

Shechter [7]. Although the intermediacy of **2** and **3** during transformation of **1** is unequivocally established, the presence of the methoxy group could in principle favour other pathways in the case of **8**; conceivably, the carbene **11** could be formed directly from **8** rather than from **10** [1].

The transformation **7-9** represents a furan synthesis from a vinyl ether *via* carbene addition and ring expansion. We are investigating the generality of this sequence in the light of the recent observation [8] that even simple chlorocyclopropenes open to chlorocarbenes when appropriate conditions are found.

Financial support by the *Swiss National Science Foundation* (grant No 2.236-0.81) is gratefully acknowledged.

References

- 1 W.E. Billups, L.P. Lin and W.Y. Chow: *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 4026 (1974); W.E. Billups, L.E. Reed, E.W. Casserly and P. Lin: *J. Org. Chem.* **46**, 1326 (1981).
- 2 B. Halton and D.L. Officer: *Aust. J. Chem.* **36**, 1167 (1983); B. Halton and D.L. Officer: *Tetrahedron Lett.* **22**, 3687 (1981).
- 3 T.T. Coburn and W.M. Jones: *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5218 (1974).
- 4 R.G.R. Bacon and S.C. Rennison: *Chem. & Ind.* **1966**, 812.
- 5 W.E. Parham, D.A. Bolon and E.E. Schweizer: *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 603 (1961).
- 6 A. Padwa and R. Hartmann: *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3759 (1966).
- 7 T.A. Engler and H. Shechter: *Tetrahedron Lett.* **23**, 2715 (1982).
- 8 J. Arct and B. Migaj: *Tetrahedron* **37**, 953 (1981).

Vortragsreferate

Structure and Function of Carbohydrate Chains of Glycoproteins

Prof. Dr. J.F.G. Vliegthart, Dept. of Bio-Organic Chemistry, State University of Utrecht, Croesestraat 79, NL-3522 AD Utrecht.

Chemische Gesellschaft Zürich

25. Januar 1984

Glycoproteins are defined as proteins bearing one or more covalently linked carbohydrate chains. The type of linkage can be either O-glycosidically to serine or threonine, or N-glycosidically to asparagine [1]. These biomolecules are widely distributed in nature occurring in soluble and membrane bound forms, intra- as well as extracellularly. For individual glycoproteins much is known about the biological function of the protein part of these biopolymers. Accordingly, these compounds can be conceived as enzymes, hormones, toxins, immunoglobulins, structural proteins etc. Much less accurate information is available about the role of the carbohydrate moieties. It is reasonable that just like for the protein parts, a variety of functions can be associated with the glycan chains. It may even be speculated that one and the same type of carbohydrate chain, present in different glycoproteins serves different purposes. The carbohydrate chains have a distinct influence on the physico-chemical properties of the biopolymer, which is largely dependent on the total carbohydrate content. In comparison to the non-glycosylated compound there are changes in the outer surface of the molecule, which comes *i.a.* to expression in changes in mass, size, charge, hydrophobicity, elasto-viscous properties. The contact with the environment has more or less changed; this can become apparent from the behaviour towards proteases due to protection of specific peptide bonds and/or to altered protein folding.

As to the biological roles of the carbohydrate chains several hypotheses have been put forward. Several of them have in common that carbohydrates are considered to be carriers of specific biological information. For some vital processes the recognition of carbohydrate structures by complementary binding proteins has been described. Receptor mediated endocytosis based on carbohydrate recognition systems has been reported for a variety of animal cell systems. The cell surface carbohydrates are important in the social behaviour of cells. They are involved in interactions of cells with biomolecules, other cells, viruses and bacteria. In essential features like cell growth, differentiation, adhesion and life span the surface carbohydrate chains play a definite role.

For the understanding at the molecular level of the biological functioning of carbohydrate chains of glycoproteins detailed knowledge of the architecture of these biopolymers is indispensable. This im-

plies that the primary structure has to be elucidated as well as the three dimensional structure. The latter is essential to establish which part of the carbohydrate chain is exposed and is directly or after cleavage of one or more terminal sugar residues available for interaction with complementary molecules. To define the primary structure of carbohydrate chains of glycoproteins, the nature, number, ring size and sequence of the constituting monosaccharides has to be established as well as position and configuration of the glycosidic linkages, and finally type and location of the carbohydrate-peptide bonds.

In the past 10 years enormous progress has been made in the methodology for the structure elucidation of carbohydrate chains. This is due to a sophistication of chemical and enzymic techniques and in particular to spectacular developments in the potencies of mass spectrometry and NMR spectroscopy.

Intact glycoproteins are so far not suitable as starting materials for direct determination of the structures of their carbohydrate chains. Main reasons are the occurrence of more than one carbohydrate chain and (micro)heterogeneity in the carbohydrate portion. Therefore, degradation to glycopeptides, oligosaccharides or oligosaccharide alditols is necessary. Subsequent fractionation to homogeneity of formed mixtures of compounds is necessary. In particular the structure analysis of mixtures consisting of N- and O-type of carbohydrate chains may lead to erroneous results.

500 MHz ¹H-NMR spectroscopy in conjunction with methylation analysis has proved to be an adequate approach for the characterization of N- as well as O-type of carbohydrate chains [2]. For the interpretation of the ¹H-NMR spectra recorded in D₂O of glycans in terms of primary structures, the concept of structural reporter groups was developed. Structural reporters are for example: anomeric protons, protons adjacent to substitution positions in a saccharide, protons linked to deoxy carbon atoms (sialic acids, fucose), N-acetyl and N-glycolyl group protons. A large variety of carbohydrate structures have been determined along this route. This approach is also suitable for the analysis of microheterogeneity *i.e.* in fact the study of mixtures of closely related compounds.

The recently developed mass spectrometric technique which makes use of fast atom bombardment as ionisation method has shown to be successful for the analysis of underived saccharides of considerable chain length.

The determination of the spatial structure of the carbohydrate chains of glycoproteins has not yet attained its final stage. Significant progress has been made for the free glycan chains on the basis of NMR analysis, theoretical calculations and model building [3]. However, for the biological function it is essential to know the situation in the intact biopolymer. Some important X-ray crystallo-

graphic data on N-glycosidic type of carbohydrate chains in e.g. immunoglobulins have become available [4,5]. Further studies are necessary to make clear if such carbohydrate chains may have a unique conformation or that their structure is more or less influenced by the protein to which they are attached.

Summarized by the author

References

- 1 E. Berger, E. Buddecke, J.P. Kamerling, A. Kobata, J.C. Paulson and J.F.G. Vliegthart: *Experientia* 38, 1129-1162 (1982).
- 2 J.F.G. Vliegthart, L. Dorland and H. van Halbeek: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 209-374 (1983).
- 3 K. Bock: *Pure and Applied Chem.* 55, 605-622 (1983).
- 4 J. Deisenhofer: *Biochemistry* 20, 2361-2370 (1981).
- 5 B.J. Sutton and D.C. Phillips: *Biochem. Soc. Trans.* 11, 130-132 (1983).

Cibachrome® Farbmikrofilme

Dr. A. Meyer, Ilford AG, Postfach, 1700 Fribourg

Kolloquium für Photographie und Bildverarbeitung ETH, Zürich 26. Januar 1984

Das Silberfarbbleich-Verfahren, auf dem die CIBACHROME Produkte basieren, führt zu Material-Eigenschaften, die dessen Einsatz für Farbmikrofilme nahegelegt haben. Die in den Emulsionsschichten diffusionsfest eingelagerten Azofarbstoffe absorbieren das an den Silberhalogenidkörnern gestreute Licht, wodurch sich eine hohe Bildschärfe ergibt. Es ist eine einfache, tolerante Dreibad-Verarbeitung möglich. Die aus Azofarbstoffen aufgebauten Bilder sind im Dunkeln sehr haltbar, da diese Farbstoffe gegen Oxidation und Hydrolyse eine gute Resistenz aufweisen. Auch die Lichtbeständigkeit ist deutlich besser als bei den chromogenen Farbfilmern, bei denen die Bildfarbstoffe im Farbtentwickler gebildet werden (Azomethine).

Die Verarbeitungsschritte sind: Silberentwicklung, Farbbleichung, Fixierung. Der Nassprozess P-5 dauert für die nachstehend beschriebenen Farbmikrofilme inkl. Wässerungsschritte 9 2/3 Minuten bei 30° C. Das im ersten Bad entwickelte negative Silberbild bleicht im Bleichbad die Azofarbstoffe bildmässig aus, es entsteht ein positives Farbbild. Dabei bildet sich um jedes Silberkorn ein farblos bleichhof. Um günstige Werte für die Körnigkeit und Bildschärfe zu erzielen, ist deshalb eine feinkörnige Silberhalogenid-Emulsion erforderlich.

Da spektral sensibilisierte Emulsionen ihre blaue Eigenempfindlichkeit beibehalten, muss die oberste Schicht blauempfindlich und blau absorbierend, also gelb gefärbt sein. Deshalb kann nur grünes und rotes Licht in die unteren Schichten gelangen. Die mittlere Schicht ist purpurgefärbt und grünempfindlich und die unterste enthält einen blaugrünen Farbstoff, sie ist rotempfindlich. Das grüne und rote Licht wird aber schon an den Emulsionskörnern der obersten Schicht gestreut. Um eine hohe Bildschärfe zu erreichen, müssen deshalb alle Schichten so dünn wie möglich sein.

In einem ersten Modell wurde dieser Schichtaufbau gewählt, allerdings ergänzt mit einem Gelatine-Unterguss (verbessert die Schichthaftung), einer im Bleichbad ausbleichbaren Gelbfilterschicht unter der Gelbschicht (verbessert die Farbwiedergabe) und einer Schutzschicht; der Filmträger ist Polyester. Die Schichtdicke der aktiven

Schichten (ohne Unterguss und Schutzschicht) beträgt 5.8 Mikron. Es wurde ein Auflösungsvermögen von 340 Linienpaaren (LP)/mm erreicht (Hochkonstrastmire).

Mit diesem Film wurde die Lichtstreuung innerhalb der Schichten mit Kantenbelichtungen untersucht. Nach der Silberentwicklung wurden mikroskopische Dünnschnitte quer zu dem Uebergang «belichtet/unbelichtet» hergestellt. Dabei zeigte sich, dass das Streulicht z.T. unter einem sehr kleinen Winkel zur Schichtebene in die unteren Schichten eindringt.

Um die Bildschärfe weiter zu verbessern, wurde deshalb in einem zweiten Modell eine neue Schichtstruktur gewählt. Die blaugrüne und die gelbe Schicht wurden in Doppelschichten aufgeteilt und die Purpurschicht dreigeteilt. Eine sehr feinkörnige Emulsion (kubisch monodisperse AgBr-Kristalle, Kantenlänge 0.2 Mikron) ist in der unteren Blaugrünschicht, in der mittleren Purpurschicht und in der oberen Gelbschicht enthalten. Die Dicke der aktiven Schichten blieb unverändert. Die silberfreien Schichten werden durch Nachbarbleicheffekte ausgebleicht. Sie absorbieren bei der Belichtung einen wesentlichen Teil des Streulichtes und verbessern zudem die Farbwiedergabe (weniger unerwünschte Bleichung der anders gefärbten Nachbarschichten). Im Vergleich zu Modell 1 wurden folgende Daten erhalten (Dichtemass: visuelle Dichte):

Kriterium	Modell 1	Modell 2
Maximaldichte	2.14	2.25
Gamma (Kontrast)	1.4	2.0
Auflösung (Lp/mm)	340	380
Modulation bei 100 Lp/mm	57%	68%
RMS Körnigkeit, D = 1 (50 Mikron Messfeld)	10	6

Häufig wird von einem ersten Mikrofilm (Master) eine Kopie (2. Generation) gezogen. Bei dieser Kontaktkopie liegen die Schutzschichten zwischen den aktiven Schichten. Die Dicke dieser Schutzschichten wurde von früher 1.2 auf 0.6-0.8 Mikron reduziert, was zu einem signifikanten Schärfegewinn für die zweite Generation führte. - Die Farbmikrofilme können auf CIBACHROME Print oder CIBACHROME Copy Materialien rückvergrössert werden. Beschleunigte Dunkelbeständigkeitsversuche zeigten z.B. bei 77°C und 40% RF nach 300 Tagen eine Dichteabnahme von nur 0.02 (ausgehend von Dichte 1). Damit sind die CIBACHROME Mikrofilme den chromogenen Filmen sehr weit überlegen. Es ist durchaus möglich, dass sie ebenso beständig sind wie schwarz-weiße Silberfilme.

Die Lichtbeständigkeitstests, ausgeführt mit Halogenlicht und Xenonlicht, ergaben erwartungsgemäss ebenfalls bessere Resultate als bei vergleichbaren chromogenen Filmen. Dies ist besonders für mikroverfilmte Landkarten, die für navigatorische Anwendungen gebraucht werden, wichtig.

Die realisierbaren Verkleinerungsfaktoren sind von der Art der farbigen Dokumente, z.B. der Grösse der kleinsten Schriften, abhängig. Praktisch wurden lineare Verkleinerungsfaktoren von 24 - 48-fach erreicht. Die Anwendungen sind vielseitig, sie betreffen z.B. die Archivierung von Ingenieur-Zeichnungen und Schaltplänen oder Katalogen, auch Mikrofiches für Instruktions- und Trainingszwecke sowie die Dokumentation in Museen, beispielsweise von Sammlungen von Briefmarken und Münzen. Autoreferat