

# Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien<sup>\*)</sup>

Von Prof. Dr. O. WESTPHAL und Dr. O. LÜDERITZ

Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Säckingen/Baden

Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien sind Träger verschiedener charakteristischer biologischer Wirkungen. Ihre chemische Erforschung ist daher von erheblichem, u. a. auch praktisch-klinischem Interesse. Es wird über Verfahren zur Isolierung und Reindarstellung der Lipopolysaccharide sowie Methoden zu ihrer Spaltung in einzelne Komponenten berichtet. Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Bausteinanalyse der Polysaccharid- und Lipoid-Komponenten und Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen dem chemischen Bau und der biologischen Funktion einzelner Komponenten werden diskutiert.

Das Interesse an der chemischen Erforschung bakterieller Polysaccharide ist durch die Erkenntnis wesentlich stimuliert worden, daß sie vielfach Träger charakteristischer biologischer Wirkungen sind. Zahlreiche Bakterien-Antigene haben sich als Polysaccharid-Symplexe erwiesen oder enthalten immunologisch spezifische Polysaccharid-Komponenten<sup>1, 2)</sup>. Das Baumaterial bakterieller Grenzflächen (Kapseln, Membranen) enthält fast regelmäßige Polysaccharide<sup>3)</sup>, welche eine besondere Rolle im Infektionsgeschehen bei der Auseinandersetzung zwischen Bakterium und Wirtsorganismus spielen. Auch beim Angriff von Phagen auf Bakterien sind Polysaccharide als Phagenrezeptoren nach neueren Erkenntnissen von wesentlicher Bedeutung.

Die Chemie bakterieller Polysaccharide wurde vor 30 Jahren durch Avery, Goebel und Heidelberger eröffnet, die erstmals die typenspezifischen Kapsel-Polysaccharide von *Pneumococci* hochgereinigt darstellten, ihren Aufbau erforschten und die immunologische Typenspezifität chemisch erklärten<sup>1, 2, 4)</sup>. Die Arbeiten an *Pneumococci*-Polysacchariden haben nicht nur die Chemie immunologisch wirksamer bakterieller Inhaltsstoffe nachhaltig bereichert, sondern darüber hinaus weitreichende Folgen von allgemeiner Bedeutung gezeitigt.

Goebel und Avery konnten die immunologische Spezifität der typenspezifischen *Pneumococci*-Polysaccharide auf bestimmte niedermolekulare Gruppen in der Größenordnung von Disacchariden zurückführen und damit die Grundkonzeption K. Landsteiners<sup>5)</sup> über das Zustandekommen immunologischer Spezifität, die ursprünglich an chemospezifischen künstlichen Antigenen gewonnen war, an natürlichen Antigenen bestätigen<sup>6)</sup>. M. Heidelberger und seine Mitarbeiter haben seit 1931 mit Hilfe stickstofffreier *Pneumococci*-Polysaccharide erstmals reine Antikörper aus Immunseren dargestellt, die sie als modifizierte Serumglobuline charakterisieren konnten<sup>7)</sup>. Seither ist die Erforschung der Natur der Antikörper eine Aufgabe der Protein-Chemie. In enzymatischen Untersuchungen fand R. J. Dubos<sup>8)</sup> mikrobielle Ausscheidungsprodukte (adaptives Exoenzym von *B. brevis* u. a.), welche bestimmte *Pneumococci*-Kapselpolysaccharide in vitro und in vivo auflösen vermögen, so daß bei Versuchen am höheren Tier die so entstehenden kapsellosen Cocci rasch der Phagozytose anheim fielen. Die praktische Auswirkung der Befunde erübrigte sich damals wegen der zur gleichen Zeit aufkommenden Sulfonamid-Therapie. Dennoch führte die konsequente Fortset-

zung dieser Untersuchungen nicht nur zu weiteren bakterienangreifenden Exoenzymen, sondern darüber hinaus zur Entdeckung bakteriostatischer und bakterizider Ausscheidungsprodukte von Mikroorganismen und hat damit stärkste Impulse für die einige Jahre später beginnende Ära der Antibiotika geliefert<sup>9)</sup>. Die Biosynthese spezifischer *Pneumococci*-Kapselpolysaccharide haben Avery und seine Mitarbeiter<sup>10)</sup> auf die Wirkung typeigener Desoxyribonucleinsäuren zurückführen können, deren geeignete Übertragung auf andere Typen (Rauhformen) zur bleibenden Transformation in jenen Typ führte, von welchem die betreffende Desoxyribonucleinsäure-Fraktion stammte. Dieser für die gesamte Genetik wichtige Modellversuch wurde inzwischen unter Einbeziehung weiterer Merkmale, wie der bakteriellen Resistenz oder Empfindlichkeit gegen Antibiotika durch R. D. Hotchkiss<sup>11)</sup> u. a. wesentlich erweitert, indem auch hier spezifische Desoxyribonucleinsäure-Fractionen für das betreffende Merkmal verantwortlich sind, wie durch entsprechende Übertragungsversuche bewiesen wurde.

Die Polysaccharide grampositiver Bakterien, wie jene der *Pneumococci*, sind im allgemeinen relativ einfach zusammengesetzt. Sie bestehen vielfach nur aus zwei oder höchstens drei Zuckerbausteinen, unter ihnen neben Hexosen und gelegentlich Aminohexosen häufig Uronsäuren. Im Bakterium scheinen sie locker an Nucleinsäuren verankert zu sein.

Demgegenüber sind die Polysaccharide aus gramnegativen Bakterien, wie solche der *Coli*-Gruppe, der *Salmonellen*, *Brucellen* u. a., wesentlich komplexer zusammengesetzt. Sie sind relativ fest mit Lipoiden zu komplexen Lipopolysacchariden verbunden, die ihrerseits in der Bakterienzelle an konjugierte Proteine und Lipide verankert sind. Ihre chemische Erforschung ist erst in den letzten 10–15 Jahren vorangetrieben worden<sup>12, 13)</sup>.

Während auch hier das ursprüngliche Interesse immunchemischer Art war, sich also auf die antigenen Eigenschaften der komplexen Lipopolysaccharid-Protein-Symplexe gründete, hat man im Laufe weiterer Untersuchungen entdeckt, daß die zugrunde liegenden Lipopolysaccharide sich von den Polysacchariden grampositiver Bakterien nicht nur chemisch, sondern auch biologisch wesentlich unterscheiden. Sie sind oft von beträchtlicher Toxizität und stark pyrogen<sup>12, 13)</sup>. Einige dieser Lipopolysaccharide sind wegen ihrer tumor-nekrotisierenden Wirkungen besonders bearbeitet worden<sup>14, 15)</sup>. Ihre chemische Erfor-

<sup>\*)</sup> Von der Schriftleitung zum *Behring-Jahr* erbetene Übersicht.

<sup>1)</sup> W. C. Boyd: *Fundamentals of Immunology*, 2. Aufl., Interscience Publ., New York, 1947. R. Doerr: *D. Immunitätsforschung*, Bd. III, Springer-Verlag, Wien, 1948. H. Schmidt: *Fortschr. d. Serologie*, 2. Aufl., Verlag Steinkopff, Darmstadt, 1953.

<sup>2)</sup> O. Westphal, diese Ztschr. 57, 57 [1944].

<sup>3)</sup> R. J. Dubos: *The Bacterial Cell*, Harvard Univ. Press, Cambridge Mass., 1947. — *The Nature of the Bacterial Surface*, herausgeg. v. A. A. Miles u. N. W. Pirie, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1949. — M. Burger: *Bacterial Polysaccharides*, Charles C. Thomas Publ., Springfield/Ill., 1950.

<sup>4)</sup> O. T. Avery, *Naturwiss.* 27, 777 [1933].  
<sup>5)</sup> K. Landsteiner: *The Specificity of Serological Reactions*, Harvard Univ. Press, Cambridge/Mass., 1944.

<sup>6)</sup> W. F. Goebel, *J. exper. Medicine* 68, 409 [1938].

<sup>7)</sup> M. Heidelberger, *Chem. Rev.* 24, 323 [1939].

<sup>8)</sup> R. J. Dubos, *Erg. Enzymforsch.* 8, 135–148 [1939].

<sup>9)</sup> Siehe z. B. A. E. Oxford, *Ann. Rev. Biochem.* 14, 751 [1945].

<sup>10)</sup> M. McCarthy, H. E. Taylor u. O. T. Avery, *Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol.* 11, 177 [1947]; vgl. a. A. Boivin u. Mitarb., *Experientia* 1, 334 [1945]. O. Westphal, diese Ztschr. 59, 69 [1947].

<sup>11)</sup> R. D. Hotchkiss: *The induction of resistance to antibiotics by transformation with desoxyribonucleates*. 2. Internat. Kongr. f. Biochemie, Paris, 1952, *Symp. sur le mode d'action des antibiotiques*, Verlag Sedes, Paris 1952.

<sup>12)</sup> Siehe z. B. den Übersichtsbericht von W. Burrows, *Ann. Rev. Microbiol.* 5, 181–196 [1951].

<sup>13)</sup> Siehe z. B. O. Westphal u. O. Lüderitz, *Dtsch. Med. Wschr., Allergie-Beilg.* 2, 17 [1953].

<sup>14)</sup> I. L. Bennett u. P. B. Beeson, *Medicine* 29, 365–400 [1950].

<sup>15)</sup> M. J. Shear u. Mitarb., *J. Nat. Cancer Inst.* 4, 81, 107, 123 [1943].

<sup>16)</sup> M. Ikawa, J. W. Koepfli, S. G. Mudd u. C. Niemann, ebenda 13, 157 [1952].

schung in Verbindung mit der Analyse ihres biologischen Wirkungsmechanismus ist daher von erheblichem Interesse und verspricht ebenfalls Ergebnisse von allgemeinerer Bedeutung.

### Verfahren zur Isolierung

In neuerer Zeit sind Methoden, insbes. von *Salton*<sup>18)</sup> beschrieben worden, mit deren Hilfe die intakten Zellmembranen (*cell wall*) gramnegativer Bakterien vom Cytoplasma abgetrennt werden können. Die Membran wird mechanisch aufgebrochen, wobei das Cytoplasma austritt. Man trennt durch fraktioniertes Zentrifugieren oder durch enzymatischen Abbau der cytoplasmatischen Inhaltstoffe. Die Membranen bestehen im wesentlichen aus Lipoid-, Polysaccharid- und Proteinmaterial, darunter die Lipopolysaccharide. Elektronenoptisch wurde gezeigt, daß der morphologische Feinbau von Membranen eine hohe Ordnung aufweisen kann<sup>17)</sup>.

Zur Isolierung der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien geht man entweder von Bakterien oder deren Autolysaten aus. Viele verschiedene Verfahren sind beschrieben worden; sie führen zu mehr oder weniger komplexen, hochmolekularen, wasserlöslichen Lipopolysacchariden mit unterschiedlichem Gehalt an Lipoid und gebundenem Protein.

A. *Boivin*, der als erster ein allgemein anwendbares Verfahren zur Extraktion stark antigener Lipopolysaccharid-Symplexe ausarbeitete, hat das Problem der Isolierung definierter bakterieller Extraktstoffe mit bestimmter biologischer Wirksamkeit (z. B. Antigenität) 1944 folgendermaßen formuliert<sup>18)</sup>:

„Heute hat man mehr und mehr Grund anzunehmen, daß die Bakterienzelle ihre ganz bestimmte physiko-chemische Struktur dadurch erhält, daß deren makromolekularen Bestandteile untereinander gebunden und gegenseitig orientiert sind, wobei ebenso relativ lockere primär-chemische Bindungen im Spiel sind wie verschiedene sekundäre Kohäsionskräfte nach Art derjenigen von *van der Waals*. Man könnte — ohne Gefahr der Paradoxie — versucht sein, zu sagen, daß eine lebende Zelle in letzter Analyse nichts anderes als ein einziges Riesenmolekül darstellt. So finden wir z. B. bei gramnegativen Keimen das typenspezifische Polysaccharid an der bakteriellen Oberfläche verankert und orientiert, welches unmittelbar an Phospholipid- oder Proteinmaterial gebunden ist, oder bei *Coccen* (*Pneumococcen*) an Nucleinsäuren. Unter der Wirkung verschiedener Agenzien kann die physiko-chemische Oberflächenstruktur der Bakterien zerbrechen, wobei entweder das gesamte Polysaccharid als nicht antigenes oder nur schwach antigenes Material frei wird, oder in Form eines stark antigenen Symplexes, in dem das gleiche Polysaccharid noch an Lipoid (Glycolipoid) oder an Lipoid und Protein (Glycolipo-Proteid) gebunden bleibt. Wenn dem so ist, sollte man nicht mehr vom bakteriellen Antigen im Sinne eines chemisch genau definierten Individuums sprechen, das in die bakterielle Struktur eingebaut ist, sondern vielmehr von der antigenen Funktion, welche das Polysaccharid innerhalb der strukturellen Ordnung an der Oberfläche des betreffenden Keims ausübt.“

Die gleichen Betrachtungen kann man auch hinsichtlich der endotoxischen, pyrogenen und anderer Funktionen anstellen.

Das Verfahren von *Boivin* und *Mesrobianu*<sup>19)</sup> besteht in der Behandlung der Bakterien mit 0,2 n Trichloressigsäure in der Kälte; es liefert Extrakte mit stark antigenem Material, welches hauptsächlich aus Polysaccharid und Lipoid aufgebaut ist („Glycolipoid-Antigene“). Präparate, welche nach dem Trichloressigsäure-Verfahren gewonnen werden, enthalten immer einen gewissen Anteil an Protein. Immunologisch sind sie Träger der somatischen O-Antigen-Funktion (Definition siehe<sup>11)</sup>) der betreffenden

Bakterien; wegen ihrer Toxizität sind sie auch als Endotoxine der Bakterien bezeichnet worden<sup>1, 20)</sup>.

*Raistrick* und *Topley*<sup>21)</sup> haben zur Gewinnung der O-Antigene der Salmonellen (Typhus-, Paratyphus-, Enteritis-Bakterien) den Aufschluß abgetöteter Bakterien mit Trypsin eingeführt. Das Verfahren wurde später von *Freeman*<sup>22)</sup> weiter ausgearbeitet und wird häufig angewandt. *Miles* und *Pirie*<sup>23)</sup> behandelten Brucellen mit 2proz. Phenol, fraktionierten das Autolysat mit Ammoniumsulfat und erhielten gereinigte komplexe Lipopolysaccharid-Protein-Antigene durch anschließende fraktionierte Zentrifugation. In eingehenden Untersuchungen über die Natur der O-Antigene von Dysenterie- und Typhus-Bakterien fanden *Morgan* und *Partridge*<sup>24, 25)</sup>, daß die antigenen Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Symplexe (*whole antigenic complex*) durch mehrfache Behandlung der getrockneten Bakterien mit Diäthylenglycol schonend extrahiert werden können. Allerdings lassen sich offenbar nicht alle gramnegativen Bakterien mit Diäthylenglycol extrahieren, wie z. B. *Goebel* bei Flexner-Ruhr-Bakterien fand<sup>26)</sup>. Bei diesen und anderen Bakterien bewährte sich die Extraktion mit Pyridin-Wasser (1:1)<sup>26, 27)</sup>, wobei wiederum stark antigenes und toxisches Lipopolysaccharid-Protein-Material in Lösung ging. *J. Walker*<sup>28)</sup> hat gezeigt, daß viele Bakterien beim Stehen mit 2,5 molarer Harnstoff-Lösung aufgeschlossen werden, wobei das somatische O-Antigen gelöst wird.

Ein weiteres Extraktionsprinzip, das sich als sehr allgemein anwendbar erwies, führten *Palmer* und *Gerlough*<sup>29)</sup> ein. Die Bakterien werden zunächst mit 90–95proz. Phenol extrahiert, wobei Proteinmaterial in Lösung geht; bei der anschließenden Behandlung mit Wasser geht das O-endotoxische, stark antigenes Lipopolysaccharid in Lösung. Die Antigenität, der Stickstoff-Gehalt und weitere analytische Daten der so aus Typhus- und anderen Bakterien erhaltenen Präparate sprechen dafür, daß sie noch schwer abspaltbares Protein enthalten. *Westphal*, *Lüderitz* und *Bister*<sup>30)</sup> haben das Verfahren vereinfacht, indem sie Bakterien in der Kälte mit Phenol/Wasser-Emulsionen behandelten, wobei sie zu ähnlichen Produkten wie *Palmer* und *Gerlough* gelangten. Extrahiert man die Bakterien in der Wärme (bis zu 65 °C) mit homogenen Phenol/Wasser-Mischungen<sup>30)</sup>, so wird von dem in Lösung gehenden Lipopolysaccharid-Protein-Symplex der Proteinanteil völlig abgespalten, so daß nach Abkühlung und Trennung der Schichten in der oberen wäßrigen Phase protein-freies Lipopolysaccharid neben Nucleinsäuren, in der unteren Phenolphase reines Protein gefunden wird. Dieses Verfahren ist ebenfalls allgemeiner anwendbar.

Sehr einfach gestaltet sich nach *Roberts*<sup>31)</sup> die Darstellung des rohen antigenen und endotoxischen Lipopolysaccharid-Proteins aus Colibakterien durch Extraktion mit Wasser bei 80–85 °C.

Zur weiteren Reinigung werden die Extrakte im allgemeinen gegen Wasser dialysiert und nach passender

<sup>18)</sup> M. R. J. *Salton* u. Mitarb., *Biochim. Biophys. Acta* 7, 19 [1951]; 9, 334 [1952]; 10, 512 [1953]; *J. gen. Microbiol.* 5, 405 [1951]; 9, 512 [1953]. Vgl. auch: C. *Weibull* u. Mitarb., *Biochim. Biophys. Acta* 10, 35 [1953]; W. *Weidel*, *Z. Naturforsch.* 6b, 251 [1951]; 7b, 145 [1952]; *Ann. Inst. Pasteur* 84, 60 [1953].

<sup>17)</sup> A. L. *Houwink*, *Biochim. Biophys. Acta* 10, 360 [1953].

<sup>18)</sup> A. *Boivin* u. A. *Delaunay*, *Bull. Acad. Méd.* 128, 357 [1944].

<sup>19)</sup> A. *Boivin* u. L. *Mesrobianu*, *Rev. d'Immunol.* 7, 553 [1935]; 2, 113 [1936]; 3, 319 [1937]; L. *Mesrobianu*: Les antigènes glyco-lipidiques des bactéries, Masson et Cie., Paris 1936.

<sup>20)</sup> Th. *Wagner-Jauregg*, diese Ztschr. 53, 319 [1940]; 55, 21 [1942].

<sup>21)</sup> H. *Raistrick* u. W. W. C. *Topley*, *Brit. J. exp. Pathol.* 15, 113 [1934]; *Lancet* 1937, I, 252.

<sup>22)</sup> G. G. *Freeman* u. Mitarb., *Biochemic. J.* 34, 307 [1940]; 35, 564 [1941]; 36, 340, 355 [1942]; 37, 601 [1943].

<sup>23)</sup> A. A. *Miles* u. N. W. *Pirie*, *Brit. J. exp. Pathol.* 20, 83 [1939].

<sup>24)</sup> W. T. J. *Morgan*, *Biochemic. J.* 31, 2003 [1937].

<sup>25)</sup> W. T. J. *Morgan* u. S. M. *Partridge*, *Brit. J. exper. Pathol.* 23, 151 [1942].

<sup>26)</sup> W. F. *Goebel*, F. *Binkley* u. E. *Perlman*, *J. exp. Medicine* 81, 315 [1945].

<sup>27)</sup> E. E. *Baker*, W. F. *Goebel* u. E. *Perlman*, ebenda 89, 325 [1949].

<sup>28)</sup> J. *Walker*, *Biochemic. J.* 34, 325 [1940].

<sup>29)</sup> J. W. *Palmer* u. T. D. *Gerlough*, *Science* [New York] 92, 155 [1940].

<sup>30)</sup> O. *Westphal*, O. *Lüderitz* u. F. *Bister*, *Z. Naturforsch.* 7b, 148 [1952].

<sup>31)</sup> R. S. *Roberts*, *J. comparat. Pathol. Therapeut.* 59, 284 [1952].

Konzentrierung mit organischen Lösungsmitteln fraktioniert gefällt. Wegen des sehr hohen Molekulargewichts bewährt sich auch die fraktionierte Zentrifugierung bei höheren Tourenzahlen<sup>22, 28</sup>), wie sie erstmals *Miles* und *Pirie*<sup>23</sup>) anwandten. Es werden so relativ einfach weitgehend gereinigte und in manchen Fällen elektrophoretisch homogene Lipopolysaccharide erhalten, die sich lediglich dadurch unterscheiden, daß am Polysaccharid mehr oder weniger Lipid- und Proteinmaterial gebunden sein kann. Für die biologischen Eigenschaften dieser Substanzen aus gramnegativen Bakterien sind die nicht-polysaccharidischen Komponenten vielfach von besonderer Bedeutung.

### Physikalische Eigenschaften

Die nach den genannten Verfahren erhaltenen Lipopolysaccharide bilden mehr oder weniger stark viscose, opaleszierende wäßrige Lösungen.

Bei  $p_H$ -Werten von 8–9 wandern die Lipopolysaccharide und Lipopolysaccharid-Proteine im elektrischen Feld langsam als Anionen, bedingt durch einen Gehalt an Phosphorsäureester, der allen Präparaten eigen ist. Es sind verschiedene elektrophoretisch homogen wandernde Präparate beschrieben worden<sup>14, 24, 25, 26</sup>). In der Ultrazentrifuge tritt schon bei mäßigen Schwerefeldern rasche Sedimentation ein. Nach *Miles* und *Pirie*<sup>23</sup>) besitzt das von ihnen dargestellte Lipopolysaccharid aus *Brucella melitensis* in wäßriger Lösung Teilchengewichte von ca. 1 Million. *Shear*<sup>14</sup>) fand für das tumornekrotisierende Lipopolysaccharid aus *Serratia marcescens* (*B. prodigiosus*) Teilchengewichte in der Größenordnung von 10 Millionen, *Davies* und *Morgan*<sup>23</sup>) für den Lipopolysaccharid-Protein-Symplex aus *B. dysenteriae* Shiga bei  $s_{20}$ -Werten von 130–150 S Teilchengewichte ebenfalls von ~ 10 Millionen. Gemeinsam mit *G. Schramm*<sup>26</sup>) erhielten wir für ein stark pyrogenes Coli-Lipopolysaccharid  $s_{20}$ -Werte von 175–193 S und errechneten Teilchengewichte von ca. 20 Millionen. Man kann jedoch z. B. elektronenoptisch<sup>26</sup>) zeigen, daß diese großen Teilchen Aggregate kleinerer Grundeinheiten mit Teilchengewichten von ca. 1 Million darstellen. Die kugelförmigen Grundeinheiten aggregieren weitgehend reversibel und  $p_H$ -abhängig zu langen, perlschnurartigen Aggregaten, so daß sich die Substanz in der Ultrazentrifuge nicht homogen verhält.

In jedem Fall liegen die bakteriellen Lipopolysaccharide in wäßriger Lösung als Makromolekeln vor, für welche es charakteristisch zu sein scheint, daß sie zur Aggregation neigen.

### Chemisches Bauprinzip

Für die Erforschung der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien ist es von Bedeutung, welche der besonderen biologischen Eigenschaften — sei es als Antigen, als Toxin, als Pyrogen, als tumornekrotisierendes Agens usw. — der jeweilige Bearbeiter im Auge hat. Im chemischen Sinne kann man jedoch alle diese Wirkungen von einem Substanztyp ableiten, nämlich hochmolekularen Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Symplexen, die entweder selbst den biologischen Wirkstoff darstellen, oder aus denen der optimal wirksame Stoff durch Dissoziation unter Abspaltung einzelner Teilkomponenten hervorgeht. Alle Glattformen der bislang untersuchten gramnegativen Bakterien bilden derartige Lipopolysaccharid-Protein-

Symplexe nach sehr ähnlichen chemischen Bauprinzipien, und mit Hilfe der beschriebenen Verfahren erhält man entweder die genuinen Symplexe oder Dissoziationsprodukte von diesen.

Als Prototyp des schonend gewonnenen genuinen Materials dürfen die fraktionierten und hochgereinigten Diäthylenglycol-Extrakte nach *Morgan* und *Partridge*<sup>24, 25, 27, 28</sup>) aus Ruhr- und Typhusbakterien angesehen werden. Ähnlichen chemischen Aufbau besitzen die antigenen *Brucella*-Extrakte nach *Miles* und *Pirie*<sup>23</sup>) und jene aus *Shigella paradysenteriae* (*Flexner*) nach *Goebel* und Mitarbeitern<sup>26, 27</sup>). Diese hochmolekularen Symplexe bestehen aus den in Bild 1 wiedergegebenen Komponenten, welche im genuinen Material aneinander gebunden sind (Bild 1).

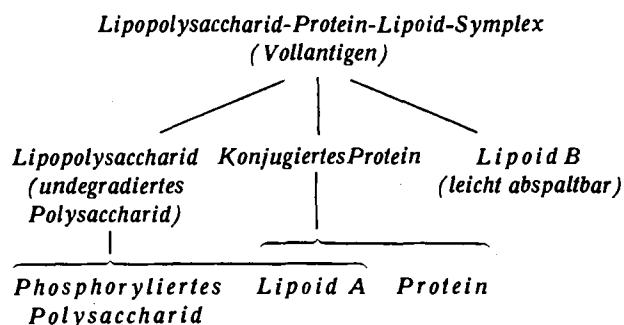


Bild 1  
Die Komponenten der Lipopolysaccharid-Protein-Symplexe

Am Aufbau der genuinen Symplexe sind die Komponenten ungefähr folgendermaßen beteiligt: ~45–60% phosphoryliertes Polysaccharid, ~5–15% Phospholipoid A, ~15–20% Protein und ~10% Phospholipoid B. Der genuine Symplex wird im allgemeinen in einer Ausbeute von 5–10% aus den Bakterien gewonnen.

Die einzelnen Komponenten konnten mittels verschiedener Verfahren voneinander getrennt werden. Erhitzen mit verd. Essigsäure<sup>27, 28</sup>) führt z. B. zur Spaltung in Phospholipoid B, Polysaccharid und konjugiertes Protein. Bei der Fraktionierung alkalischer Lösungen mit Alkohol tritt Spaltung der genuinen Symplexe in Lipoid B, undegradiertes Lipopolysaccharid und Protein ein. Phospholipoid B kann auch selektiv durch Einwirkung von Formamid<sup>29</sup>), insbesondere nach Zusatz von Spuren Ameisensäure, oder mittels Phenol<sup>30</sup>) abgespalten werden. Dagegen ist das Phospholipoid A relativ fest im Symplex gebunden, es läßt sich durch Formamid oder Phenol nicht abspalten<sup>28</sup>). Man erhält dieses Lipoid in übersichtlicher Weise aus (protein- und lipoid-B-freien) undegradierten Lipopolysaccharid-Präparaten, wie sie nach *Morgan*<sup>25, 27, 28</sup>) und *Goebel*<sup>29</sup>) aus den Vollantigenen, oder nach *Westphal*<sup>30</sup>) mittels Phenol/Wasser direkt aus den Bakterien dargestellt werden können. Hydrolyse derartiger reiner undegradierter Lipopolysaccharide mit verdünnter Säure führt zu einer Spaltung in degradiertes Polysaccharid und wasserunlösliches Phospholipoid A<sup>15, 32, 33, 40, 41</sup>), das sich von dem Phospholipoid B charakteristisch unterscheidet.

Die umfangreichen Spaltungsversuche an Lipopolysaccharid-Protein-Symplexen und an partiellen Spaltprodukten sind wiederholt beschrieben worden.

Die oben angeführten Komponenten wurden hinsichtlich ihrer chemischen Bausteine teilweise eingehend analysiert; andererseits hat man versucht, ihre Funktion in Beziehung zu bestimmten biologischen Wirkungen zu erforschen.

<sup>22</sup>) O. Westphal, O. Lüderitz, E. Eichenberger u. W. Keiderling, Z. Naturforsch. 7b, 536 [1952].

<sup>23</sup>) D. A. L. Davies u. W. T. J. Morgan, 6. Internat. Kongr. f. Mikrobiol., Rom, 1953, Abstr. No. 317 [1954], im Druck.

<sup>24</sup>) M. A. Jesaitis u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine 96, 409 [1952].

<sup>25</sup>) W. F. Goebel u. M. A. Jesaitis, ebenda 96, 425 [1952].

<sup>26</sup>) G. Schramm, O. Westphal u. O. Lüderitz, Z. Naturforsch. 7b, 594 [1952].

<sup>27</sup>) W. T. J. Morgan u. S. M. Partridge, Biochemic. J. 34, 169 [1940].

<sup>28</sup>) W. T. J. Morgan u. S. M. Partridge, ebenda 35, 1140 [1941].

<sup>29</sup>) F. Binkley, W. F. Goebel u. E. Perlman, J. exp. Medicine 81, 331 [1945].

<sup>40</sup>) A. A. Miles u. N. W. Pirie, Brit. J. exper. Pathol. 20, 278 [1939].

<sup>41</sup>) C. Tal u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine 92, 25 [1950].

## Biologische Wirkungen

Ausführlich untersucht wurde das antigene Verhalten. Bei derartigen Untersuchungen ist die verwendete Tierart, wie man heute weiß, von erheblicher Bedeutung. Auf Grund jahrelanger Kaninchenversuche glaubte man, daß Polysaccharide ohne Proteinträger allgemein keine Antikörperbildung anregen könnten, also nur Haptene (Halbantigene) sind<sup>2)</sup>. Reine Polysaccharide sind in der Tat für Kaninchen nicht antigen. Es hat lange gedauert bis man entdeckte<sup>43)</sup>, daß der Mensch nach Injektion reiner (protein-freier) Pneumococcal-Polysaccharide sehr wirksame und spezifische Immunkörper bilden kann.

Die genuinen Lipopolysaccharid-Protein-Symplexe aus gramnegativen Bakterien sind starke Antigene<sup>24, 25, 43, 44, 45)</sup> und Träger der sog. O-Spezifität (O-Antigene), wobei der Polysaccharid-Anteil die wesentliche spezifitätsbestimmende Komponente darstellt. Das Protein übt, ohne spezifitätsbestimmenden Beitrag, eine steigernde Wirkung auf die Antigenität aus. Lipoid B scheint keine Rolle zu spielen. Über die antigenen Funktionen von Lipoid A ist noch nichts Näheres bekannt.

Reine Lipopolysaccharide sind, auch ohne Proteinträger, für Kaninchen deutlich, wenn auch nicht optimal, antigen<sup>27, 28, 45)</sup>. Nach Untersuchungen von Hurni<sup>46)</sup> genügt die wiederholte Injektion von 0,01 µg/kg der Lipopolysaccharide aus *E. coli* oder *S. abortus equi*<sup>30, 32)</sup>, um beim Kaninchen Immunkörper zu erzeugen, welche die betreffenden Keime agglutinieren. Die Spezifität der erhaltenen Antiseren ist im allgemeinen herabgesetzt, indem häufig übergreifende Reaktionen beobachtet werden. Morgan<sup>24, 28)</sup> fand z. B. in derartigen Antiseren Hämolyse gegen Schafblutkörperchen. Antiseren, welche man durch Injektion von Vollkeimen herstellt, präzipitieren spezifisch das homologe Lipopolysaccharid. Hinsichtlich der antigenen Spezifität ergeben sich also Unterschiede, ob man Vollbakterien oder isolierte hochgereinigte Komponenten der genuinen Symplexe als Antigene verwendet.

Die Lipopolysaccharide sind Träger der O-endotoxischen Eigenschaften der betreffenden Bakterien<sup>20, 32, 39)</sup>. Die mittlere letale Dosis bei parenteraler Injektion liegt für Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen in der Größenordnung von 0,5–10 mg/kg. Soweit bisher untersucht, sind die meisten Lipopolysaccharide hinsichtlich der Erzeugung des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens beträchtlich aktiv<sup>14, 47)</sup>. Zur Erzeugung des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens<sup>47a)</sup> gibt man geeigneten Versuchstieren (Kaninchen) eine „vorbereitende“ lokale Erstinjektion (z. B. subkutan), der man nach 24 Stunden eine (intravenöse) „auslösende“ Zweitinjektion folgen läßt. Es kommt danach am Ort der Erstinjektion zu einer hämorrhagischen Nekrose. Die Reaktion ist nicht immunspezifischer Art, da zur Erst- und Zweitinjektion immunologisch verschiedene Stoffe verwendet werden können. Die Lipopolysaccharide sind sowohl vorbereitend wie auslösend mehr oder minder aktiv<sup>47)</sup>. Die minimal wirksamen Dosen reiner Lipopolysaccharide (z. B. von Ruhr- oder *Pseudomonas*-Bakterien, sowie von Salmonellen) betragen bei Kaninchen ca. 1–5 µg Intracutan (vorbereitend) und ca. 100–200 µg intravenös (auslösend). Später fanden Gratia und Linz<sup>48)</sup>, daß sich verschiedene Arten von Tumoren wie Organe verhalten, die durch eine lokale Injektion von

bakteriellen Toxinen „sensibilisiert“ (vorbereitet) sind: eine einzige intravenöse Toxin-Injektion führt bei den Tumortieren zu hämorrhagischen Nekrosen im Tumorgewebe und zur Regression des Tumors. Die tumornekrotisierenden Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide wurden später insbesondere von Hutner und Zahl<sup>49)</sup>, Shear<sup>14)</sup> und Niemann und Mitarbeiter<sup>15)</sup> weiter untersucht.

Viele Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien sind für das höhere Tier und den Menschen sehr wirksame Reizstoffe. Ihre intravenöse Injektion führt, bereits in minimalen Dosen, zu Fieber, Verschiebungen im weißen Blutbild (wie Leukopenie und Leukocytose), Aktivierung hormoneller und enzymatischer Systeme, Änderungen im Stoffwechsel, Stimulierung pharmakologisch aktiver endogener Wirkstoffe u. a. Zwar gibt es zahlreiche körperfremde Substanzen, wie kolloiden Schwefel, kolloides Calciumphosphat<sup>50)</sup>, gewisse Lipoidgemische (aus Gehirn), Proteinabbauprodukte<sup>51)</sup> u. a., deren Injektion ebenfalls zur Auslösung derartiger oder ähnlicher Mechanismen führen kann; es hat sich jedoch ergeben, daß die Lipopolysaccharide aus gramnegativen Bakterien quantitativ die weitaus wirksamsten Reizstoffe sind.

Wegen ihrer fiebererzeugenden (pyrogenen) Wirkung besitzen derartige Stoffe seit langem praktisch-klinisches Interesse zur Erzeugung künstlichen Heißfiebers bei der sog. unspezifischen Reiztherapie. Die Entwicklung dieses Forschungsgebietes, einschließlich seiner früheren chemischen Bearbeitung ist bereits beschrieben worden<sup>12, 22)</sup>. Praktisch nicht minder bedeutsam ist das Problem, unerwünschte Pyrogene aus wäßrigen Lösungen, insbes. aus Injektionsflüssigkeiten zu entfernen<sup>52)</sup>. Wegen der relativen Stabilität bakterieller Pyrogene ist das Problem bisher auf chemischem Wege nicht befriedigend gelöst worden.

Man kann klinische Reizwirkungen auch einfach durch Injektion abgetöteter Vollbakterien (Vaccine) erzielen. Indessen versuchte man bald, die zugrunde liegenden aktiven Stoffe anzureichern und ihre chemische Natur aufzuklären. Co Twi und seine Mitarbeiter<sup>53)</sup> dürften vor etwa 20 Jahren die ersten gewesen sein, die ein Pyrogen aus Typhusbakterien anreicherten und orientierend analysierten. Viele in der Zwischenzeit ausgeführten Untersuchungen deuteten darauf hin, daß die wirksamsten Pyrogene Polysaccharidcharakter besitzen. Das von Shear<sup>14)</sup> aus *Serratia marcescens* dargestellte tumornekrotisierende Lipopolysaccharid erwies sich in Untersuchungen von Beck und Fisher<sup>44)</sup> als hochwirksames Pyrogen, dessen pyrogene Grenzdosis für Kaninchen in der Größenordnung von 0,005 µg/kg lag. In neuerer Zeit haben Westphal, Lüderitz und Mitarbeiter<sup>14, 22)</sup> das Problem wieder aufgenommen. Es ließ sich nachweisen, daß optimal wirksame Bakterienpyrogene reine, protein-freie Lipopolysaccharide sind, daß also von den genuinen Symplexen nur wenige Komponenten erforderlich sind. Mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens<sup>50)</sup> konnte z. B. aus einem *Escherichia*-Stamm (*E. coli*-Kröger 08)\* ein reines Lipopolysaccharid dargestellt werden, dessen pyrogene Grenzdosis beim Kaninchen 0,002 µg/kg, beim Menschen ca. 0,001 µg/kg beträgt. Optimale klinische Reizwirkungen am Menschen erzielt man bei derartigen Lipopolysacchariden mit intravenösen Injektionen von etwa 0,5 µg total. Bei einem Teilchengewicht der Grundeinheiten von ~1 Million<sup>54)</sup> ergibt sich somit, daß zur Auslösung starker Reizwirkungen beim Menschen die Injektion von rund 10<sup>11</sup> Molekülen des Lipopolysaccharids genügt<sup>45)</sup>.

Die Forschungen auf diesem Gebiet wurden neuerdings u. a. auch dadurch erheblich stimuliert, daß man weitere Wirkungen von biologischem und vor allem auch klinischem Interesse auffand. Lipopolysaccharide aktivieren beim höheren Tier und Mensch das zur Regulierung der Entzündungsbereitschaft wichtige Hypophysen-Nebennie-

<sup>43)</sup> M. Heidelberger u. Mitarb., ebenda 83, 303 [1946].

<sup>44)</sup> A. A. Miles u. N. W. Pirie, Brit. J. exper. Pathol. 20, 109 [1939].

<sup>45)</sup> W. T. J. Morgan u. H. Schütze, Lancet 1943, II, 284.

<sup>46)</sup> W. F. Goebel u. Mitarb., Science [New York] 99, 412 [1944]; J. exp. Medicine 87, 349 [1945]; 84, 223, 235 [1946].

<sup>47)</sup> H. Hurni, unveröffentlicht.

<sup>47a)</sup> J. Y. Homma, K. Sageshashi, S. Hosoya, Y. Yagi, Y. Sugino u. F. Egami, Jap. J. exp. Med. 19, 245 [1949]; 27, 361, 381 [1951]; 22, 17, 69 [1952]; Y. Takeda, Rev. Canad. Biol. 12, 347 [1953]; T. Ogata, unveröffentlicht; H. Hurni, unveröffentlicht.

<sup>48a)</sup> G. Schwartzman: Phenomenon of local tissue reactivity. Verlag F. B. Hoeber, New York 1947; vgl. auch: Hemorrhage, Ann. N. Y. Acad. Sci. 49, 483–660 [1948].

<sup>49)</sup> A. Gratia u. R. Linz, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 108, 427 [1931].

<sup>49)</sup> S. H. Hutner u. P. A. Zahl, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 52, 364; 54, 48 [1943].

<sup>50)</sup> F. Blister u. F. J. Geks, Z. Naturforsch. 8b, 667 [1953].

<sup>51)</sup> Siehe z. B. V. Menkin, Int. Arch. Allergy 4, 131–168 [1953]; W. G. Spector, J. Pathol. Bacteriol. 63, 93 [1951].

<sup>52)</sup> Z. B. H. Wilke u. H. E. Voss, Arzneimittelforsch. 4, 8 [1954].

<sup>53)</sup> Co Twi, D. Hope, M. H. Schmitt u. J. Powers, J. Lab. Clin. Medicine 29, 58 [1944].

<sup>54)</sup> L. V. Beck u. M. Fisher, Cancer Res. 6, 416 [1946].

<sup>\*</sup> Nach neueren Untersuchungen von Dr. J. Ørskov (Kopenhagen) handelt es sich um einen *E. freundli*-Stamm mit Coll 08-Antigen.

<sup>55)</sup> O. Westphal u. B. Kickhöfen, Z. Rheumaforsch. 12, 321 [1953].

renrinden-System<sup>56</sup>); sie fördern ferner das Phagocytovermögen der weißen Blutzellen<sup>57</sup>). Bei der Wundheilung unterdrücken sie die Narbenbildung<sup>58</sup>). Besonders wichtig sind die Befunde von Windle und Mitarbeitern<sup>59</sup>) sowie von Bammer<sup>60</sup>), wonach sehr kleine Dosen bakterieller Reizstoffe (Lipopolysaccharide) die Nervenregeneration stark fördern können. Dabei werden optimale Effekte nur innerhalb relativ enger Dosierungsgrenzen mit Quantitäten erreicht, welche im allgemeinen eben pyrogen sind. Die Wirksamkeit der Lipopolysaccharide ist hierbei relativ spezifisch, indem z. B. pyrogene Nucleinsäuren nicht wirksam sind<sup>59, 60</sup>).

Die volle praktische Auswertung aller dieser und weiterer physiologischer Befunde zu klinischen Zwecken setzt quantitative Untersuchungen voraus, d. h. daß die betreffenden Wirkstoffe in chemisch definierter Form und sicher dosierbar vorliegen müssen.

Aus diesem Grunde haben wir vor einigen Jahren begonnen, uns mit der chemischen Natur der bakteriellen Lipopolysaccharide (Polysaccharid-Lipoid A-Komplexe; vgl. Bild 1) zu befassen. Über den derzeitigen Stand der chemischen Analyse, wie er sich auf Grund der Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise, einschließlich des eigenen, ergibt, berichten wir nachstehend.

### Chemische Analyse der Lipopolysaccharide

Die reinen Lipopolysaccharide aus verschiedenen gramnegativen Bakterien ergeben jeweils sehr ähnliche Analysenwerte. In Tabelle 1 bringen wir einige Beispiele.

In den Lipopolysacchariden sind ~10–30% Lipoid A enthalten. Der Stickstoff der Präparate bezieht sich im wesentlichen auf deren Hexosamin-Gehalt (Glucosamin, Chondrosamin), der Rest ist im Lipoid enthalten. Der Phosphor ist zum größeren Teil als Esterphosphat an der Polysaccharid-Komponente gebunden, ein kleinerer Teil

findet sich im Lipoid A, welches demnach als Phospholipoid zu bezeichnen ist. Der Gehalt an (C)—CH<sub>3</sub><sup>62</sup>) entfällt überwiegend auf Methyl-Zucker (Methylpentosen bzw. Methyl-desoxypentosen) der Polysaccharid-Komponente, zum geringeren Teil auf endständige Methyl-Gruppen von Fettsäuren in Lipoid A. — Alle Präparate enthalten Acyl-Gruppen. Im allgemeinen wurden diese als Acetyl bestimmt. Miles und Pirie<sup>63</sup>) haben jedoch gezeigt, daß im *Brucella*-Lipopolysaccharid N-Formyl-Gruppen vorliegen und empfehlen bei ähnlichen Analysen eine eindeutige Differenzierung zwischen Acetyl- und Formyl-Gruppen, was nur in wenigen Fällen berücksichtigt worden ist. In *Shigella flexneri* identifizierten Stein und Schnell<sup>64</sup>) die Acyl-Gruppen eindeutig papierchromatographisch als Acetyl-Gruppen.

Erhitzen neutraler wässriger Lösungen auf 100 °C während einiger Stunden beeinflusst nach unseren Erfahrungen die pyrogenen und toxischen Eigenschaften nicht merklich. Bei der Hydrolyse mit verdünnter Säure werden reduzierende Zucker, Phosphorsäure und in Wasser unlösliches Lipoid A in Freiheit gesetzt. Am Lipopolysaccharid aus *Brucella melitensis* wurde die schrittweise Inaktivierung einzelner biologischer Wirkungen (serologische Eigenschaften, Toxizität, entzündliche Wirkung an der Haut u. a.) im Zusammenhang mit der Freisetzung von Lipoid A, Phosphorsäure, primären Amino-Gruppen u. a. verfolgt<sup>65</sup>). — Mit 1 n Mineralsäuren ist die maximale Reduktionswirkung der freigesetzten Zucker im allgemeinen nach 3–6 h erreicht. Während dieser Zeit sind die Phosphorsäureester-Gruppen der Polysaccharid-Komponente noch nicht vollständig freigesetzt<sup>66</sup>). Gelegentlich sind phosphorylierte Monosaccharide isoliert worden<sup>67</sup>). Zur hydrolytischen Spaltung des gesamten Esterphosphats bedarf es längerer Säureeinwirkung oder höherer Säurekonzentrationen<sup>67</sup>). Die Esterphosphat-Gruppen erweisen sich gegen alkalische Phosphatase als weitgehend resistent<sup>68</sup>); im allgemeinen werden nicht mehr als 10–20% als anorganisches Phosphat frei<sup>61</sup>). Wir fanden, daß vom Lipopolysaccharid aus *S. abortus equi* innerhalb 72 h maximal 15% des Esterphosphats gespalten wurden, worauf die Reaktion zum Stillstand kam. Morgan und Thayssen<sup>68</sup>) beobachteten, daß das spezifische Polysaccharid von *Shiga*-Ruhrbakterien durch ein Enzymkonzentrat aus *Myzococcus* hydrolytisch abgebaut und dabei serologisch inaktiviert wird.

Bakterienspecies	Bezeichnung d. Präp.	C	H	N	P	(C)—CH <sub>3</sub> <sup>61</sup>	Hexosamin	Autoren u. Lit.
<i>Brucella melitensis</i>	AP, Aminopolyhydroxy-compound	48–50	7,5	5,4	0,5–0,6			Miles u. Pirie <sup>63</sup> )
<i>B. dysenteriae</i> Shiga	Undegraded polysaccharide (Alkali-Methode)			2,07	0,57			Morgan u. Partridge <sup>38</sup> )
"	(Phenol-Methode)			1,82	0,75			Morgan u. Partridge <sup>38</sup> )
<i>B. dysenteriae</i> Shiga (O16-Prigge)	Lipopolysaccharid			2,2	3,0	3,5	12,1	Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )
<i>Shigella sonnei</i>	Lipocarbohydrate	45,4	7,1	2,8	3,9		8,3	Jesaitis u. Goebel <sup>34</sup> )
" sonnei (Variante)	Lipocarbohydrate			2,0	2,4		7,7	Goebel u. Jesaitis <sup>35</sup> )
" flexneri	CT; Toxic carbohydrate			2,72	1,72		16,4	Binkley, Goebel u. Perlman <sup>39</sup> )
<i>Salmonella abortus equi</i>	Lipopolysaccharid	48,6	7,3	1,3	2,8	3,2	8,7	Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )
" typhi O 901	Lipopolysaccharid			1,6	3,0	2,6	8,8	Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )
" paratyphi B (Kröger)	Lipopolysaccharid	48,4	7,1	1,4	2,6	3,4	7,7	Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )
" enteritidis Gärtner	Lipopolysaccharid	49,1	7,2	1,1	2,2	3,2	7,3	Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )
<i>Serratia marcescens</i> (B. Prodigiosus)	Hemorrhage-producing polysaccharide	47,5	7,1	2,2	1,1			Hartwell u. Shear <sup>14</sup> )
<i>E. coli</i>	Fract. 2, tumoremorrhagic agent			1,9	1,4–1,7		17–18	C. Niemann et. al. <sup>15</sup> )
" 08 (Kröger)	Polysaccharidpyrogen	48,4	6,8	1,0	2,1	4,8	5,9	Westphal u. Lüderitz <sup>33</sup> )
" 018 (Kauffmann)	Lipopolysaccharid	47,2	6,0	1,7	2,6	1,9		Westphal u. Lüderitz <sup>41</sup> )

Tabelle 1. Analytische Daten einiger Lipopolysaccharide aus gramnegativen Bakterien

<sup>56</sup>) Z. B. M. D. Altschule, B. H. Parkhurst u. E. Promisel, Arch. internal. Med. 85, 505 [1950]; W. Keiderling u. O. Westphal, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 57, 66 [1951]; W. Keiderling, F. Wöhler u. O. Westphal, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 217, 293 [1953].  
<sup>57</sup>) E. Fritze, P. Doering u. H. Manecke, Schweiz. Med. Wschr. 83, 783 [1953].  
<sup>58</sup>) W. F. Windle, Arch. Neurol. Psychiatr. 65, 261 [1951]; F. Greene, Amer. J. Physiol. 167, 789 [1951].  
<sup>59</sup>) W. F. Windle, Trans. N. Y. Acad. Sci. 14, 159 [1952].  
<sup>60</sup>) H. Bammer u. V. Martini, Pflügers Arch. 257, 308 [1953].  
<sup>61</sup>) O. Westphal u. O. Lüderitz, 6. Internat. Kongr. f. Mikrobiol., Rom 1953, Abstr. No. 400 [1954], im Druck.

<sup>62</sup>) F. Pregl u. H. Roth: Quant. organ. Mikroanalyse, 5. Aufl., Springer-Verlag, Wien 1947, S. 248.  
<sup>63</sup>) A. A. Miles u. N. W. Pirie, Biochem. J. 33, 1709, 1716 [1939].  
<sup>64</sup>) M. W. Stein u. G. W. Schnell, J. biol. Chemistry 203, 837 [1953].  
<sup>65</sup>) Vgl. z. B. J. G. Feinberg u. W. T. J. Morgan, Brit. J. exp. Pathol. 34, 104 [1953].  
<sup>66</sup>) M. W. Stein u. G. W. Schnell, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 734 [1953].  
<sup>67</sup>) Siehe z. B. A. Bendich u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 166, 283 [1946].  
<sup>68</sup>) W. T. J. Morgan u. A. Thayssen, Nature [London] 132, 604 [1933].

Hydrolysate der Lipopolysaccharide dienen nach Abtrennung von Lipoid A zur qualitativen und quantitativen Bestimmung einzelner Zuckerbausteine.

### Zuckerbausteine

In früheren Jahren war die Identifizierung einzelner Zucker aus Hydrolysengemischen eine sehr umständliche Aufgabe, auch konnten dabei leicht Hydrolysenprodukte dem Nachweis entgehen. Seitdem papierchromatographische Methoden zur Verfügung stehen, hat sich der Nachweis einzelner Zucker aus Gemischen wesentlich vereinfacht. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bei derartigen papierchromatographischen Analysen gefundenen Zuckerbausteine einiger Polysaccharid-Komponenten aus Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.

Wendet man Tabelle 2 um 90°, so kann sie wie ein Chromatogramm betrachtet werden, das tatsächlichen Chromatogrammen prinzipiell gleicht (nach Chromatographie mit Pyridin/Butanol/Wasser<sup>76</sup>). Es fällt auf, daß einige Zuckerbausteine bevorzugt angetroffen werden. So findet sich in nahezu allen bisher untersuchten Lipopolysacchariden Hexosamin, welches meist als D-Glucosamin vorliegt. Gelegentlich wurde auch Galactosamin neben Glucosamin gefunden<sup>64</sup>). Von den Hexosen sind Galactose und Glucose bevorzugt, bei den Salmonellen überdies häufig Mannose. Unter den Methylpentosen findet sich vielfach L-Rhamnose. Daneben konnten neuerdings zwei bisher unbekannte Zuckerbausteine aufgefunden werden<sup>71, 72, 76, 77</sup>), die sich durch höhere R<sub>F</sub>-Werte als die Methylpentosen auszeichnen. Es gelang Westphal, Lüderitz und Mitarbeitern<sup>76</sup>) aus den Hydrolysaten von *S. typhi* O 901 und *S. abortus equi*

die beiden Zucker, Tyvelose und Abequose, rein darzustellen und durch Umsetzung mit p-Nitrophenyl-sulfonylhydrazid als entsprechende Sulfonylhydrazone zu kristallisieren und zu analysieren. Beide Zucker besitzen die Formel C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> und erwiesen sich als stereoisomere Methyl-desoxyaldopentosen, wahrscheinlich mit verzweigter Kohlenstoffkette. Es scheint, daß Tyvelose und Abequose als Bausteine von Lipopolysacchariden bei gramnegativen Bakterien weit verbreitet vorkommen.

Manche der analysierten Polysaccharide sind relativ einfach zusammengesetzt, wie z. B. diejenigen von *E. coli* NC VI und 055; andere enthalten eine relativ große Zahl von Zuckerbausteinen, wie z. B. fast alle Salmonellen, bei denen bis zu 6 verschiedene Zucker angetroffen wurden, obwohl sehr wahrscheinlich weitgehend einheitliche Stoffe vorlagen. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Polysaccharide gramnegativer Bakterien gegenüber jenen der grampositiven Keime durch ihre wesentlich komplexere Zusammensetzung.

### Lipopolysaccharide aus Rauhformen

Auf festen Nährböden (z. B. Agarplatten) wachsen Bakterien normalerweise in Kolonien mit „glatter“ Oberfläche, weshalb man sie als Glattformen (smooth, S-Form) bezeichnet. Unter bestimmten Bedingungen finden bei Glattformen Veränderungen statt, die man in der Kultur beobachten kann und die als Formwechsel<sup>1, 78</sup>) bezeichnet werden, wobei die Glattform (smooth, S-Form) in die sogenannte Rauhform (rough, R-Form) umschlägt. Mit dem morphologischen Formwechsel glatt → rauh ist vielfach ein serologischer Wechsel O → o verbunden, d. h. daß die Rauhformen kein O-Antigen mehr bilden, weshalb man sie als o/Rauh-Formen (Ro) bezeichnet zur Unterscheidung von den O/Glatt-Formen (SO). Bei pathogenen Keimen

Bakterienspecies	Hexosamin	Galactose	Heptosen	Glucose	Mannose	Xylose	Fucose	Rhamnose	Schnelle Komponenten**)		Autoren u. Lit.
									A	T	
<i>B. dysenteriae</i> Shiga	+	+						+			Morgan <sup>68</sup> ), Partridge <sup>70</sup> )
„ (016-Prigge)	+	+						+			Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	+							Jesaitis u. Goebel <sup>64</sup> )
„ flexneri	+		+	+				+			Slein u. Schnell <sup>64</sup> )
<i>Salmonella typhi</i> O 901	+	+		+	+			+		+	Pon u. Staub <sup>71</sup> )
„	+	+		+	+			+		+	Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
„ typhi murium	+	+		+	+			+			Pon <sup>72</sup> )
„ paratyphi B	+	+		+	+			+	+		Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
„		+		+	+			+	+		Pon <sup>72</sup> )
„ enteritidis Gärtner	+	+		+	+			+		+	Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
„ abortus equi	+	+		+	+			+	+		Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
„ adelaide	+	+		+					+		Braun, Lüderitz u. Westphal <sup>73</sup> )
<i>Escherichia coli</i>	+	+		+							Niemann u. Mitarb. <sup>74</sup> )
„ NC VI	*)	+		+							
„ 055	*)	+		+							Braun, Lüderitz u. Westphal <sup>73</sup> )
„ NC I	*)				+						
„ 086	+	+	(+)	+			+	(+)			
„ 018 (Kaufmann)	+	+		+	(+)			+			Westphal u. Lüderitz <sup>61</sup> )
„ 08 (Kröger)	+	+	(+)	+		+		+			Lüderitz u. Westphal <sup>75</sup> )
„ 026	*)	+		+				+	(+)		
„ 0111	*)	+		+					+		Braun, Lüderitz u. Westphal <sup>73</sup> )

Tabelle 2. Zuckerbausteine der Polysaccharid-Komponenten einiger Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien

\*) Nicht bestimmt.

\*\*) A, T: Zucker mit gleichem papierchromatographischem Verhalten wie Abequose (A) aus *S. abortus equi*, bzw. Tyvelose (T) aus *S. typhi* O 901 (vgl.<sup>61, 76</sup>)).

<sup>68</sup>) W. T. J. Morgan, Helv. Chim. Acta 21, 469 [1938].

<sup>70</sup>) S. M. Partridge, Biochem. J. 42, 251 [1948].

<sup>71</sup>) G. Pon u. A. M. Staub, Bull. Soc. chim. biol. 34, 1132 [1952].

<sup>72</sup>) G. Pon, Thèse, Universität Paris, 1953.

<sup>73</sup>) O. H. Braun, H. Specht, O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Hygiene, im Druck.

<sup>74</sup>) M. Ikawa, J. B. Koepfl, S. G. Mudd u. C. Niemann, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5219 [1952].

<sup>75</sup>) O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7b, 548 [1952].

<sup>76</sup>) O. Westphal, O. Lüderitz, I. Fromme u. N. Joseph, diese Ztschr. 65, 555 [1953].

<sup>77</sup>) O. Westphal, ebenda 64, 314 [1952].

geht mit dem Formwechsel im allgemeinen eine Änderung der pathogenen Eigenschaften einher; die Ro-Formen sind oftmals unpathogen und werden in vivo rasch phagozytiert.

Die Lipopolysaccharide der Glattformen gramnegativer Bakterien sind eng mit dem somatischen O-Antigen verbunden. Wir haben einige Paare von O/Glatt- und o/Rauh-

<sup>78</sup>) E. Kröger, Z. Naturforsch. 8b, 133 [1953]; Zbl. Bakteriell. I. Orig. 160, 242 [1953]; Z. Immunitätsforsch. 170, 414 [1953].

Formen mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens<sup>80)</sup> aufgearbeitet und fanden, daß auch die o/Rauh-Formen vielfach bedeutende Quantitäten von Lipopolysacchariden bilden<sup>81, 78)</sup>. Bei der Bausteinanalyse ergaben sich jedoch

Bakterienspecies	Form	Zucker						
		Hexosamin	Galactose	Glucose	Mannose	Rhamnose	Abequose	Tyvelose
<i>E. coli</i> 18	O/Glatt o/Rauh	+	+	+	(+)	+		
<i>S. enteritidis</i>	O/Glatt o/Rauh	+	+	+	+	+		+
<i>S. paratyphi</i> B	O/Glatt o/Rauh	+	+	+	+	+	+	

Tabelle 3

Vergleich der Zuckerbausteine aus den Lipopolysacchariden zusammengehöriger O/Glatt- und o/Rauh-Formen einiger gramnegativer Bakterien

hinsichtlich der Zuckerbausteine bemerkenswerte Unterschiede, die für 3 Glatt-Rauh-Paare in Tabelle 3 dargestellt sind. Es zeigte sich, daß beim Übergang der O/Glatt- in die o/Rauh-Form die Synthese der papierchromatographisch rascher wandernden, also der mehr lipophilen Zucker — insbes. von Methylpentosen und Desoxymethylpentosen — unterdrückt ist. Man kann auf diese Weise O/Glatt- von o/Rauh-Formen chemisch unterscheiden<sup>81)</sup>. Vergleichbare Beobachtungen machte auch Goebel<sup>78, 85)</sup> an *Shigella sonnei* und einer rauh wachsenden Varianten.

Die Lipopolysaccharide aus o/Rauh-Formen haben vielfach endotoxische Eigenschaften. Boroff<sup>78)</sup> und neuerdings Kröger<sup>80)</sup> haben das serologische Verhalten untersucht. Digeon<sup>81)</sup> stellte elektrophoretisch einheitliche Präparate aus Rauh-Formen von *Eberthella typhosa* mittels hypertotonischer Natriumchlorid-Extraktion, anschließender Trypsin-Behandlung und alkoholischer Fraktionierung her. Die komplexen Polysaccharide sind toxisch mit einer mittleren letalen Dosis von etwa 5 mg/kg (Maus), antigen

## Quantitative Zuckerbestimmungen

Es ist in neuerer Zeit mit Hilfe verschiedener Verfahren, insbesondere auf der Basis der Untersuchungen von Dische<sup>83, 84)</sup> und unter Einbeziehung der Papierchromatographie<sup>85)</sup> möglich, einzelne Zucker aus Hydrolysaten von Polysacchariden quantitativ zu bestimmen. So sind auch Hydrolysate einiger Lipopolysaccharide und degradierter (lipoid-freier) Polysaccharide gramnegativer Bakterien quantitativ analysiert worden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über einige Ergebnisse. Die prozentualen Anteile der Zuckerbausteine sind auf das jeweilige Ausgangsmaterial bezogen und geben die Menge freier Zucker im Hydrolysat (also nicht der ursprünglichen Anhydrozucker) an. Die Zahlen sind insofern nicht direkt vergleichbar, als das jeweilig untersuchte Polysaccharid teilweise mehr oder weniger nicht-kohlenhydratische Komponenten (Lipoid A) enthält. Bemerkenswert ist der hohe Gehalt an Heptose (20%) im *Shigella sonnei*-Lipopolysaccharid und jener an Rhamnose (ca. 40%) im *Shigella flexneri*- und *E. coli* 08-Lipopolysaccharid.

## Die Lipoid-Komponente (Lipoid A)

Eine umfassende Übersicht über den derzeitigen Stand der chemischen Erforschung bakterieller Lipide im allgemeinen, einschließlich der umfangreichen Untersuchungen über Lipide aus Tuberkelbakterien, haben kürzlich J. Asselineau und E. Lederer<sup>91)</sup> veröffentlicht.

Entsprechend dem Schema in Bild 1 enthalten die genuinen Lipopolysaccharid-Symplexe gramnegativer Bakterien verschiedene Lipoid-Komponenten: neben dem schwerer abspaltbaren phosphorhaltigen Lipoid (Lipoid A) ein leicht abspaltbares Phospholipoid (Lipoid B), welches Morgan und Partridge<sup>87)</sup> aus *B. dysenteriae* Shiga isoliert und analysiert haben. Dieses äther- und benzinlösliche Lipoid ergibt bei einem Gehalt von 1,8% N und 3,9% P (N : P = 1 : 1) die gleichen analytischen Daten wie

Bakterienspecies	Bezeichnung d. Ausgangsmaterials	Zucker in %									Bestimmungsmethode	Autoren u. Lit.
		Hexosamin	Galactose	Heptose	Glucose	Mannose	Xylose	Rhamnose	Abequose	Tyvelose		
<i>Shigella sonnei</i>	Lipocarbohydrate	8	9	20							Schwefelsäure-Cystein-Rk. <sup>83, 84)</sup>	Jesaitis u. Goebel <sup>74)</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	Polysaccharide fraction 3/4	15,9		*)	25			39			" <sup>84, 87)</sup>	Slein u. Schnell <sup>84)</sup>
<i>S. typhi</i> O 901	Polyoside, dargestellt nach G. G. Freeman <sup>82)</sup>	1,7	22,5		22,5	22,5		18		~9	Phenol/Schwefelsäure-Verf. <sup>83)</sup>	Pon u. Staub <sup>71, 78)</sup>
<i>S. paratyphi</i> B	"	0	18		5	20		13			"	"
<i>S. typhi</i> murtum	"	2,2	18		5	20		13			"	"
<i>S. abortus equi</i>	Lipopolysaccharid	7,7	15,2		8,3	9,7		10,8	~8		TTC-Methode <sup>78, 86)</sup>	Lüderitz u. Westphal <sup>79)</sup>
<i>E. coli</i> 08 (Kröger)	"	5,9	2,7	<1	9,6		11,2	41,7			"	" <sup>78, 80)</sup>

Tabelle 4. Ergebnisse quantitativer Zuckerbestimmungen bei Polysacchariden gramnegativer Bakterien

\*) Nicht bestimmt.

und präzipitieren mit Anti-Rauh/Typhus-Seren. Mondolfo und Hounie<sup>88)</sup> fanden bei einigen Glatt/Rauh-Paaren von Colibakterien, daß Rauh-Formen ebenso pyrogen sein können wie Glatt-Formen. Nach eigenen Untersuchungen sind manche o/Rauh-Lipopolysaccharide starke Pyrogene. Die endotoxischen und pyrogenen Eigenschaften der gramnegativen Bakterien sind demnach nicht notwendig an das O-Antigen gebunden.

<sup>78)</sup> D. A. Boroff, J. Bacteriol. 57, 617 [1949]; D. A. Boroff u. B. P. Mary, ebenda 53, 387 [1949].

<sup>80)</sup> E. Kröger, unveröffentl.

<sup>81)</sup> M. Digeon, M. Raynaud u. A. Turpin, Ann. Inst. Pasteur 82, 206 [1952].

<sup>82)</sup> M. Mondolfo u. E. Hounie, El Dia Medico, Buenos Aires 19, 1724 [1947].

<sup>83)</sup> Z. Dische, L. B. Shettles u. M. Osnos, Arch. Biochem. 22, 169 [1949].

<sup>84)</sup> Z. Dische u. L. B. Shettles, J. biol. Chemistry 175, 595 [1948].

<sup>85)</sup> Siehe z. B. K. Wallenfels, E. Berni u. G. Limberg, diese Ztschr. 65, 581 [1953].

<sup>86)</sup> M. Ikawa u. C. Niemann, J. biol. Chemistry 180, 923 [1949].

<sup>87)</sup> D. L. Morris, Science [New York] 107, 254 [1948]; G. Holzmann, R. V. MacAllister u. C. Niemann, J. biol. Chemistry 177, 27 [1947].

<sup>88)</sup> M. Dubois, K. Gilles, J. K. H. Milton, P. A. Rebers u. F. Smith, Nature [London] 163, 167 [1951].

<sup>89)</sup> O. Lüderitz u. O. Westphal, unveröffentl.

<sup>90)</sup> I. Fromme, O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 9b [1954], im Druck.

<sup>91)</sup> J. Asselineau u. E. Lederer: Chimie des lipides bactériens, Fortschr. Chem. org. Naturst. 10, 170–273 [1953].



Phosphatide vom Kephalin-Typ. Es enthält Palmitinsäure, Ölsäure und Glycerinphosphorsäure. Der N-haltige Baustein wurde nicht identifiziert. Goebel und Mitarbeiter<sup>39)</sup> stellten das Lipoid B aus dem Vollantigen von Flexner-Ruhrbakterien dar und fanden für N 1,4 und P 2,9% (N:P = 1:1). Cmelik<sup>32)</sup> hat sich eingehend mit verschiedenen Lipoiden aus gramnegativen Bakterien befaßt. Lipoid B scheint für die biologischen Wirkungen der bakteriellen Lipopolysaccharid-Symplexe keine wesentliche Funktion zu besitzen.

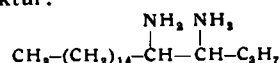
Lipoid A erhält man, wenn undegradiertes Polysaccharid mit n Mineralsäuren in der Wärme während ca. 30 min behandelt wird. Es ist in Äther und Benzin schwer löslich und nur in Chloroform und Pyridin leichtlöslich. Schon hierin unterscheidet es sich von Lipoid B und anderen Lipoiden. Miles und Pirie<sup>40)</sup> dürften als erste ein Lipoid dieses Typs aus dem O-Antigen von *Brucella melitensis* isoliert haben. Andere Autoren entdeckten entsprechende Lipoid-Komponenten. Auch wir haben die Lipoid A-Komponenten aus verschiedenen Lipopolysacchariden dargestellt. Analog zu unseren Beobachtungen<sup>33)</sup> erhielten Davies und Morgan<sup>39)</sup> neuerdings aus dem undegradierten Shiga-Polysaccharid bei der Säurespaltung ebenfalls die ätherunlösliche und chloroformlösliche Lipoid A-Komponente. In Tabelle 5 sind einige analytische Daten der so erhaltenen Lipoiden zusammengestellt.

Unverzweigte, höhere  $\beta$ -Oxyfettsäuren als Bausteine bakterieller Lipoid-Verbindungen, insbes. von Glycolipoiden, sind neuerdings gelegentlich aufgefunden worden. Z. B. isolierten Bergström und Mitarb.<sup>36)</sup> sowie Jarvins und Johnson<sup>38)</sup> aus *Pseudomonas*-Arten 1- $\beta$ -Oxyeapronsäure.

Die in wäßriger Säure bzw. in Wasser löslichen Hydrolysenprodukte wurden von Niemann<sup>34)</sup> papierchromatographisch untersucht. Die folgenden Bausteine konnten identifiziert werden:

D-Glucosamin  
Äthanolamin (Colamin)  
Phosphorsäure  
Asparaginsäure  
Neurosamin

Daneben fanden sich noch weitere, bislang nicht identifizierte, teilweise ninhydrin-positive, teilweise silber-reduzierende Stoffe. Necrosamin konnte als Hydrochlorid, Pikrat und Dithiocarbamat kristallisiert erhalten werden. Es handelt sich um ein Diamin der Formel  $C_{20}H_{41}N_2$  nachstehender Struktur:



Derartige Diamino-Derivate langkettiger aliphatischer Kohlenwasserstoffe waren bisher in der Natur nicht aufgefunden worden.

Bakterienspecies	Ausbeute an Lipoid A aus d. Lipopolysaccharid (%)	Fp	C	H	N	P	(C)-CH <sub>3</sub> <sup>33)</sup>	Hexosamin	Autoren u. Literatur
<i>Brucella melitensis</i>	20–26		60–62	9,4–10	4,3–4,6	1,4–1,6			Miles u. Pirie <sup>40)</sup>
<i>Shigella sonnei</i>	29				1,4	1,3			Jesaitis u. Goebel <sup>34)</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	~10		63,3	9,5	2,7	3,3			Tai u. Goebel <sup>41)</sup>
<i>Salmonella abortus equi</i> *)	~26	192–96 °C	62,3	9,4	1,6	2,0	3,44	17,9	Lüderitz u. Westphal <sup>38)</sup>
<i>Serratia marcescens</i> ( <i>B. prodigiosus</i> )	16				1,9	1,1			Hartwell u. Shear <sup>14)</sup>
<i>Escherichia coli</i>	~24	175–80 °C	57,3	10,1	3,3	1,6		12	Niemann et al. <sup>33)</sup>
<i>E. coli</i> 08 (Kröger)	~13	195–96 °C	61,1	9,4	1,9	2,3		17,8	Westphal, Lüderitz et al. <sup>33)</sup>

Tabelle 5. Analytische Daten für die Lipoid-A-Komponenten einiger Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien

\*) Durchschnittswerte aus 4 verschiedenen Aufarbeitungen.

## Bausteinanalyse von Lipoid A

Boivin und Mitarbeiter<sup>19)</sup> und später Shear<sup>14)</sup> haben orientierende Analysen der Lipoid-Komponenten mit den von ihnen dargestellten Lipopolysacchariden unternommen. In neuester Zeit befaßten sich besonders C. Niemann und seine Mitarbeiter<sup>33, 34)</sup> mit der Analyse des Lipoids aus einem tumor-nekrotisierenden Coli-Lipopolysaccharid.

Im allgemeinen hydrolysiert man derartige Lipoiden mit ca. 5 n Salzsäure bei 100 °C während 15 Stunden. Das so erhaltene saure Hydrolysat wird ausgeäthert. In der ätherischen Lösung befinden sich freie Fettsäuren, die wäßrige Lösung enthält hauptsächlich N-haltige Bausteine. Aus der Äther-Lösung isolierte Niemann<sup>33)</sup> folgende Fettsäuren:

Laurinsäure  
Myristinsäure  
Palmitinsäure und  
n-(—)- $\beta$ -Oxymyristinsäure (Fp 73–74°).

In eigenen Versuchen, gemeinsam mit G. Werner<sup>37)</sup> haben wir uns in letzter Zeit mit den N-haltigen Bausteinen der Lipoid A-Komponenten aus *E. coli* (Kröger) und *S. abortus equi* (vgl. Tabelle 5) befaßt. Der N-Gehalt dieser Lipoiden ist überwiegend durch Hexosamin gegeben (~75% beim Coli-, ~90% beim *Abortus equi*-Lipoid). Papierchromatographisch und mit Hilfe der Papierelektrophorese bei hohen Spannungen<sup>33)</sup> konnten wir zeigen, daß in Bezug auf ninhydrin-positive Bestandteile die Lipoiden der genannten Bakterienstämme nahezu gleiche qualitative Zusammensetzung aufweisen. Auch das quantitative Verhältnis einzelner Bausteine zueinander stimmt weitgehend überein. Bild 2 zeigt schematisch ein Hochspannungspapierelektropherogramm der beiden Lipoid-Hydrolysate.

Der vorherrschende Baustein ist Hexosamin (g). Daneben treten noch drei weitere Substanzen in geringerer Menge hervor (a, b, c). Von diesen wurde (b) als Asparaginsäure und (c) als Glutaminsäure identifiziert.

Trägt man die Hydrolysate in wesentlich höherer Konzentration auf, so werden weitere ninhydrin-positive Komponenten

<sup>32)</sup> S. Cmelik, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 289, 78; 290, 146 [1952]; 293, 222 [1953]; Biochem. Z. 322, 456 [1952].

<sup>33)</sup> M. Ikawa, J. B. Koepfli, S. G. Mudd u. C. Niemann, J. Amer. chem. Soc. 75, 1035 [1953].

<sup>34)</sup> M. Ikawa, J. B. Koepfli, S. G. Mudd u. C. Niemann, ebenda 75, 3439 [1953].

<sup>35)</sup> S. Bergström, H. Theorell u. H. Davide, Arch. Biochem. 10, 165 [1946]; Ark. Kem. Mineral. Biol. 23 A, No. 13 [1946].

<sup>36)</sup> F. G. Jarvis u. M. J. Johnson, J. Amer. chem. Soc. 71, 4124 [1949].

<sup>37)</sup> G. Werner, unveröffentl.

<sup>38)</sup> Vgl. B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7b, 655 [1952]. – G. Werner hat die Methode verbessert und erweitert, worüber demnächst berichtet wird.



sichtbar. Unter diesen identifizierten wir Colamin (m). Eine sehr rasch wandernde, stark basische Komponente (n), die wir auch nach dem von Niemann<sup>94</sup>) angegebenen Verfahren zur Isolierung von Necrosamin in sehr kleinen Mengen erhielten, könnte mit diesem identisch sein. Die übrigen ninhydrin-positiven Substanzen (d-f, h-l), welche in den von uns dargestellten Lipoiden jedenfalls nur in Spuren vorhanden sind, wurden bisher nicht identifiziert. Es ist möglich, daß es sich bei diesen Substanzen um sehr kleine Mengen nichtabgespaltener Reste der ursprünglich zugehörigen Proteinkomponente handeln könnte.

Ferner identifizierten wir in beiden genannten Lipoiden Glycerin und Phosphorsäure.

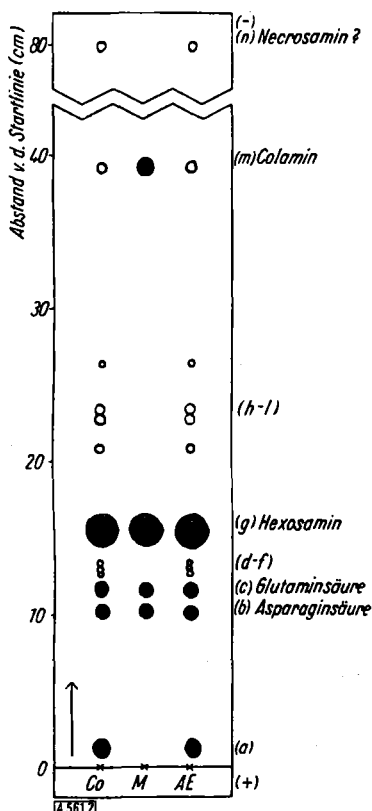
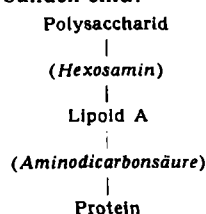


Bild 2  
Hochspannungs-Papierelektropherogramm (schematisch) von Hydrolysaten der Lipoid-A-Komponenten aus *E. coli* (Co) und *S. abortus equi* (AE). M – Mischung authentischer Proben.  $p_H$  1,9; 65 Volt/cm (Streifenlänge 90 cm); 1,1 mAmp/cm (Streifenbreite 12 cm); Laufzeit 80 min. Anfärbung mit Ninhydrin

Bei diesen und ähnlichen analytischen Untersuchungen bewährt sich die gleichzeitige Anwendung papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Methoden, besonders bei Variation der chromatographischen Lösungsmittel, des  $p_H$  der Puffer bei der Elektrophorese und der färbereischen Methoden. Auf diese Weise sind viele Substanzen praktisch eindeutig identifizierbar.

Bemerkenswert ist, daß neben Hexosamin in den bisher untersuchten Lipoiden jeweils wenigstens eine Aminodicarbonsäure angetroffen wird. Man kann daher vermuten (vgl. auch<sup>94</sup>), daß im genuinen Lipopolysaccharid-Protein-Symplex Hexosamin die Bindung zum Polysaccharid und die Aminodicarbonsäure die Bindung zum Protein herstellt, so daß diese Komponenten im Symplex über das Lipoid miteinander verbunden sind:



Bei der Darstellung der Lipopolysaccharide, sei es unmittelbar aus den Bakterien oder durch Spaltung von Lipopolysaccharid-Protein-Symplexen, bleiben je nach Art des Verfahrens kleinere oder größere Anteile der Proteinkomponente am Lipoid gebunden. Bei der sauren Spaltung der Lipopolysaccharide erscheinen sie in der Lipoid-Komponente. Der unterschiedliche N-Gehalt einzelner Lipoid A-Präparate (s. Tabelle 5) dürfte sich vorwiegend dadurch erklären. Die mit Phenol/Wasser (Verfahren B<sup>90</sup>)) dargestellten Lipopolysaccharide enthalten nurmehr Spuren von Aminosäuren.

### Stufenweise Hydrolyse der Lipopolysaccharide

Durch partielle Hydrolyse der Lipopolysaccharide ist es möglich, eine Vorstufe von Lipoid A („Lipoid“ A<sub>1</sub>) zu fassen.

Erwärmt man Lipopolysaccharide in verd. Mineralsäuren, so klären sich die anfänglich opaleszierenden Lösungen innerhalb weniger Minuten auf, um anschließend sukzessive

wieder opaleszenter und schließlich trüb zu werden; es fällt dann das freigesetzte Lipoid A aus (vgl.<sup>40</sup>)). Stoppt man die Hydrolyse zum Zeitpunkt der maximalen Aufklärung der Lösung, so fällt bei anschließender Neutralisation Lipoid A<sub>1</sub> aus. Das Material ist im Gegensatz zu Lipoid A in Chloroform unlöslich, aber löslich in Pyridin. In dem Lipopolysaccharid von *S. abortus equi* ist Lipoid A<sub>1</sub> (N 1,4%; P 3,2%) zu ~45% enthalten. Lipoid A<sub>1</sub> enthält Hexosamin (9,3%) und Galaktose. Die übrigen Zuckerbausteine des Lipopolysaccharids sind abwesend. Bei weiterer Hydrolyse des isolierten Lipoids A<sub>1</sub> erhält man das in Säure unlösliche Lipoid A, wobei Galaktose und N-haltiges Material frei werden. Lipoid A, das aus dem Lipopolysaccharid in ~26% Ausbeute anfällt, enthält 17,9% Hexosamin, woraus hervorgeht, daß beim Übergang von Lipoid A<sub>1</sub> in Lipoid A das gesamte Hexosamin am Lipoid gebunden bleibt. Das Lipopolysaccharid aus *S. abortus equi*, ebenso wie aus *Coli*, enthält also Hexosamin in zwei verschiedenen Bindungsarten: zum einen Teil (rund 50%) polysaccharidisch, zum anderen unmittelbar am Lipoid verankert.

Analysiert man das zeitliche Auftreten einzelner Zuckerbausteine während der Hydrolyse von Lipopolysacchariden, so ergibt sich, daß die verschiedenen Zucker mit ungleicher Geschwindigkeit in Freiheit gesetzt werden. Pon und Staub<sup>71, 72</sup>) untersuchten die Hydrolyse des Polysaccharids aus *S. typhi* 0901, wir verfolgten diejenige der Lipopolysaccharide aus *S. abortus equi* und *E. coli* (Kröger). Bei *S. typhi* und *S. abortus equi* wird weit vor den übrigen Zuckern die Desoxymethylpentose (Tyvelose bzw. Abequose), bei *E. coli* 08 Xylose frei. Jeder der weiteren Zuckerbausteine weist eine individuelle Zeitkurve auf. Das in Bild 3 dargestellte Chromatogramm gibt die Verhältnisse bei der Hydrolyse des Lipopolysaccharids aus *S. abortus equi* wieder. (Wegen der Säureempfindlichkeit von Abequose nimmt deren Menge nach maximaler Freisetzung im weiteren Verlauf der Hydrolyse langsam ab.) Nach Pon und Staub<sup>71, 72</sup>) verläuft die Hydrolyse bei *S. typhi* entsprechend.

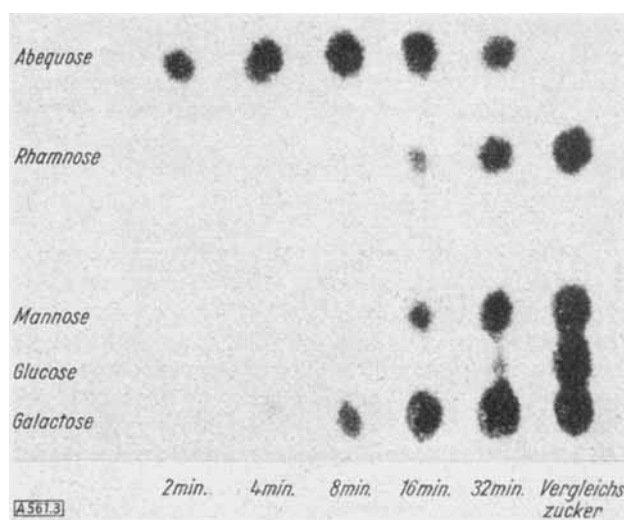


Bild 3

Papierchromatographische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse des pyrogenen Lipopolysaccharids aus *S. abortus equi* in  $nH_2SO_4$  bei 100 °C (Lösungsmittel: Pyridin/Butanol/Wasser).

Bei der Hydrolyse mit 1 n Mineralsäuren während 2 bis 4 min (100 °C) werden demnach bei den bislang untersuchten Lipopolysacchariden drei Bestandteile voneinander getrennt: 1.) Lipoid A<sub>1</sub>, 2.) jeweils ein charakteristisches Monosaccharid (Tyvelose, Abequose, Xylose usw.) und 3.) degradiertes Polysaccharid, welchem jeweils der zuerst frei werdende Monosaccharid-Baustein fehlt. Bild 4 (s. S. 416) gibt die Verhältnisse für *S. abortus equi* wieder.

Die Isolierung und Analyse derartiger partieller Hydrolysenprodukte ist geeignet, weiteren Aufschluß über den Aufbau der komplexen Lipopolysaccharide zu erbringen.

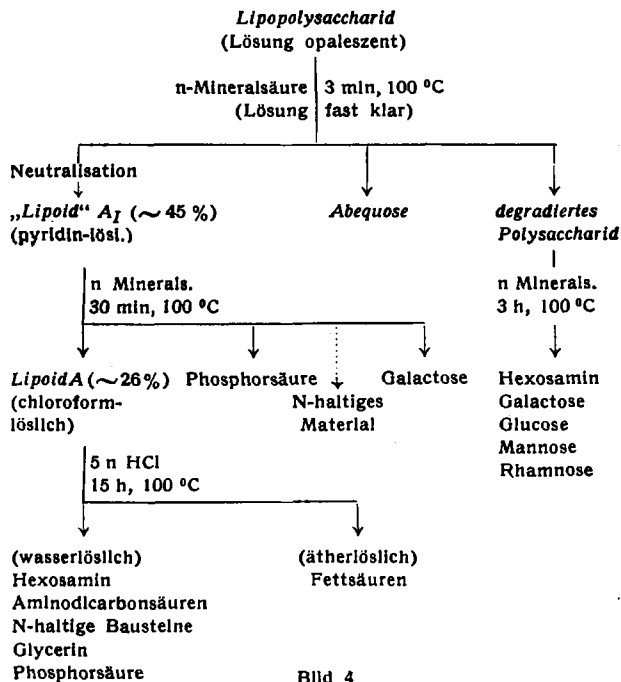


Bild 4  
Stufenweise Hydrolyse, dargestellt am Beispiel  
des Lipopolysaccharids aus *S. abortus equi*

### Künstliche Symplexe und Funktion von Lipoid A

Morgan<sup>38, 39</sup>) hat entdeckt, daß Lipopolysaccharide (undegraded polysaccharide) und konjugierte Proteine aus den antigenen Symplexen gramnegativer Bakterien (Ruhr- und Typhusbakterien) zu künstlichen Symplexen vereinigt werden können. Er fand ferner, daß auch andere Polysaccharide, wie schonend dargestellte Mucine, Agar-Agar, Blutgruppensubstanzen u. a. sich mit den konjugierten Proteinen aus Ruhr- und Typhusbakterien zu künstlichen Symplexen vereinigen, welche für Kaninchen starke Antigene sind. Andererseits lassen sich Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien auch mit verschiedenen anderen Proteinen kuppeln wie z. B. Vitellin, Stromatin oder Serumglobulinen. Wir können diesen Befund für die nach dem Phenol/Wasser-Verfahren<sup>30</sup>) dargestellten Lipopolysaccharide bestätigen. Kupplungen scheinen nur dann einzutreten, wenn wenigstens einer der Partner Lipoid nach Art des Lipoid A enthält.

Bei der Suche nach der toxischen Komponente in den Lipopolysaccharid-Protein-Symplexen von Flexner-Ruhrbakterien fand Goebel<sup>39, 41</sup>), daß Spaltung in saurem Medium zu untoxischem, degradiertem Polysaccharid und toxischem Protein führte, während alkalische Spaltung undegradiertes, toxisches Polysaccharid und untoxisches Protein ergab. Er schloß daraus, daß eine „toxische Komponente“ existieren müsse, welche im einen Fall am Protein, im andern Fall am Polysaccharid verankert bleibt.

Wir haben versucht, ob das Prinzip von Goebel<sup>39</sup>) auch bei künstlichen Lipopolysaccharid-Protein-Symplexen anwendbar ist. So wurde z. B. das Lipopolysaccharid aus *S. abortus equi* zunächst entsprechend der Methode von Morgan<sup>38, 39</sup>) an Casein gekuppelt. Der künstliche Symplex wurde anschließend mit 1proz. Essigsäure gespalten, wobei in saurem Medium schwerlösliches „Lipocasein“ erhalten wurde. In der klaren Lösung fand sich Poly-

saccharid neben teilweise freier Abequose. Das so erhaltene Lipocasein ist in alkalischem und neutralem Medium gut löslich. Gemeinsam mit Kelderling und Eichenberger<sup>100</sup>) fanden wir, daß das künstliche Lipocasein für Kaninchen stark toxisch und pyrogen ist.

Es gelingt also, die Lipoidkomponente vom bakteriellen Polysaccharid-Träger auf ein inertes Protein zu übertragen, wobei stark toxische und pyrogene Eigenschaften auf das betreffende Protein übergehen. Die immunologischen Eigenschaften solcher künstlichen Lipoproteide werden z. Zt. von Hurni<sup>42</sup>) untersucht.

Die bei den Umkupplungen wesentliche Komponente, das (jeweilige) Lipoid A (bzw. seine Vorstufe A<sub>1</sub>), ist in freier Form biologisch wenig aktiv, offenbar hauptsächlich wegen der Schwerlöslichkeit in Wasser. Die Injektion von Suspensionen des isolierten Lipoids A (aus *Coli*- oder *Abortus equi*-Bakterien) führt nur bei höheren Dosen zu merklichen Reizwirkungen (z. B. Fieber, Verschiebungen im weißen Blutbild usw.). Die Schwellendosis bei intravenöser Injektion liegt für Kaninchen bei ~100 µg/kg und höher. Verteilt man Lipoid A feiner mit Hilfe von Lösungsvermittlern wie „Tween“, so steigt die Wirksamkeit um das mehr als 10fache. Bei der Kupplung an höhermolekulare Träger findet dagegen eine Wirkungssteigerung auf das mehr als 1000fache statt. Die von der Lipoid-A-Komponente ausgehenden biologischen Wirkungen, wie besonders die Toxizität, kommen also offenbar dadurch zustande, daß das in Wasser unlösliche Phospholipid durch Verbindung mit höhermolekularen Trägern molekular-disperse wäßrige Lösungen bilden kann und dadurch optimal wirksam wird. Die nähere Erforschung der wesentlichen Bausteine und der Konstitution des Lipoids A dürfte weitere Einblicke in das Zustandekommen der außerordentlichen Wirksamkeit der Lipopolysaccharide als Reizstoffe für das höhere Tier ermöglichen.

Inwieweit der lyophile Träger eine Rolle bei den biologischen Wirkungen des Lipoids A spielt, ist noch nicht näher erforscht. Bezüglich der Pyrogenität gibt es mehrere Befunde, welche die Annahme einer besonderen Funktion des Lipoids A als „pyrogener Komponente“ nahelegen, wie z. B. die Erhaltung der fieberrzeugenden Wirksamkeit bei Lipopolysacchariden, deren Polysaccharid-Komponente durch Wasserstoffsuperoxyd<sup>32, 101</sup>) partiell abgebaut oder durch Perjodat<sup>39, 102</sup>) partiell oxidiert wurde. Andererseits haben neuerdings Davies und Morgan<sup>33</sup>) aus Ruhrbakterien mittels Diäthylenglycol-Extraktion neben dem O-antigenen Lipopolysaccharid-Protein-Symplex ein phosphor-freies, stark pyrogenes, weitgehend untoxisches (undegradiertes) Polysaccharid isoliert, dessen Säurehydrolyse kein chloroform-lösliches Lipoid ergab, weshalb sie die ausschließliche Zuordnung der Pyrogenität zur Lipoid-A-Komponente noch als problematisch ansehen. Über die Bausteine dieses interessanten Polysaccharids ist noch nichts bekannt. Robinson und Flusser<sup>103</sup>) haben völlig Stickstoff-freie Polysaccharide aus verschiedenen gramnegativen Bakterien dargestellt, welche allerdings ~100mal schwächer pyrogen wirkten als die undegradierten Lipopolysaccharide aus den gleichen Bakterien. Die Frage der chemischen Voraussetzungen für maximale Pyrogenität ist somit noch nicht endgültig geklärt.

Es erscheint sicher, daß die Toxizität der Endotoxine gramnegativer Bakterien an das Vorhandensein der Lipoid-A-Komponente in den genuinen Symplexen gebunden ist.

Viele Bakterien-Lipopolysaccharide zeigen relativ hohe Affinität zur Oberfläche von Erythrocyten und Leuko-cyten und wahrscheinlich weiteren Zellsystemen des höheren Tiers<sup>12</sup>). Mit Lipopolysacchariden „sensibilisierte“ Erythrocyten werden gegenüber dem homologen bakteriellen Antiserum agglutinabel, weshalb derartige Hämagglutinationen in neuerer Zeit als empfindliche serologische

<sup>100</sup>) Unveröffentlicht.

<sup>101</sup>) O. Westphal, O. Lüderitz u. W. Kelderling, Zbl. Bakteriol. I. Orig. 153, 152 [1952].

<sup>102</sup>) Vgl. W. F. Goebel, J. exp. Medicine 85, 449 [1947].

<sup>103</sup>) E. S. Robinson u. B. A. Flusser, J. biol. Chemistry 153, 529 [1944].

<sup>39</sup>) W. T. J. Morgan, Brit. J. exp. Pathol. 24, 41 [1943]; W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, ebenda 25, 221 [1944].

Teste ausgearbeitet wurden<sup>104</sup>). Die Affinität der Lipopolysaccharide zu Zellmembranen dürfte in engem Zusammenhang mit ihrer Neigung zur Symplexbildung stehen. Es scheint, daß auch beim Zustandekommen der Reizwirkungen von bakteriellen Lipopolysaccharid-Pyrogenen der Bakterien-Reizstoff an der Membran affiner Zellen oder Zellsysteme angreift<sup>12</sup>). Die so gereizten Zellen reagieren mit der Auslösung charakteristischer endogener Mechanismen, durch welche — zum Teil — die vielfältigen eigentlichen Reizwirkungen am höheren Organismus zustande kommen dürften<sup>66, 105</sup>).

### Ergebnisse

Gramnegative Bakterien bilden Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Symplexe als Bestandteile ihrer Zellsubstanz. Es hat sich gezeigt, daß verschiedene Arbeitskreise bei der Erforschung bakterieller Lipopolysaccharid-Symplexe aus verschiedenen Keimen zu sehr ähnlichen prinzipiellen Ergebnissen gelangten. Die chemische Analyse ergibt, daß alle zugrundeliegenden Lipopolysaccharide nach dem gleichen Bauplan aufgebaut sind: an eine phosphorylierte Polysaccharid-Komponente ist eine Phospholipoid-Komponente (Lipoid A) gebunden.

Die Polysaccharid-Komponenten enthalten gewisse charakteristische Zuckerbausteine, unter ihnen bevorzugt Hexosamin (Glucosamin) und Hexosen und häufig Methylpentosen (Rhamnose), daneben gelegentlich Desoxymethylpentosen (Tyvelose, Abequose). Uronsäuren sind nicht gefunden worden.

Es bestehen demnach wesentliche chemische Unterschiede zwischen diesen Polysacchariden und ihrer Bindung an die Zellbestandteile (Lipide, Proteine) einerseits und den Polysacchariden der grampositiven Bakterien andererseits, die vielfach Uronsäuren enthalten und in der Bakterienzelle keine festere Bindung an Lipide eingehen; auch fehlen ihnen die mehr „lipophilen“ Methylpentosen und Desoxyzucker, und sie sind nicht phosphoryliert.

Die Erforschung des chemischen Aufbaus der Lipoid-Komponenten steht erst in den Anfängen. Bislang scheint es, daß auch hier gewisse übereinstimmende Bauprinzipien

<sup>104</sup>) E. Neter u. Mitarb., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 255 [1952]; 80, 607 [1952]; 82, 215 [1953]; J. exp. Medicine 96, 1 [1952]; J. Immunology 71, 145 [1953]; S. V. Boyden u. Mitarb., Nature [London] 171, 402 [1953]; J. Immunology 68, 577 [1952].

<sup>105</sup>) Vgl. z. B. O. Westphal, O. Lüderitz, B. Kieckhöfen, E. Eichenberger u. W. Keiderling, Rev. Canad. Biol. 12, 289 [1953].

herrschen. Es ist möglich, daß verschiedene Bakterienarten das gleiche Phospholipoid oder jedenfalls sehr ähnliche Lipide bilden. Charakteristisch ist ein höherer Gehalt an relativ fest gebundenem Hexosamin. Die Bedeutung der übrigen N-haltigen Bausteine muß noch weiter untersucht werden, u. a. auch hinsichtlich der Frage inwieweit sie integrierende Bestandteile der Lipoid-Komponente sind.

Im Laufe der Untersuchungen wurden aus einigen Lipopolysacchariden neue, bisher unbekannte Bausteine isoliert, wie Desoxy-methylpentosen, langkettige  $\beta$ -Oxyfettsäuren und Necrosamin.

Die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien sind vor allem wegen einer Reihe charakteristischer biologischer Eigenschaften isoliert und untersucht worden. Man hat sich bemüht, einzelne biologische Funktionen, wie die Antigenität und Immunspezifität, Toxizität, Pyrogenität u. a. auf die Wirkung bestimmter Teilkomponenten zurückzuführen, wie etwa die Toxizität auf die Wirkung der Lipoidkomponente oder die immunologische Spezifität auf jene von polysaccharidischen Gruppen. In ähnlicher Weise sucht man die Lipopolysaccharide hinsichtlich der außerordentlichen fiebererzeugenden und anderen Reizwirkungen am höheren Tier oder ihrer tumornekrotisierenden Eigenschaften zu erforschen. Die gleiche Tendenz verfolgen auch die wichtigen Untersuchungen über die Wirksamkeit einzelner Lipopolysaccharide und ihrer Teilkomponenten als Phagenrezeptoren (vgl. z. B.<sup>34, 35, 106</sup>).

Bei der Fortführung dieser Untersuchungen wird man sehr wahrscheinlich weitere Wirkungen chemisch differenzieren können. Derartige Bemühungen setzen die genaue Kenntnis des chemischen Aufbaus der Wirkstoffe und ihrer Komponenten voraus. Chemiker und Physikochemiker sollten dem Biologen und Mediziner möglichst hochgereinigte und chemisch definierte Stoffe zur Verfügung stellen. Dann wird man auch die vielfach sehr komplexe biologische Wirkungsweise der Lipopolysaccharide näher erforschen und im einzelnen besser verstehen können.

Eingeg. am 12. März 1954 [A 561]

<sup>106</sup>) E. M. Miller u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine 90, 255 [1949]; W. F. Goebel, ebenda 92, 527 [1950]; M. A. Jesaitis u. W. F. Goebel, Nature [London] 172, 622 [1953]; W. F. Goebel u. M. A. Jesaitis, Ann. Inst. Pasteur 84, 66 [1953].

## Erkenntnisse über Häm-Agglutination und Genetik des Grippe-Virus

Von Prof. SIR MACFARLANE BURNET, M.D., Ph.D., F.R.S., F.R.C.P., Melbourne<sup>1)</sup>

Das Grippe-Virus wirkt als Amidase. Kommt es mit Rezeptoren einer Zelloberfläche in Berührung, so bilden sich Verbindungsstränge, die durch Enzymwirkung wieder abgebaut werden, jedoch sich an anderen Stellen wieder neu bilden. Der Abbau der Rezeptoren vermindert z. B. die elektrophoretische Beweglichkeit der menschlichen roten Blutkörperchen. Die Befähigung des Grippe-Virus zur „Rekombination“ ermöglicht genetische Untersuchungen. Es wird vermutet, daß die Virulenz durch Anhäufung vieler genetischer Einheiten entsteht.

### Einleitung

Zuerst möchte ich der Männer gedenken, die an dem heutigen Tage geehrt werden. v. Behring und Ehrlich bewiesen zum erstenmal die praktische therapeutische Bedeutung der Grundsätze und Hypothesen, zu denen in ihrer Zeit die Forschungsarbeiten über Infektionskrankheiten im Laboratorium führten. v. Behring verfolgte das Ziel, die Erkenntnisse des Laboratoriums für die Klinik zu

<sup>1)</sup> Vortrag anlässlich der Verleihung des Behring-Preises am 15. März 1954 in Marburg-Lahn.

verwerten und entwickelte die handelsmäßige Herstellung biologischer Heilmittel — ein wichtiges Bindeglied zwischen der Entdeckung im Laboratorium und ihrer Anwendung zum Wohle der Menschheit. Ehrlich aber gebührt das Verdienst, die Grundlage geschaffen zu haben für alle späteren schöpferischen Arbeiten auf den Gebieten der ineinander verwobenen Wissenschaften, nämlich der Mikrobiologie, der Immunologie und der Chemotherapie. Es gibt wohl kaum eine Phase der medizinischen Forschung, die sich nicht weitgehend auf das eine oder andere Ergebnis von