommen und über MIH—CH₃·CO₂[⊖]-Austauscherharz, das mit etwa der doppelten Menge IR-120-H[⊕] überschichtet war, gegeben. Ganglioside werden nur in Spuren von MIH—CH₃·CO₂[⊖] zurückgehalten. Nach dem Konzentrieren der Lösungen i. Vak. wurde gefriergetrocknet.

Gangliosidsalze wurden aus Methanol, das ca. 1% Wasser und sehr wenig Octylalkohol enthielt, kristallisiert erhalten. Es kristallisierten sowohl reine Ganglioside, Gangliosidge mische als auch mit Cerebroside verunreinigte Präparate. Die freien, gefriergetrockneten Gangliosidsäuren wurden zur Analyse (Tab. 4) aus Methanol/Äther umgefällt und quantitativ bei 85–90°/10⁻³ Torr über KOH/P₂O₅/Paraffin getrocknet. Die freien Säuren waren aschefrei. Zur Reinheits- und Einheitlichkeitskontrolle wurde an Papier (Schleicher & Schüll 2043 b mgl) mit Butanol/Pyridin/Wasser (6:4:3) oder auf Dünnsschichtplatten (vgl. Abbild. 1) chromatographiert. Die Indikation auf Papier geschah mit Ehrlich- bzw. JO₄[⊖]-Reagenz; auf den Dünnsschichtchromatogrammen mit Bromthymolblau, Schwefelsäure oder Ehrlich-Reagenz. Das Ehrlich-Reagenz lässt sich auch bei den schon mit Bromthymolblau angefärbten Platten benutzen und erlaubt hierdurch die sofortige Unterscheidung von LS-haltigen und LS-freien Lipiden.

^{*)} A. TISELIUS, Arch. Biochem. Biophysics 65, 132 [1956]. (Celite Nr. 535 als Filterhilfe).

^{**)} J. FOLCH, S. ARSOVE und J. A. MEATH, J. biol. Chemistry 191, 819 [1951].

Tab. 4. Elementaranalysen der Ganglioside G_I bis G_V

	Gangliosid		C	H	N	CH ₃ CO	LS	Äquiv.-Gew.*
G _I	C ₇₃ H ₁₃₁ N ₃ O ₃₁	(1546.8)	Ber.	56.68	8.54	2.72	5.56	19.98
			Gef.	56.30	8.33	2.56	5.47	19.78
G _{II}	C ₈₄ H ₁₄₈ N ₄ O ₃₉	(1838.2)	Ber.	54.88	8.13	3.05	7.03	33.6
			Gef.	55.1	7.82	2.98	7.4	28.16
G _{III}	C ₈₄ H ₁₄₈ N ₄ O ₃₉	(1838.2)	Ber.	54.88	8.13	3.05	7.03	33.6
			Gef.	54.91	8.04	2.94	6.87	27.7
G _{IV}	C ₉₅ H ₁₆₅ N ₅ O ₄₇	(2129.3)	Ber.	53.58	7.81	3.29	8.09	43.54
			Gef.	52.68	8.3	3.12	7.8	37.4

* Potentiometrische Titration mit n/100 NaOH.

Partielle Säurehydrolyse

*Des-Lactaminylgangliosid*¹⁵⁾: 250 mg *Gangliosid G_I* wurden in 100 ccm 0.01 n H₂SO₄ bei 85° hydrolysiert (1 Stde.) und über MIH-Austauscher (Acetat-Form) gegeben, die durchlaufende Lösung wurde eingedampft und lyophilisiert (187 mg). Die Chromatographie an einer Silicagel-Säule mit tert.-Amylalkohol/Isopropylalkohol/Wasser (8:2:3) lieferte ca. 50 mg *Des-LS-gangliosid*. Von dem MIH-Austauscher konnte anschließend mit 0.1 n Natriumacetat und Na⁺-Austausch an IR 120 (H[⊕]-Form) reine *Lactaminsäure* (58 mg) eluiert werden.

Ganglio-N-biose I und Lactose: 300 mg *Gangliosid G_I* wurden in 30 ml 0.1 n H₂SO₄ bei 100° hydrolysiert (1 Stde.). Nach dem Abkühlen wurde mit Ba(OH)₂ versetzt, das BaSO₄ abzentrifugiert und mit Wasser zweimal gewaschen. Dann wurde über IR 120/MIH (Acetat) gegeben, das Durchlaufende eingedampft und auf Cellulosepulver mit Laufmittel A chromatographiert. Die nur Lactose wie auch die nur N-Biose I enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, über IR 120/IR 45 gereinigt und gefriergetrocknet: 18.2 mg *N-Biose I* (25% d.Th.) und ca. 20 mg *Lactose*. Die *Ganglio-N-biose I* kristallisierte aus währ. Methanol in strahligen Nadeln.

Reduktionen

a) 6 mg *Ganglio-N-biose I*, gelöst in 70 µl Wasser + 30 µl Methanol, wurden unter Eiskühlung mit 5 mg NaBH₄ in 40 µl Wasser + 360 µl Methanol versetzt und 4 Stdn. bei 20° belassen. Mit Essigsäure wurde dann auf pH 6 gebracht, über IR 120 gegeben und nach dem Eindampfen die Borsäure durch Abdampfen mit Methanol entfernt. Anschließend wurde 7 Stdn. mit 100 µl 1 n H₂SO₄ bei 100° hydrolysiert, H₂SO₄ mit Ba(OH)₂ entfernt, gefriergetrocknet und chromatographiert. Als einzige anilinphthalat-positive Substanz wurde *Galaktose* gefunden.

b) 3 mg *Ganglio-N-biose I*, in 50-proz. Essigsäure gelöst, wurden mit 100 mg PtO₂, das vorhydriert war, 2 Tage hydriert. Es wurde abfiltriert, verdampft und 7 Stdn. bei 100° mit 1 n H₂SO₄ hydrolysiert. Nach dem Entfernen der Schwefelsäure wurde gefriergetrocknet und chromatographiert: Man fand *2-Desoxy-2-amino-dulcit* (Anfärbung mit Ninhydrin; Vergleichspräparat aus *N*-Acetyl-galaktosamin durch NaBH₄-Reduktion und Entacetylierung) und als einzige anilinphthalat-positive Substanz *Galaktose*.

Alkalischer Abbau: 10 µl einer 5-proz. währ. Lösung von *Ganglio-N-biose I* wurden mit 5 µl 0.2 n Na₂CO₃ 10 Min. auf 100° erhitzt. Überschüss. Na₂CO₃ wurde mit IR 120 entfernt und nach dem Eindampfen chromatographiert: *Galaktose* war als einzige anilinphthalat-positive Substanz zu erkennen, (neben 3 Morgan-Elson-positiven Chromogenen aus *N*-Acetyl-galaktosamin). — Die Reaktion lässt sich mit sehr geringen Substanzmengen auch

¹⁵⁾ Vgl. S. BOGOCH, Biochem. J. 68, 319 [1958].

direkt auf dem Chromatogramm ausführen: Die Substanz wird auf dem Startfleck alkalisch abgebaut durch Aufgeben eines Tropfens äthanol. Kalilauge (1 Vol. 50-proz. Kalilauge + 4 Vol. Äthanol; davon 1 ccm verdünnt mit 20 ccm Butanol) und Erhitzen des ganzen Bogens für etwa 10 Min. auf 110°. Hiernach werden in üblicher Weise durch Chromatographie die entstandenen Substanzen identifiziert.

Spaltung durch β -Galaktosidase: Einige Kristalle β -Galaktosidase (K. WALLENFELS) wurden in 1 ccm m/30 Phosphatpuffer pH 6.0, der 5% NaCl enthielt, bei 0° innerhalb von ca. 12 Stdn. gelöst. Der Puffer wurde nach Bedarf mit m/15 Phosphatpuffer pH 6.8 (4.17% NaCl enthaltend) verdünnt. — 5 mg Lactose, gelöst in 50 μ l Wasser, wurden mit 25 μ l Enzymlösung bei 37° inkubiert. — 1.4 mg Ganglio-N-biose I in 30 μ l Wasser wurden mit 30 μ l einer 10mal stärkeren Enzymlösung bei 37° inkubiert. — Man verfolgte die Spaltung mittels Dünnschichtchromatographie an aktiviertem Silicagel mit Propanol/Wasser (7:3). Nach 1 Tag war die Lactose völlig, nach 2 Tagen die Ganglio-N-biose I etwa zur Hälfte gespalten. Der pH-Wert hatte sich während dieser Zeit nicht verändert. Ansätze ohne Enzymzugabe blieben unverändert.

Bausteinanalysen¹⁰⁾ (ausgeführt von Herrn E. RÖHM): 10—30 mg Subst. werden mit 25 ccm 80-proz. Ameisensäure 40 Stdn. bei 100° gespalten, die überschüss. Ameisensäure wird im Exsikkator über KOH entfernt. Zur Entformylierung wird in 3 ccm 0.2n HCl aufgenommen und 4 Stdn. bei 100° belassen. Mit 80 μ l Pyridin wird daraufhin neutralisiert und das Gewicht der Lösung bestimmt. Aliquote Teile werden in Laufmittel A chromatographiert und die Zucker mit TTC. — unter Verwendung eingewogener Zuckergemische, die wie oben mit Ameisensäure usw. behandelt wurden — quantitativ bestimmt.

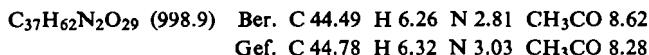
Perjodat-Oxydation der Ganglio-N-biose I (in ähnlicher Weise wurden auch die JO_4 -Spaltungen der übrigen Substanzen ausgeführt): 5 mg Subst., in 140 μ l Wasser gelöst, wurden mit 280 μ l 0.5 m Acetatpuffer pH 4.6 versetzt und unter Kühlung 560 μ l 0.25 m Na JO_4 zugegeben. Es wurde im Eisschrank bei 4° belassen. Nach geeigneten Zeiten, hier nach 6, 12 und 24 Stdn., wurden je 300 μ l entnommen, das überschüss. Perjodat mit einem Mikrotropfen Glykol entfernt und über IR 120/IR 45 gegeben. Nach dem Eindampfen wurde 7 Stdn. bei 100° mit 1 n H_2SO_4 hydrolysiert, die Schwefelsäure entfernt und chromatographiert: Anilinphthalat-positiv war nur Galaktosamin. Die Galaktose war schon nach 6 Stdn. verschwunden.

Alkalischer Abbau mit $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ⁵⁾: Das Papierchromatogramm wird besprüht mit einer Lösung von 611 mg $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 10 ccm Wasser und 10 Min. auf 100° erhitzt. Anschließend besprüht man mit p-Dimethylamino-benzaldehyd (400 mg Aldehyd in 15 ccm konz. Salzsäure + 15 ccm Äthanol; davon 5 ccm mit 15 ccm Butanol verdünnt). Ergebnis: Ganglio-N-biose I reagiert positiv.

Acetylyse der Ganglioside

50 mg Gangliosid wurden bei 0° mit 2.5 ccm eines eiskalten Gemisches von 5 ccm Acetanhydrid, 5 ccm Eisessig und 0.5 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und 3 Tage bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde auf 50 g Eis gegossen und sofort mit festem Na_2CO_3 auf pH ca. 4 gebracht. Nach 1 stdg. Stehenlassen im Eisschrank wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt, der Extrakt mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und verdampft. Zum Entfernen von Essigsäure wurde einige Male mit Toluol/Essigester nachgedampft. Nun wurde in 20 ccm bei -20° mit NH_3 gesättigtem absolutem Methanol aufgenommen und unter Wasserausschluß 3 Tage stehengelassen. Dann wurde i. Vak. abgedampft und mehrmals mit Methanol/Essigester/Toluol nachgedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und über IR 120/MIH (Acetat) gegeben, wobei die LS-haltigen Bruchstücke festgehalten werden und die neutralen durchlaufen. Die am MIH adsorbierten Produkte wurden mit

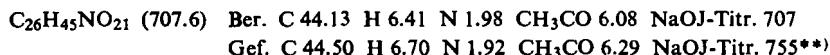
0.1 m Natriumacetat eluiert, aus den Eluaten wurde das Na⁺ mit IR 120 entfernt, i.Vak. eingedampft und gefriergetrocknet. Aus 670 mg Gangliosid G_I erhielt man z. B. 256 mg LS-haltige Acetylolyseprodukte. Dieses Gemisch wurde auf Schleicher & Schüll Papier „2043 b ausgew.“ in Laufmittel B chromatographiert und ergab: LS-Ganglio-N-tetraose*, 27 mg LS-Ganglio-N-biose II (NANA-GNB II; verunreinigt durch LS(2→3)Lactose) und 26 mg LS(2→3)Galaktose. Analyse der LS-Ganglio-N-tetraose:



Ganglio-N-biose II: 27 mg der durch Acetylolyse von G_I gewonnenen LS-Ganglio-N-biose II wurden 3 Stdn. mit 4 ccm 0.1 n H₂SO₄ bei 80° hydrolysiert. Die Schwefelsäure wurde mit Ba(OH)₂ entfernt, die Lösung über IR 120/MIH (Acetat) gegeben, eingeengt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde auf einem Papier-Streifenchromatogramm (Laufmittel A) gereinigt, vom Papier mit Wasser eluiert, über IR 120/IR 45 von Resten des Laufmittels befreit und zur Trockne gebracht: Es resultierten 3.9 mg Ganglio-N-biose II.

LS(2→3)Galaktose: 200 mg 3'-LS-Lactose (aus Colostrum) wurden in der oben geschilderten Weise mit 10 ccm Acetylolysegemisch 2 Tage acetylolyisiert. Man erhielt 136 mg LS-haltige Acetylolyseprodukte und hieraus 10.8 mg chromatographisch reine LS(2→3)Gal.

Ganglio-N-tetraose: 459 mg LS-Ganglio-N-tetraose wurden 4 Stdn. in 100 ccm 0.1 n H₂SO₄ bei 80° hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde mit Ba(OH)₂ die Schwefelsäure entfernt und über IR 120/MIH (Acetat) gegeben. Der vom Austauscher festgehaltene, mit 0.1 n Natriumacetat eluierte und über IR 120 gegebene Anteil (258 mg) bestand praktisch nur aus LS. Das entstandene Gemisch neutraler Zucker (212 mg) wurde auf Streifenchromatogrammen getrennt und ergab nach Reinigung der Eluate über IR 120/IR 45:150 mg Ganglio-N-tetraose, 15 mg Ganglio-N-triose I, 28 mg Ganglio-N-triose II und 10 mg Ganglio-N-biose I, deren Eigenschaften in Tab. 3 und Abbild. 3 angegeben sind. Die Ganglio-N-tetraose wurde analysiert.



**) Parallel wurde Lacto-N-tetraose titriert: ber. 707, gef. 748.

Abbau mit Perjodat

Perjodat-Oxydationen mit anschließender NaBH₄-Reduktion: 5 mg Zucker wurden, wie S. 879 beschrieben, mit Perjodat oxydiert, mit Glykol wurde das überschüss. JO₄[⊖] zerstört und nach Behandeln mit IR 120/IR 45 gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 200 µl Wasser aufgenommen und unter Eiskühlung NaBH₄ (5 mg) zugegeben. Es wurde 4 Stdn. bei Raumtemperatur belassen, dann wie üblich aufgearbeitet und 7 Stdn. mit 1 n H₂SO₄ bei 100° hydrolysiert. Die gebildeten Produkte wurden, nach Entfernen der Schwefelsäure mit Ba(OH)₂, chromatographisch identifiziert.

NaBH₄-Reduktion vor der Perjodat-Oxydation: 5 mg Zucker in 700 µl Wasser versetzte man unter Eiskühlung mit 5 mg NaBH₄, ließ 4 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, zerstörte überschüss. NaBH₄ mit AcOH und entfernte Na⁺ mit IR 120 und die Borsäure mit Methanol. Der gefriergetrocknete Rückstand wurde dann wie oben der JO₄[⊖]-Oxydation und der anschließenden NaBH₄-Reduktion unterworfen.

* Zur Gewinnung von Ganglio-N-tetraose wurde nur 48 Stdn. acetylolytiert.