

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>105</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, 106</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 Desoxy-methylpentosen (Tyvelose, Abequose). Uronsäuren sind nicht gefunden worden.

Es bestehen demnach wesentliche chemische Unterschiede zwischen diesen Polysacchariden und ihrer Bindung an die Zellbestandteile (Lipoide, Proteine) einerseits und den Polysacchariden der grampositiven Bakterien andererseits, die vielfach Uronsäuren enthalten und in der Bakterienzelle keine festere Bindung an Lipoide 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 Lipoide 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

*Ehrlichs* Forschungen stützt, ausgehend von seinen frühen Arbeiten über die Gewebefärbung bis zu seinen Arbeiten über die Chemotherapie der Syphilis.

Ich komme aus einem Lande, dessen Kultur und Wissenschaft noch sehr jung sind. Ich glaube nicht, daß v. *Behring* oder *Ehrlich* in ihrem Leben jemals an Australien dachten, ausgenommen, daß sie es als etwas sehr fern liegendes und — vielleicht abgesehen von seiner primitiven Tierwelt — als etwas sehr unwichtiges betrachteten. Aber unsere Entwicklung hat denselben Weg genommen wie die von Canada und den Vereinigten Staaten, und die angewandte Wissenschaft gewinnt in unserer Wirtschaft und in unserem täglichen Leben mehr und mehr an Bedeutung. Die Zahl der Beiträge Australiens zu richtungsgebenden Fortschritten in der Wissenschaft ist noch gering, aber, wie ich glaube, von Bedeutung.

Ich möchte kurz über die Arbeiten auf dem Virusgebiet in dem Walter und Eliza Hall Institut in Melbourne berichten.

### Zur Amidase-Wirkung des Grippe-Virus

Während des Krieges war unsere wichtigste Arbeit die Erforschung der Immunisierungsmöglichkeiten gegen Grippe, aus Furcht, daß sich die Erfahrungen von 1918–19 wiederholen könnten. Während dieser Zeit wurde hauptsächlich in meinem Laboratorium die Züchtung des Grippevirus auf dem Hühnerembryo ausgearbeitet, während *Hirst* in New York die Fähigkeit des Virus, Hühnererythrozyten zu agglutinieren, entdeckte. Es trat keine Grippeepidemie während oder sofort nach dem Krieg auf, und wir entschlossen uns, die gewonnenen Erfahrungen für eine systematische Erforschung der Probleme der Hämagglutination zu verwenden.

Bis 1941 glaubten wir, daß das Virus nur auf empfindliche Zellen wirkt und daß sein Vorhandensein nur an den Schädigungen oder Veränderungen erkannt werden kann, die durch seine Vermehrung in den Zellen der empfindlichen Gewebe entstehen. *Hirsts* Entdeckung erschien unglaublich, doch konnte sie mit Leichtigkeit durch eine 5 min dauernde Arbeit bestätigt werden. *Hirst* zeigte, daß die Agglutination eine Funktion der Virusteilchen selbst ist; die Virusteilchen haften fest an der Oberfläche der Zellen, und wenn ein Teilchen an zwei Zellen zugleich haftet, wirkt es als Brücke, indem es die Verbindung zwischen ihnen herstellt und dazu beiträgt, die Zusammenballungen zu bilden, die wir in einer agglutinierten Aufschwemmung sehen. *Hirst* zeigte auch eine weitere grundlegende Eigenschaft der Reaktion auf, indem er bewies, daß das Virus nach einiger Zeit aus den Zellen wieder frei werden kann und daß letztere für neues Virus dann inagglutinabel sind. Das freigewordene Virus jedoch behält seine volle Fähigkeit, die Zellen zu agglutinieren und unter Abbau der Zellrezeptoren sie wieder zu verlassen. Es war *Hirst* klar, daß das Virus als Enzym wirkt, und unsere erste Aufgabe bestand darin, die Natur der Virusedzyme zu erforschen.

Nach 7 Jahre langer Arbeit kann ich heute sagen, daß im letzten Jahr mein Kollege Dr. *Gottschalk* die Untersuchungen zu einem vorläufigen Ende geführt hat, indem er zeigte, daß das Virusedzym als Amidase wirkt, indem es die CO-NH-Bindung löst zwischen 2-Carboxypyrrrol und Hexosamin, zwei Verbindungen, die als ein Teil von 200 oder mehr prosthetischen Gruppen einer jeden Makromolekel bestimmter Mucoproteine vorhanden sind. Es ist hier nicht der Ort, technische Einzelheiten zu beschreiben, und ich werde nichts über den Arbeitsgang sagen, der zu diesen Schlußfolgerungen führte.

Durch chemische, physikalische und biologische Methoden konnten wir uns ein Bild der Zelloberfläche machen — in erster Linie der der Erythrocyten — in ihrer Beziehung zu dem an ihr haftenden Virus. Über der Oberfläche der Zellmembran müssen wir uns ein loses Netzwerk von fadenförmigen Makromolekeln aus Mucoprotein denken, von denen einige teilweise beweglich sind und in die umgebende Flüssigkeit ragen. Auf der Oberfläche der Virusteilchen sind viele enzymatisch wirksame Gruppen, von denen jede sich mit den Zellrezeptoren, die auf der ganzen Oberfläche der Mucoprotein-Makromolekeln zerstreut liegen, verbinden und sie unter bestimmten Bedingungen abbauen kann. Sobald das Virusteilchen mit der Zelloberfläche in Berührung kommt, bilden sich Verbindungsstränge, die es an der Zelle festhalten. Aber da sowohl Zelle wie Virusteilchen sich in bestimmter Weise gegenseitig beeinflussen, wird der entsprechende Verbindungsstrang durch Enzymwirkung zerstört und ein neuer kann an anderer Stelle entstehen. Wir können das Virusteilchen fast als ein Schaf darstellen, das auf den Rezeptoren der Zelloberfläche weidet, bis die Konzentration der Substratgruppe zu gering ist, um den physikalischen Kontakt zwischen Virus und Zelle aufrecht erhalten zu können.

Eine der Folgerungen aus der enzymatischen Wirkung, wie sie *Gottschalk* zeigte, ist, daß bei jeder Spaltung eines Rezeptors eine Amino-Gruppe frei und positive elektrische Ladung der Zelle zugeführt wird, was praktisch eine Verminderung der negativen Ladung bedeutet. Dies wurde klar von *Ada* und *Stone* bewiesen. Sie fanden, daß Virus oder ähnliche Enzyme durch Abbau der Rezeptoren die elektrophoretische Beweglichkeit der menschlichen roten Blutkörperchen hemmen können. Normalerweise beträgt diese 1.3 bis ca. 1.7 u/sec./Volt/cm.

Diese Oberflächenreaktionen sind von gleicher Bedeutung, wenn wir unsere Aufmerksamkeit von den roten Blutkörperchen auf die für das Grippevirus empfindlichen Zellen richten. Im Laboratorium verwenden wir meist die Zellen, die die Allantoishöhle (Allantois = Harnsack) des Hühnerembryos auskleiden oder das respiratorische Epithel der Mäuselunge. Es kann gezeigt werden, daß das Virus an diese Zellen adsorbiert wird, und durch Verwendung eines löslichen Enzyms aus Cholera vibriolen, das dieselben Substrate angreift wie das Grippevirusenzym, konnten wir dartun, daß die Adsorption an dieselbe Art von Rezeptoren stattfindet wie sie in den roten Blutkörperchen vorhanden sind. Einer der elegantesten Versuche in der medizinischen Mikrobiologie war die Beweisführung *Stones*, daß Vorbehandlung mit diesem Choleraenzym — in gewissen Grenzen — Mäuse oder Hühnerembryonen vor der Infektion mit Grippevirus schützt. Die Schutzwirkung war jedoch nur vorübergehend, denn da neues Mucoprotein zur Zelloberfläche gelangt, werden die abgebauten Rezeptoren in ein oder zwei Tagen wieder ersetzt. Wenn aber die Verbindung zwischen Virus und Rezeptor nicht gelingt, kommt es nicht zur Infektion.

Neuere Arbeiten zeigen außerdem, daß die Enzymwirkung des Virus für die Befreiung des neu entstandenen Virus aus der Zelloberfläche, wo es gebildet wurde, von großer Bedeutung ist.

### Über die Genetik des Grippe-Virus

All diese Arbeiten befaßten sich nur mit dem Virus auf der Zelloberfläche. Die Vorgänge, die sich abspielen, wenn das Virus sich in der Zellsubstanz vermehrt, wurden dadurch nicht berührt. Im Jahre 1949 erschloß ein Zufallsergebnis bei Versuchen, in denen wir feststellen wollten, ob unser Choleraenzym einen Einfluß auf das Interferenz-

phänomen hat, uns die Möglichkeit, uns eingehender mit der Genetik des Grippevirus zu befassen. Seitdem war die Erforschung der in der Virusforschung anzuwendenden genetischen Methoden das wichtigste Forschungsgebiet meines Laboratoriums.

Die ersten Versuche behandelten die Frage: was geschieht, wenn ein neurotropes (das Nervensystem beeinflussendes) Grippevirus von dem serologischen Typ W.S. zusammen mit einem nicht neurotrophen Stamm von anderem serologischen Typ in das Mäusegehirn geimpft wird? Wenn die Menge des nicht-neurotrophen Virus sehr viel größer war als die des neurotrophen, kam es nicht zur Erkrankung — ein typisches Interferenzphänomen. Aber wenn es zu verzögerter Erkrankung kam, konnte man oft aus dem Mäusegehirn einen neuen Virustyp isolieren, der bei weiteren Passagen unverändert blieb und in dem sich der serologische Typ des nicht neurotrophen Stammes mit der charakteristischen Fähigkeit des anderen Stammes — nämlich Encephalitis zu erzeugen — verband. Das Vorhandensein solcher rekombinierter Stämme war nicht überraschend im Hinblick auf das wohlbekannte Phänomen der „Rekombination“ von Bakteriophagen. Die Übertragung der Neuropathogenität von einem serologischen Virustyp auf einen anderen ist wahrscheinlich das überzeugendste Beispiel für die Rekombination von Grippevirustypen, aber es gibt noch viele andere Charakteristika, die man für dieses Verfahren benutzen kann. Genetische Forschung befaßt sich ausschließlich mit den Unterschieden zwischen den zu untersuchenden Organismen, und einer der größten Vorteile, die das Grippevirus bietet, ist die Leichtigkeit, mit welcher vererbare Unterschiede gefunden oder entwickelt werden können. Ein großer Teil unserer Arbeiten wurde mit zwei Grippe-A-Virusstämmen ausgeführt, die sich in sieben gut ausgeprägten Charakteristiken unterschieden. Vier dieser Eigenschaften können völlig durch in vitro-Versuche erforscht werden, während die übrigen drei verschiedene Grade der Virulenz für den Hühnerembryo, die Mäuselunge und das Mäusegehirn darstellen.

Alle Rekombinationsversuche gründen sich auf die Hypothese, daß genetisches Zusammenwirken nur dann stattfindet, wenn die Virusteilchen der verschiedenen Typen fast gleichzeitig in die Zelle gelangen. Analog zu den Bakteriophagen ist der aussichtsreichste Weg, die Rekombination zu studieren, die Analyse der aus der primär mit den beiden „Elterntypen“ infizierten Zelle hervorgehenden Abkömmlinge.

Die am meisten befriedigende Methode, die wir zu diesem Zweck entwickelt haben, ist das sog. desembryonierte Hühnerei. Dies ist eine wahrhaft einfache Methode der Gewebekultur, bei der die Zellen, die das Wachstum des Virus ermöglichen, unter denselben Bedingungen stehen wie beim intakten Hühnerembryo. Wenn sie mit einer geeigneten Flüssigkeit, die 0,1 % Glucose enthält, gewaschen werden, ist die Ausbeute an Virus im wesentlichen die gleiche wie beim Embryo. Ihr großer Vorteil liegt in der Leichtigkeit, mit der die Flüssigkeit je nach Bedarf entfernt oder gewechselt werden kann. Es ist leicht, dies so auszuführen, daß, wenn der größte Teil des Virus an die Zellen gebunden ist, das restliche Virus ausgewaschen wird. Wir haben dann ein Präparat zur Gewinnung von neu gebildetem Virus. Denn sobald das restliche Virus ausgewaschen ist, haben wir infizierte Zellen in einer virusfreien Flüssigkeit. Das Freiwerden von neuem Virus aus den Zellen beginnt 3–4 Stunden nach der Infektion und hat nach 7 Stunden einen angemessenen Titer erreicht. Die zu dieser Zeit geerntete Flüssigkeit stellt eine Virusaufschwemmung dar, die von doppelt infizierten Zellen stammt und deren Ausbeute den Durchschnitt des in solchen Zellen

zur Vermehrung gelangten Virus darstellt, unbeeinflusst von irgendwelchen anderen Selektionsvorgängen.

Diese Technik wurde bei einer ziemlich großen Anzahl von Grippevirusstämmen angewendet und wir erhielten viele verschiedene Typen von rekombinierten Stämmen. Viele der Arbeiten wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich im Druck. Ich möchte hier nur ein oder zwei der wichtigsten Feststellungen erwähnen.

1. Wenn Virusarten von zwei verschiedenen serologischen Typen benutzt werden, so besteht der größte Teil der Ausbeute aus Virus, das beide serologische Eigenschaften besitzt, daß es so durch die beiden entsprechenden Immunsera neutralisiert wird. Dieser Virustyp züchtet nicht rein weiter, er besteht weitgehend aus „unvollständigem“ Virus, das unfähig ist, sich fortlaufend zu vermehren.

2. Die genetische Analyse läßt vermuten, daß im Grippe-A-Virus nur zwei „Haftgruppen“ vorhanden sind.

3. Einige, vielleicht alle, virulente Typen sind mit einem bestimmten Typ von Rekombination vergesellschaftet, so daß zu vermuten ist, daß die Virulenz durch Anhäufung vieler genetischer Einheiten entsteht. Durch gleichzeitige Infektion mit einem hoch-virulenten und einem avirulenten Stamm entsteht eine Reihe von Virustypen, die alle Grade der Virulenz zeigen.

Nach unserer Meinung eröffnet diese Technik zum Studium der Unterschiede zwischen den einzelnen Grippevirusstämmen, die im wesentlichen eine genetische Methode ist, ein weites Feld für die Forschung. Sie erlaubt es, einerseits im allgemeinen die Möglichkeiten der Vererbung in den Mikroorganismen zu erforschen, andererseits kann man mit ihr die praktischen Probleme der Erzeugung von Virusstämmen mit bestimmten Eigenschaften bearbeiten und zwar von Virusstämmen zur Herstellung von Impfstoffen oder für eine Aufgabe, mit der wir in Australien uns befassen müssen, nämlich die Verminderung unserer Kaninchenbestände durch das Virus der Myxomatose.

### Ausblick

Dies gibt in großen Zügen die Untersuchungen über Grippevirus wieder, die ich in den letzten Jahren durchgeführt habe. Ich möchte jedoch meine Ausführungen nicht beenden, ohne auf die Bedeutung der besprochenen Arbeiten hinzuweisen, die, wenn sie sich auch mit einem so speziellen Thema wie dem Grippevirus befassen, doch einen Beitrag zur allgemeinen Biologie darstellen. Alle Lebewesen sind nach einem einzigen fundamentalen Grundsatz geschaffen, und jede grundlegende Erkenntnis kann — auch wenn sie an einem Virus gewonnen wurde — irgendwo in der Natur angewandt werden. In gewisser Hinsicht vermittelt das Zusammenwirken des Virus mit der Zelle, die es infiziert, auf feinste und möglichst klare Weise eine Vorstellung von den grundlegenden Vorgängen in der Zelle selbst.

Das eindringende Virus ist ein Instrument, das wir gebrauchen lernen sollten zur Erforschung des fundamentalsten aller biologischen Probleme, nämlich der Verdoppelung organischer Strukturen.

Vielleicht hat die seit den Tagen von *Behring* und *Ehrlich* hervorragende Entwicklung in der Mikrobiologie die Richtung gewiesen, nach der die Immunologie und die Erforschung der Viruskrankheiten als Teile der allgemeinen Biologie angesehen werden. Ich glaube, besonders *Ehrlich* würde die modernen Errungenschaften zu schätzen wissen, da sie in so mancher Hinsicht auf die Entwicklung seiner eigenen Ideen über die spezifischen molekularen Strukturen bei biologischen Reaktionen aufbauen.

[A 574]