

KURT HEYNS, GÜNTHER KIESSLING, WERNER LINDENBERG,
HANS PAULSEN und MARION E. WEBSTER

**D-Galaktosaminuronsäure (2-Amino-2-desoxy-
D-galakturonsäure) als Baustein des Vi-Antigens**

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg

und den

National Institutes of Health, Bethesda 14, Md.

(Eingegangen am 31. März 1959)

Vi-Antigen aus *Escherichia coli* ist ein Polysaccharid, welches als Baustein vorwiegend D-Galaktosaminuronsäure (2-Amino-2-desoxy-D-galakturonsäure) in N-acetylierter Form enthält. Die nach der Hydrolyse des Antigens mit konzentrierter Salzsäure isolierte D-Galaktosaminuronsäure wurde mit der auf dem Wege der katalytischen Oxydation synthetisch dargestellten Verbindung identifiziert.

Bereits im Jahre 1954 wiesen M. E. WEBSTER, W. R. CLARK und M. E. FREEMAN¹⁾ darauf hin, daß unter den Hydrolysen-Produkten des Vi-Antigens eine Säurekomponente vorliegen würde, bei der es sich um eine Uronsäure handeln müsse, die gleichzeitig eine Aminogruppe enthält.

Das Vi-Antigen ist die wesentliche immunogen wirkende Komponente aus *Salmonella typhosa* und anderen Bakterienarten wie *Escherichia coli* und *Paracolobacterium ballerup*. Diese aus den verschiedenen Bakterien isolierten Antigenkörper ähneln sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften²⁾. Das Vi-Antigen stellt ein stark saures stickstoff- und acetylhaltiges Polysaccharid dar, welches keine mit Naphthoresorcin reagierenden Uronsäuren und keine Schwefelsäure- oder Phosphorsäurereste besitzt. Es ist hydrolytisch sehr schwer aufspaltbar³⁾, nur die Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure¹⁾ liefert in 35-proz. Ausbeute ein kristallisiertes, in 80-proz. Ausbeute ein amorphes Abbauprodukt, das von W. R. CLARK, J. McLAUGHLIN und M. E. WEBSTER⁴⁾ als Hydrochlorid einer Aminohexuronsäure angesprochen wurde.

Die Analyse des kristallisierten Hydrochlorids sprach für ein Dihydrat. In der Verbindung ließen sich eine freie Aminogruppe und eine Carboxylgruppe nachweisen. Die papierchromatographischen Eigenschaften bezüglich ihrer Laufgeschwindigkeit in sauren und basischen Lösungsmitteln und ihre Anfärbbarkeit mit Ninhydrin, Anilinphthalat und nach ELSON-MORGAN deuteten ebenfalls auf eine

1) Arch. Biochem. Biophysics. **50**, 223 [1954].

2) M. E. WEBSTER, J. F. SAGIN, R. P. ANDERSON, S. S. BREESE, M. E. FREEMAN und J. M. LANDY, J. Immunology **73**, 16 [1954].

3) M. E. WEBSTER, E. M. LANDY und M. E. FREEMAN, J. Immunology **69**, 135 [1952].

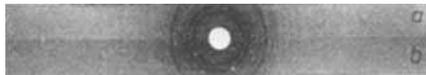
4) J. biol. Chemistry **230**, 81 [1958].

Aminohexuronsäure hin. Ferner wurde ein IR-spektroskopischer Vergleich des unbekanntes Hydrochlorids mit dem Hydrochlorid der von uns⁵⁾ synthetisierten D-Glucosaminuronsäure vorgenommen. Die Spektren erwiesen sich als sehr ähnlich und zeigten die gleichen Hauptbanden: 1745/cm (5.73 μ) C=O; 3570–2860/cm (2.8–3.5 μ) C–H, N–H, O–H; 1600 und 1504/cm (6.25 und 6.65 μ) N–H. Sie erlaubten jedoch keine Identifizierung, da Hydrochloride erfahrungsgemäß wenig strukturierte Spektren ergeben und da außerdem die Messungen als Film vorgenommen wurden, wobei eine bei Kohlenhydraten häufig beobachtete starke Verflachung des Spektrums eintrat. Ein brauchbarer Identitätsvergleich war nur mit den Spektren der kristallisierten freien Aminouronsäuren zu erwarten.

Nachdem wir mittels der katalytischen Oxydation am Platinkontakt⁶⁾ die D-Galaktosaminuronsäure synthetisiert hatten⁷⁾, konnten wir 65 mg Vi-Antigen aus *Escherichia coli* für die Bausteinanalyse einsetzen. Durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure ließen sich 8 mg reines Hydrochlorid des fraglichen Aminozuckers gewinnen. Papierchromatographische Versuche in den Systemen Pyridin/Amylalkohol/Wasser und Dimethylformamid/Isopropylalkohol/Butanon/Wasser zeigten bereits, daß bei der Hydrolyse erhaltene Zucker in seiner Laufgeschwindigkeit nicht mit D-Glucosaminuronsäure, wohl aber mit D-Galaktosaminuronsäure übereinstimmte. In anderen Lösungsmittelsystemen waren beide Amino-uronsäuren nicht trennbar.

Auch bei der Darstellung des Hydrochlorids wiesen beide Verbindungen charakteristische Unterschiede auf. Aus D-Galaktosaminuronsäure ließ sich mit konzentrierter Salzsäure sehr leicht das ausgezeichnet kristallisierende Hydrochlorid gewinnen. Eine Lösung von D-Glucosaminuronsäure in konzentrierter Salzsäure färbte sich dagegen schließlich unter Huminabscheidung immer dunkler, ohne daß ein Hydrochlorid isolierbar war. Dieses kann nur mit alkoholischer Salzsäure erhalten werden⁴⁾.

Das gut kristallisierte D-Galaktosaminuronsäure-hydrochlorid wurde kristallographisch mit dem Abbau-Hydrochlorid verglichen. Beide Kristalle zeigten stengelligen, linealförmigen bis nadligen Habitus, starke Doppelbrechung, gerade Auslöschung parallel zur Längsachse und identisch erscheinende Debye-Scherrer-Aufnahmen, welche einander in Abbild. 1 gegenübergestellt sind. Die eindeutige kristallographische Identität beider Substanzen ergab sich aus Drehkristallaufnahmen um die Längsachse der ca. 0.5 \times 0.1 \times 0.1 mm großen Kristalle.



Abbild. 1. Debye-Scherrer-Aufnahmen von D-Galaktosaminuronsäure-hydrochlorid \cdot H₂O (a) und Hydrochlorid aus dem Vi-Antigen-Hydrolysat (b)

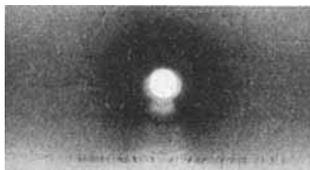
Dabei waren Interferenzen gleicher Lage und Intensität zu beobachten. Aus dem Abstand der Schichtlinien ergab sich in beiden Fällen in Richtung der Längsachse ein

⁵⁾ K. HEYNS und H. PAULSEN, Chem. Ber. **88**, 188 [1955].

⁶⁾ K. HEYNS und H. PAULSEN, Angew. Chem. **69**, 600 [1957].

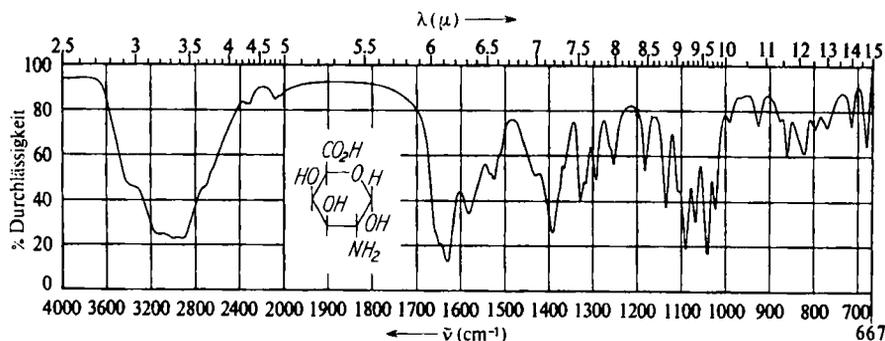
⁷⁾ K. HEYNS und M. BECK, Chem. Ber. **90**, 2443 [1957].

Identitätsabstand von 4.86 Å. Eine der beiden Drehkristallaufnahmen ist in Abbild. 2 wiedergegeben. Die Kristalle enthalten nach der Analyse nur ein Mol. Kristallwasser.



Abbild. 2. Drehkristall-Aufnahme von D-Galaktosaminuronsäure-hydrochlorid · H₂O. Das Hydrochlorid des Vi-Antigen-Hydrolysats gibt das gleiche Bild

Zur weiteren Stützung der Identität haben wir die IR-Spektren der freien Uronsäuren verglichen. Das Hydrochlorid der Abbau-Uronsäure wurde an saurem Austauscher (Dowex 50) adsorbiert und mit Trichloressigsäure eluiert. Die Trichloressigsäure ließ sich infolge der starken Hydrolyse des Trichloracetats vollständig mit Äther entfernen. Die zurückbleibende freie Säure war im IR-Spektrum identisch mit synthetischer D-Galaktosaminuronsäure (s. Abbild. 3).



Abbild. 3. IR-Spektrum von D-Galaktosaminuronsäure (0.55 mg in 200 mg KBr eingepreßt) aus Vi-Antigen. Es ist mit dem Spektrum des synthetischen Produktes identisch

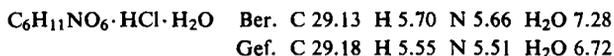
Damit ist erstmalig das Vorkommen der D-Galaktosaminuronsäure in der Natur sicher nachgewiesen. Da der aus *Salmonella typhosa* und *Paracolonobacterium ballerup* isolierte Vi-Antigen-Körper bei der Hydrolyse als Abbauprodukt das gleiche Hydrochlorid liefert wie das Vi-Antigen des *Coli*-Bakteriums⁴⁾, dürfte auch bei diesen Bakterien D-Galaktosaminuronsäure als entsprechender Hauptbaustein vorhanden sein. Aminohexuronsäuren, insbesondere D-Galaktosaminuronsäure, scheinen somit in Bakterienkapselsubstanzen durchaus in weiter Verbreitung vorzuliegen.

Über die anderen Bausteine des Vi-Antigens (etwa 25% des Polymerkörpers), unter denen sich in geringer Menge auch verschiedene normale Aminosäuren wie Glycin, Asparaginsäure, Glutaminsäure befinden, und über die Art der Verknüpfung, für welche von CLARK, MCLAUGHLIN und WEBSTER⁴⁾ auf Grund der Resistenz des Polysaccharids gegenüber Perjodat eine 1.3-Verknüpfung vorgeschlagen wird, dürften noch weitere Untersuchungen erforderlich sein.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

65 mg *Vi-Antigen*, gewonnen aus *Escherichia coli* 5396/38 wurden mit 6.5 ccm konz. Salzsäure 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Es wurde mit 12 ccm Wasser verdünnt, mit wenig Carboraffin entfärbt und i. Vak. auf etwa 0.5 ccm eingengt. Im Eisschrank schieden sich Kristalle ab, die zum Umkristallisieren in 0.45 ccm konz. Salzsäure unter Erwärmen gelöst wurden. Im Eisschrank kristallisierten daraus 8 mg des Hydrochlorids in langen Nadeln aus.

D-Galaktosaminuronsäure-hydrochlorid: 10 mg *D-Galaktosaminuronsäure* wurden in 0.8 ccm heißer konz. Salzsäure gelöst. Im Eisschrank schieden sich 6 mg gut kristallisiertes Hydrochlorid in Nadeln ab.



Die *Röntgenaufnahmen* der Hydrochloride wurden mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ausgeführt, die *Debye-Scherrer-Aufnahmen* in nicht abgeschmolzenen Glaskapillaren von 0.5 mm Durchm. und 0.01 mm Wandstärke.

Belichtungszeit der Debye-Scherrer-Aufnahmen 1 Stde. 45 Min. bei 32 KV/20 mA, der Drehkristallaufnahmen 6 Stdn. bei 39 KV/16 mA, Größe des Kristalls 0.5 \times 0.1 \times 0.1 mm.

Gewinnung der freien Säure aus dem Hydrochlorid des Vi-Antigen-Hydrolysats: 4 mg Hydrochlorid des Vi-Antigen-Hydrolysats wurden an einer Säule von 3.5 mm Durchm. und 40 mm Länge mit 0.4 ccm Dowex 50 \times 4 (200–400 mesh) adsorbiert und nach Auswaschen der HCl mit 0.5 *n* Trichloressigsäure eluiert. Bei Fraktionen von 0.5 ccm befand sich die Substanz in den Fraktionen 6–8. Diese Fraktionen wurden mit Äther bis auf p_{H} 5 kontinuierlich extrahiert. Nach Einengen der Lösung blieben 3 mg Substanz zurück. Diese zeigte im IR-Spektrum die gleichen Banden wie synthetische *D-Galaktosaminuronsäure* sowie die entsprechende Rechtsdrehung der Ebene des polarisierten Lichtes.

Papierchromatographische Untersuchungen

Im System Dimethylformamid/Isopropylalkohol/Butanon/Wasser (10:25:45:20):

D-Glucosaminuronsäure: R_{F} 0.57; $R_{\text{Glucosamin}}$ 0.77

D-Galaktosaminuronsäure: R_{F} 0.46; $R_{\text{Glucosamin}}$ 0.63

Im System Pyridin/Amylalkohol/Wasser (7:7:6):

D-Glucosaminuronsäure: $R_{\text{Glucosamin}}$ 0.32

D-Galaktosaminuronsäure: $R_{\text{Glucosamin}}$ 0.23

In Butanol/Eisessig/Wasser sind beide Verbindungen nicht trennbar.