

Gewinn an Resonanzenergie verbunden ist. Gegenüber einem Metallatom hat demnach das Cyclopentadienylradikal ausgesprochene Elektronenacceptoreigenschaften, während dies beim Allylradikal nicht der Fall ist.

Wir danken herzlich dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung, Herrn Prof. K. Ziegler, für die

großzügige Unterstützung unserer Arbeiten und den Herren Dr. E. G. Hoffmann, Dr. D. Henneberg und Dr. G. Schomburg sowie deren Mitarbeitern für die Aufnahme und Diskussion zahlreicher IR- und Protonenresonanzspektren, Massenspektren und Gaschromatogramme.

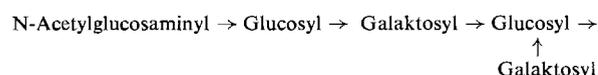
Eingegangen am 30. September 1965 [A 500]

Die Bedeutung von Mutanten bei Enterobacteriaceen für die chemische Erforschung ihrer Zellwand-Polysaccharide

VON DR. O. LÜDERITZ UND PROF. DR. O. WESTPHAL
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR IMMUNBIOLOGIE, FREIBURG

Herrn Professor Karl Freudenberg in Verehrung und Freundschaft zum 80. Geburtstag gewidmet

Enterobacteriaceen bilden als äußere Zelloberfläche eine Zellwand, die aus einer rigiden Struktur (Murein) besteht, auf welche Protein, Lipoid und Polysaccharid aufgelagert sind. Bei den bakteriellen Wildformen (S-Formen) ist das Polysaccharid species-spezifisch und Träger der serologisch determinanten Gruppen des jeweiligen O-Antigens. Es handelt sich um Heteropolysaccharide, an deren Aufbau bis zu acht verschiedene Monosaccharide beteiligt sein können. Gebunden an Lipoid A, stellen die Lipopolysaccharide der Zellwände die Endotoxine dieser Bakterien dar. – In den letzten Jahren ist die Struktur der enterobakteriellen Zellwand-Polysaccharide durch chemische, immunchemische, biochemische und genetische Untersuchungen besonders bei Salmonellen weitgehend aufgeklärt worden. Sie sind aus zwei Anteilen aufgebaut: einem allen Species gemeinsamen Kern- oder Basal-Polysaccharid, an welches (bei den S-Formen) längere species-spezifische Seitenketten gebunden sind, die aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten bestehen. – Durch spontane $S \rightarrow R$ -Mutation entstehen R-Formen, welche sich als Verlust-Mutanten der Wildformen in Bezug auf die Biosynthese des kompletten Zellwand-Polysaccharids erwiesen haben. Gegenüber der Vielfalt an serologischen Spezifitäten der S-Formen findet man bei R-Formen nur einige wenige Serotypen (RI, RII u.a.) Die R-Polysaccharide entsprechen Zwischenstufen in der Biosynthese des Polysaccharids der Wildform, und die $S \rightarrow R$ -Mutation führt jeweils zum Verlust (oder zur Blockierung) eines am Aufbau des S-Polysaccharids beteiligten Enzyms (Transferase, Synthetase). Neuerdings konnten viele bisher unbekannte Verlust-Mutanten isoliert und analysiert werden, wodurch zahlreiche biosynthetische Zwischenstufen des Zellwand-Polysaccharids, z.B. von *Salmonella minnesota*, der direkten Analyse zugänglich wurden. – Nach diesen Untersuchungen bestehen die Zellwand-Polysaccharide der Salmonellen aus einer Polyheptosephosphat-Grundkette, welche über Ketodesoxyoctonsäure (KDO) an Lipoid A gebunden ist. An die Grundkette sind Pentasaccharid-Einheiten von



gebunden (RII-Struktur). Alle übrigen R-Formen sind strukturell Verlust-Mutanten von RII. In den kompletten Polysacchariden der *Salmonella*-S-Formen sind an das terminale N-Acetylglucosamin der RII-Struktur die sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten der spezifischen Seitenketten gebunden.

Einleitung

Enterobacteriaceen bilden eine große Klasse von Mikroorganismen, welche in mehrere Genera unterteilt ist, zu denen die Salmonellen, Shigellen, Colibakterien u. a. gehören^[1]. Auf Grund serologischer Eigenschaften bestehen die einzelnen Genera aus einer mehr oder weniger

großen Zahl von Species oder Serotypen. Im Genus *Salmonella* sind beispielsweise mehr als siebenhundert nahestehende Species zusammengefaßt; sie sind im Kauffmann-White-Schema^[2,3] serologisch klassifiziert. Unter ihnen finden sich pathogene und daher klinisch wichtige Keime – z. B. *Typhus* und *Paratyphus* –, aber

[1] F. Kauffmann: Enterobacteriaceae. 2. Aufl., Verlag Munksgaard, Kopenhagen 1954.

[2] F. Kauffmann in E. van Oye: The world problem of Salmonellosis. Uitgeverij Dr. W. Junk, Den Haag 1964, S. 21.

[3] F. Kauffmann: Die Bakteriologie der *Salmonella*-Species. Verlag Munksgaard, Kopenhagen 1961.

auch viele relativ unpathogene Vertreter. Ebenso sind bis heute mehrere hundert *Coli*-Stämme bekannt, und ständig werden neue Species isoliert und serologisch charakterisiert.

Über den morphologischen Zellaufbau ist bei Enterobacteriaceen viel gearbeitet worden^[4]. Besonderes Interesse hat dabei immer wieder die Zellwand gefunden, welche die äußere strukturierte Begrenzung der Zelle bildet^[5]. Sie liegt der cytoplasmatischen Membran auf, die das Cytoplasma umschließt und besteht prinzipiell aus zwei Hauptteilen: der rigiden Struktur und dem Füllmaterial. Über die rigide Struktur, welche dem Bakterium seine Formfestigkeit verleiht, ist viel durch die Arbeitskreise von *W. Weidel*^[6] u. a. bekannt geworden. Jede Zelle bildet ein riesiges beutelförmiges Molekül, das Murein (bag-shaped molecule, Sacculus), welches aus Ketten alternierender N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäure-Einheiten mit peptidischen Quervernetzungen besteht^[7,8]. In diesen Muramyl-peptiden, welche bei allen bisher untersuchten Bakterienarten eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen, findet man neben L-Aminosäuren (L-Alanin, L-Lysin u. a.) regelmäßig auch D-Aminosäuren (D-Alanin, D-Glutaminsäure). Durch die weitgehende chemische Aufklärung der rigiden Struktur ist neuerdings die Wirkung von Enzymen, wie Lysozym und auch von Antibiotika, wie Cycloserin und Penicillin auf Bakterien verständlich geworden.

Auf die rigide Struktur sind charakteristische höhermolekulare Zellwand-Bauelemente aufgelagert^[4]: Pro-

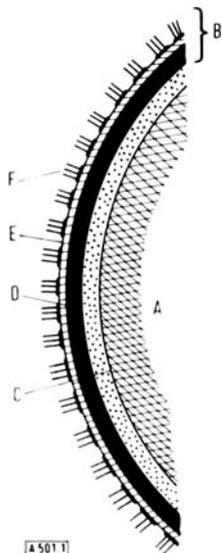


Abb. 1. Schematische Darstellung der Zellwandstruktur von Enterobacteriaceen.

- A: Cytoplasma
- B: Zellwand
- C: Cytoplasmatische Membran
- D: Rigide Struktur (Muramyl-Peptid)
- E: Protein, Lipoid
- F: Polysaccharid

[4] *M. R. J. Salton*: The bacterial cell wall. Elsevier, Amsterdam 1964.

[5] *H. R. Perkins*, *Bacteriol. Rev.* 27, 18 (1963).

[6] *W. Weidel*, *Angew. Chem.* 76, 801 (1964); *W. Weidel* u. *H. Pelzer*, *Adv. Enzymol.* 26, 193 (1964).

[7] *J. M. Ghuysen*, *D. J. Tipper* u. *J. L. Strominger*, *Biochemistry* 4, 474 (1965).

[8] *J. L. Strominger*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 128, 59 (1965).

tein, Lipoid und Polysaccharid (Abb. 1). Unter diesen Bauelementen scheinen Proteine und Lipoide, ähnlich wie die rigide Struktur der Zellwand, bei vielen (wenn nicht allen) Species chemisch ähnlich zusammengesetzt zu sein^[9,10]. Dagegen entfalten Enterobacteriaceen eine ganz außerordentliche Vielfalt in Bezug auf das jeweilige Polysaccharid, welches bei diesen Mikroorganismen weitgehend für die serologische Species- oder Gruppen-Spezifität verantwortlich ist. Wenn man mit abgetöteten Keimen Kaninchen immunisiert, so bilden sie Antiseren, welche das betreffende Bakterium und serologisch kreuzreagierende Arten agglutinieren. Bei den für diese Agglutination verantwortlichen somatischen Antigenen an der Bakterienoberfläche spielt das Polysaccharid-Antigen – oder O-Antigen (bei Wildformen) – eine wesentliche Rolle: spezifische, determinante Strukturen in dem jeweiligen Zellwand-Polysaccharid reagieren mit entsprechenden Antikörpern. Diese determinanten oligosaccharidischen Strukturen (siehe z.B.^[11]) sind die Grundlage für das Verständnis der serologischen Diagnostik von enterobakteriellen Serotypen, wie sie z. B. im Kauffmann-White-Schema der Salmonellen^[3] festgelegt wurden. Die immunchemische Aufklärung der determinanten Bereiche in diesen Polysaccharid-Antigenen wurde erst durch die Anwendung monospezifischer Antiseren (Faktoren-Seren), deren Herstellung *Kauffmann* beschrieben hat^[3], ermöglicht.

In der Zellwand sind die Polysaccharid-Antigene fest mit einer Lipoid-Komponente, dem Lipoid A^[12], und mit Protein verbunden. Je nach dem angewandten Extraktionsverfahren^[9-11,13] kann man diese Antigene daher in mehr oder weniger komplexer Form in wäßrige Lösung überführen. Dabei hat sich gezeigt, daß insbesondere die Lipopolysaccharide (Lipoid-A-Polysaccharide) der Enterobacteriaceen nicht nur als O-Antigene mit den entsprechenden determinanten Strukturen wirken, sondern auch als Endotoxine biologisch höchst aktive Substanzen (Fieberstoffe u. a.^[14]) sind. Somit sind die unspezifisch endotoxischen und die spezifisch antigenen Eigenschaften dieser Bakterien an ein und demselben komplexen Molekül, dem Lipopolysaccharid, verankert. Dabei ist die Lipoid-A-Komponente für die endotoxischen, die Polysaccharid-Komponente für die antigenen (serologischen) Wirkungen wesentlich (siehe dazu^[15,16]). – Die Lipopolysaccharide lassen sich entweder direkt aus den Bakterien mit Phenol/Wasser^[17] extrahieren, wobei sie dann mit Nucleinsäure gemischt

[9] *W. T. J. Morgan* u. *S. M. Partridge*, *Biochem. J.* 35, 1140 (1941).

[10] *F. Binkley*, *W. F. Goebel* u. *E. Perlman*, *J. exp. Med.* 81, 331 (1945).

[11] *O. Lüderitz*, *A. M. Staub* u. *O. Westphal*, *Bacteriol. Rev.* 1966, im Druck.

[12] *O. Westphal* u. *O. Lüderitz*, *Angew. Chem.* 66, 407 (1954).

[13] *A. Boivin*, *J. Mesrobianu* u. *L. Mesrobianu*, *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* 113, 490 (1933).

[14] *M. Landy* u. *W. Braun* in: *Bacterial endotoxins*. Rutgers, The State University, New Brunswick 1964.

[15] *O. Westphal*, *A. Nowotny*, *O. Lüderitz*, *H. Hurni* u. *E. Eichenberger*, *Pharmac. Acta Helvetiae* 33, 401 (1958).

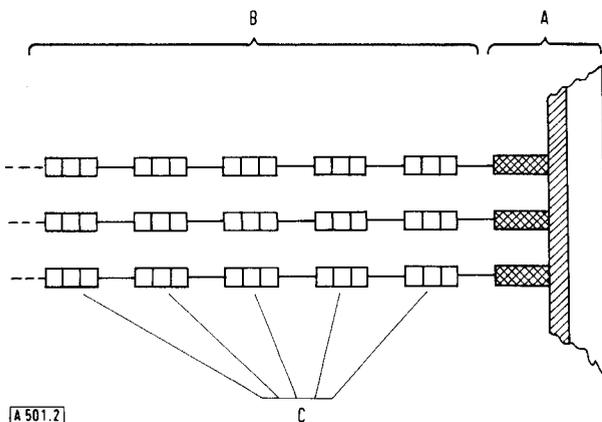
[16] *O. Westphal*, *Ann. Inst. Pasteur* 98, 789 (1960).

[17] *O. Westphal*, *O. Lüderitz* u. *F. Bister*, *Z. Naturforsch.* 7b, 148 (1952); *O. Westphal* u. *K. Jann*, *Methods of Carbohydrate Chem.* 5, 83 (1965).

sind, von welcher man sie anschließend abtrennen muß – oder man kann zuerst gereinigte Zellwände präparieren [18], welche man dann mit Phenol/Wasser extrahiert.

Die spezifischen Polysaccharide der enterobakteriellen Wildformen (S-Formen)

Das Bauprinzip der enterobakteriellen Zellwand-Polysaccharide ist in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt worden. Danach bestehen die Polysaccharide der Wildformen (Glattformen oder S-Formen; von smooth = glatt) aus (a) einer Grundkette aus Polyheptosephosphat, an welche Seitenketten gebunden sind. Diese bestehen ihrerseits aus zwei Bezirken, (b) einer weitgehend ubiquitären inneren oligosaccharidischen Kette, an welche (c) längere Ketten gebunden sind, die aus periodisch sich wiederholenden species-spezifischen Oligosaccharid-Einheiten (repeating units) bestehen. Diese sich wiederholenden Einheiten können geradkettig sein oder selbst noch kurze Seitenketten von einzelnen Zuckerbausteinen besitzen. In der Untersuchung der Chemie und Immunchemie solcher Seitenketten haben vor allem A. M. Staub und ihre Mitarbeiter am Pasteur-Institut, Paris, Pionierarbeit geleistet [11, 19–23]. Die Natur der am Aufbau dieser sich wiederholenden Einheiten beteiligten Zuckerbausteine, die Art ihrer glykosidischen Verknüpfung und die Bindung zwischen den Einheiten bestimmt die Spezifität des Polysaccharids und damit des betreffenden Serotyps. Auf Grund dieses Bauprinzips besitzen die enterobakteriellen S-Formen kammförmig strukturierte Polysaccharid-Moleküle



A 501.2

Abb. 2. Schematische Darstellung des spezifischen und unspezifischen Bezirks im Polysaccharid von *Salmonella*-O-Antigenen.

A: Basalstruktur B: O-Spezifische Seitenketten
C: Sich wiederholende Einheiten

[18] M. J. Osborn, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 499 (1963); E. Ribi et al. in: Bacterial endotoxins. Rutgers, The State University, New Brunswick 1964, S. 16; siehe auch E. Kröger et al., Naturwissenschaften 46, 428 (1959).

[19] A. M. Staub u. R. Tinelli, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 1537 (1960).

[20] A. M. Staub u. N. Forest, Ann. Inst. Pasteur 104, 371 (1963).

[21] A. M. Staub in: Bacterial endotoxins. Rutgers, The State University, New Brunswick 1964, S. 38.

[22] A. M. Staub u. M. Raynaud in E. van Oye: The world problem of Salmonellosis. Uitgeverij Dr. W. Junk, Den Haag 1964, S. 143.

[23] A. M. Staub u. O. Westphal, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 1647 (1964).

(siehe Abb. 1), die aus einer Heptosephosphat-Grundkette, einer inneren ubiquitären Seitenkette und den daran gebundenen sich wiederholenden spezifischen Einheiten bestehen (Abb. 2).

Wir wissen heute durch die Arbeiten von M. J. Osborn [18] und E. C. Heath [24], daß die Heptosephosphat-Kette in den Lipopolysacchariden über Ketodesoxyoctonsäure (KDO), welche vor einigen Jahren von E. C. Heath und M. A. Ghalambor [25] entdeckt und aufgeklärt wurde, an Lipoid A gebunden ist. Lipoid A ist ein Derivat von Poly-(N- β -hydroxymyristinoyl-D-glucosaminphosphat) mit langkettigen Esterfettsäuren [15, 26, 27]. Bei der Analyse von enterobakteriellen Lipopolysacchariden findet man daher stets D-Glucosamin und KDO, wobei für Glucosamin dann noch ermittelt werden muß, ob und in welcher Bindung dieser Zuckerbaustein außer im Lipoid A auch im Polysaccharid vorkommt.

Seit mehreren Jahren haben wir uns mit der chemischen und immunchemischen Analyse der O-spezifischen Polysaccharide aus bakteriellen S-Formen befaßt. Gemeinsam mit F. Kauffmann (Kopenhagen), der die serologische Klassifizierung der Salmonellen in mehreren Jahr-

Chemotyp	Hexosamine	KDO	Heptose	Hexosen		5-Desoxyhexosen	Pentosen	3,6-Didesoxyhexosen		O-Serogruppen				
	D-Galaktosamin	D-Glucosamin	2-Keto-3-desoxyoctonat	D-Galaktose	D-Glucose	D-Mannose	L-Fucose	L-Rhamnose	Ribose		Colitose	Abelose	Paratose	Tylose
I	○	●	●	●	●									J, V, X, Y, 58
II	○	●	●	●	●									L, P, 51, 55
III	○	●	●	●	●	○								C ₁ , C ₂ , H, S
IV	○	●	●	●	●									K, R
V	○	●	●	●	●		○							W
VI	○	●	●	●	●		○							G, N, U
VII	○	●	●	●	●			○						T, 59
VIII	○	●	●	●	●			○						M, (28 ₁ , 28 ₂) 53, 57
XXV	○	●	●	●	●				○					52
IX	○	●	●	●	●				○					M, (28 ₁ , 28 ₂) 56
X	○	●	●	●	●					○				O
XI	○	●	●	●	●						○			Z
XII	○	●	●	●	●	○	○							I, Q
XIII	○	●	●	●	●		○							E, F, 54
XIV	○	●	●	●	●	○		○				○		B, C ₂ , C ₃
XV	○	●	●	●	●	○						○		A
XVI	○	●	●	●	●	○	○						○	O ₁ , O ₂

A 501.3

Abb. 3. Zuckerzusammensetzung von *Salmonella*-Lipopolysacchariden (Klassifizierung in Chemotypen) [28, 29].

Offene Kreise: spezifische Zucker
Schraffierte Kreise: basale Zucker

[24] R. D. Edstrom u. E. C. Heath, Biochem. biophysic. Res. Commun. 16, 576 (1964).

[25] E. C. Heath u. M. A. Ghalambor, Biochem. biophysic. Res. Commun. 10, 340 (1963).

[26] A. Nowotny, J. Amer. chem. Soc. 83, 501 (1961).

[27] A. J. Burton u. H. E. Carter, Biochemistry 3, 411 (1964).

[28] F. Kauffmann, O. Lüderitz, H. Stierlin u. O. Westphal, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 178, 442 (1960).

[29] F. Kauffmann, B. Jann, L. Krüger, O. Lüderitz u. O. Westphal, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 186, 509 (1962).

zehnten ausarbeitete (Kauffmann-White-Schema), haben wir aus den S-Formen von über hundert *Salmonella*-Species die Lipopolysaccharide isoliert und die Zuckerbausteine ihrer Polysaccharid-Komponenten identifiziert [28, 29]. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der qualitativen Zuckeranalysen und soll lediglich einen Eindruck von der Vielfalt der gefundenen Zuckerkombinationen (Chemotypen) [28] vermitteln. Einige Polysaccharide enthalten bis zu acht verschiedene Monosaccharide.

Es fällt auf, daß alle untersuchten *Salmonella*-Lipopolysaccharide jeweils die folgenden fünf Zuckerbausteine enthalten: KDO, Heptose, Galaktose, Glucose und Glucosamin, die wir als basale Zucker bezeichnet haben (in Abb. 3 mit schraffierten Kreisen bezeichnet). Zu diesen basalen Zuckern können die spezifischen Zucker in verschiedenen Kombinationen hinzutreten, wie Galaktosamin, Mannose, Fucose oder Rhamnose und die 3,6-Didesoxyhexosen [30] (Paratose, Abequose, Tyvelose oder Colitose). Die Kombination der basalen Zucker ohne spezifische Zucker entspricht dem Chemotyp I. Bei *Salmonella*-O-Antigenen wurden bislang die in Abbildung 3 zusammengestellten 17 verschiedenen Zuckerkombinationen (Chemotypen I bis XVI und XXV) aufgefunden. Nimmt man die bisher analysierten spezifischen Polysaccharide aus S-Formen von *E. coli* hinzu [31, 32], so ergeben sich etwa 25 verschiedene Chemotypen. Die Vielfalt an Heteropolysacchariden ist noch größer, wenn man berücksichtigt, daß bei gleicher qualitativer Zusammensetzung die Zucker in verschiedenen O-Antigenen in unterschiedlicher Folge und auch in verschiedenen Bindungen vorliegen können.

Der Mannigfaltigkeit der serologischen Spezifitäten von *Salmonella*-O-Antigenen, die ihren Ausdruck im Kauffmann-White-Schema findet, entspricht die Vielfalt der Strukturen in den polysaccharidischen Seitenketten. Die Abbildungen 4 und 5 sollen hiervon einen Eindruck geben. In Abbildung 4 sind Oligosaccharid-Einheiten dargestellt, die durch Analyse von Partialhydrolysaten aus den Seitenketten von Polysacchariden mehrerer *Salmonella*-Species aufgeklärt wurden. Ihre Konstitution wurde von A. M. Staub und Mitarb. [19-21, 33] bei den *Salmonella*-Gruppen B, D, E₄ sowie von P. W. Robbins, T. Uchida und S. E. Luria [34] bei den Gruppen E₁, E₂ und E₃ ermittelt. Die Seitenketten aller dieser Polysaccharide besitzen die gleiche Zuckersequenz entlang der Kette, nämlich Galaktose-Mannose-Rhamnose (Gal→Man→Rha), während die Bindungen verschieden und kurze Seitenketten vorhanden oder abwesend sein können.

Jede Änderung in der Struktur dieser in der Kette sich wiederholenden Einheiten findet ihren Ausdruck in einer neuen serologischen Teilspezifität, an Hand deren der

[30] O. Westphal u. O. Lüderitz, *Angew. Chem.* 72, 881 (1960).

[31] B. Jann, Dissertation, Universität Freiburg 1965.

[32] F. Ørskov, I. Ørskov, K. Jann u. B. Jann, *Acta pathol. microbiol. scand.* 1966, im Druck.

[33] G. Bagdian, O. Lüderitz u. A. M. Staub, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1966, im Druck.

[34] T. Uchida, P. W. Robbins u. S. E. Luria, *Biochemistry* 2, 663 (1963); P. W. Robbins u. T. Uchida, *J. biol. Chemistry* 240, 375 (1965).

Serogruppe	O-Faktoren	Struktur der sich wiederholenden Einheiten
E ₁	3, 10	→α-Ac-GAL-(1→6)-α-MAN-(1→4)-RHA→
E ₂	3, 15	→β-GAL-(1→6)-α-MAN-(1→4)-RHA→
E ₃	(3), (15), 34	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Glc} \\ \downarrow \frac{1}{4} \\ \rightarrow\beta\text{-GAL}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-MAN}-(1\rightarrow4)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
E ₄	1, 3, 19	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Glc} \\ \downarrow \frac{1}{6} \\ \rightarrow\alpha\text{-GAL}-(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-MAN}-(1\rightarrow4)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
D ₂	3, (9), 46	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Tyv} \\ \downarrow \\ \rightarrow\text{GAL}-(1\rightarrow6)\text{-MAN}-(1\rightarrow x)\text{-RHA}\rightarrow \\ \text{(hypothetisch)} \end{array}$
B	4 ₁ , 12 ₁ , 27, 27B	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Abe} \\ \downarrow \frac{1}{3} \\ \rightarrow\text{GAL}-(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-MAN}-(1\rightarrow4)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
	4 ₁ , 4 ₂ , 12 ₁	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Abe} \\ \downarrow \frac{1}{3} \\ \rightarrow\text{GAL}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-MAN}-(1\rightarrow4)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
	4 ₁ , 4 ₂ , 5, 12 ₁ , 12 ₂	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Glc} \quad \alpha\text{-Abe} \\ \downarrow \frac{1}{4} \quad \downarrow \frac{1}{4} \\ \rightarrow\alpha\text{-Ac-GAL}-(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-MAN}-(1\rightarrow4)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
D ₁	9, 12 ₁ , 12 ₃	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Tyv} \\ \downarrow \\ \rightarrow\text{GAL}-(1\rightarrow4)\text{-MAN}-(1\rightarrow x)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$
	9, 12 ₁ , 12 ₂ , 12 ₃	$\begin{array}{c} \alpha\text{-Glc} \quad \alpha\text{-Tyv} \\ \downarrow \frac{1}{4} \quad \downarrow \\ \rightarrow\alpha\text{-GAL}-(1\rightarrow4)\text{-MAN}-(1\rightarrow x)\text{-RHA}\rightarrow \end{array}$

Abb. 4. Strukturell verwandte O-spezifische Oligosaccharide (sich wiederholende Einheiten) in Lipopolysacchariden verschiedener *Salmonella*-Species der Gruppen B, D, E [11, 33, 34, 36, 80].

betreffende Bakterienstamm charakterisiert wird und der eine individuelle Antigenformel entspricht, welche (im Kauffmann-White-Schema) schon festgelegt war, lange bevor diese Strukturen erkannt worden waren.

Durch die genannten Arbeitskreise wurde in den letzten Jahren gefunden, daß verschiedene der in Abbildung 4 aufgeführten spezifischen Seitenkettenstrukturen durch lysogene Konversion ineinander übergehen können, mithin genetisch häufig in enger Beziehung stehen, obwohl sie verschiedenen, serologisch wenig verwandten Serogruppen angehören können. So führt die Infektion von *Salmonella uganda* (O-Antigenfaktoren 3, 10) mit dem lysogenen Phagen ϵ_{15} zur Konversion in *Salmonella newington* (3, 15). Dieser Stamm geht seinerseits nach Infektion mit dem Phagen ϵ_{34} in *S. illinois* über [Faktoren (3), (15), 34]. Die strukturellen Veränderungen an den entsprechenden Polysacchariden, welche von Robbins et al. [34] aufgeklärt wurden, sind aus Abbildung 4 zu ersehen. — Ein anderes Beispiel lysogener Konversion wurde von L. le Minor und A. M. Staub [33, 35] bearbeitet. Salmonellen der Gruppen A, B und D werden nach Infektion mit dem Phagen ϕ_{27} in neue Serotypen übergeführt:

Gruppe A: 2, 12 $\xrightarrow{\phi_{27}}$ 2, 12, 27A, 27

Gruppe B: 4, 12 $\xrightarrow{\phi_{27}}$ 4, 12, 27B, 27

Gruppe D: 9, 12 $\xrightarrow{\phi_{27}}$ 9, 12, 27D, 27

Chemisch ändert sich dabei in allen drei Antigenen die glykosidische Verknüpfung von Galaktose zu Mannose in der ganzen Kette:

α-Galaktose(1→4)Mannose → α-Galaktose(1→6)Mannose

[35] L. le Minor, *Ann. Inst. Pasteur* 103, 684 (1962); A. M. Staub u. N. Forest, *ibid.* 104, 371 (1963).

Diese Veränderung hat das Auftreten der neuen Spezifitäten zur Folge. Auch die chemischen Veränderungen, welche zum Auftreten der Spezifität 1 nach Infektion mit dem Phagen P 22 führen, wurden von *A. M. Staub* und ihrem Arbeitskreis aufgeklärt [36].

Durch die in den Phagen-Nucleinsäuren enthaltene biologische Information sind viele der in Abbildung 4 aufgeführten *Salmonella*-Serotypen genetisch miteinander verbunden und bilden vielleicht eine Familie von Species, die bei der Evolution der Salmonellen aus einer Urform mit (Gal → Man → Rha)-Ketten hervorgegangen sind.

Abbildung 5 zeigt, daß die spezifischen Ketten von Polysacchariden anderer *Salmonella*-Gruppen (z. B. G, N und U) aus anderen Zuckern aufgebaut sein können, hier z. B. aus Galaktosamin, Glucosamin, Galaktose, Glucose und Fucose. Die Konstitution der entsprechenden Lipopolysaccharide hat *A. R. Simmons* an unserem Institut erforscht [37]. Sie stehen hinsichtlich ihrer Zuckerkonzusammensetzung den menschlichen Blutgruppensubstanzen nah. *G. F. Springer* et al. [38] haben gezeigt, daß *S. milwaukee* starke Blutgruppen-B-Spezifität besitzt. An der untersten Formel in Abbildung 5 sieht man, daß diese Kreuzreaktion vermutlich auf die α -Galaktosyl (1→3) Galaktose-Gruppierung zurückgeführt werden kann, welche nach *W. T. J. Morgan* [39] in der Blutgruppensubstanz B Träger der serologischen B-Spezifität ist.

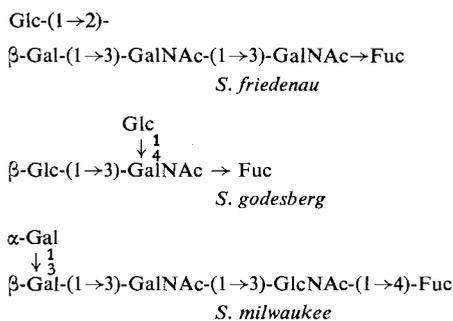


Abb. 5. O-Spezifische Oligosaccharide in Lipopolysacchariden der Gruppen G (*S. Friedenau*), N (*S. godesberg*) und U (*S. milwaukee*) [37].

In Abbildung 4 und 5 sind Oligosaccharid-Einheiten aufgezeichnet, die aus Partialhydrolysaten der entsprechenden Lipopolysaccharide isoliert wurden. Wie die Oligosaccharide der Abbildung 5 in die Kette eingebaut sind, mit welchem Zucker die Kette beginnt und über die Kettenlänge wissen wir bislang nichts. Dagegen sind die in Abbildung 4 dargestellten Oligosaccharide in der ange deuteten Weise verknüpft. Glucose und die 3,6-Didesoxyzucker bilden Seitenketten. Der erste Zucker der O-spezifischen Kette ist Galaktose. Die isolierten, chemischen Einheiten Gal→Man→Rha sind somit verschieden von den biologischen Einheiten (Man→Rha→Gal) [40].

[36] *B. A. D. Stocker, A. M. Staub, R. Tinelli u. B. Kopacka*, Ann. Inst. Pasteur 98, 505 (1960).

[37] *D. A. R. Simmons, O. Lüderitz u. O. Westphal*, Biochem. J. 97, 807, 815, 820 (1965).

[38] *G. F. Springer, P. Williamson u. W. C. Brandes*, J. exp. Med. 113, 1077 (1961).

[39] *V. P. Rege, T. J. Painter, W. M. Watkins u. W. T. J. Morgan*, Nature (London) 200, 532 (1963).

[40] *H. Nikaido, Y. Naide u. P. H. Mäkelä*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966, im Druck.

Es dürfte von großem Interesse sein, die Struktur der sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten möglichst vieler O-Antigene von *Salmonella*-S-Formen, wie auch derjenigen anderer Genera, kennenzulernen. Beispielsweise haben *B. Jann* et al. [31, 32] bei der vergleichenden Analyse vieler *E. coli*-Species gefunden, daß 14 nicht-kreuzreagierende *Coli*-Stämme O-Antigene vom Chemotyp I (nur basale Zucker) und 17 Stämme solche vom Chemotyp VII (basale Zucker plus L-Rhamnose) bilden. Diese Stämme mit chemotypisch gleichen Polysaccharid-Antigenen müssen strukturell verschiedene Seitenketten haben.

Die S→R-Mutation

Es ist seit langem bekannt, daß die Wildformen von Enterobacteriaceen spontan mutieren können. Die mutierten Stämme werden leicht erkannt, weil sie im allgemeinen rauhe, flache Kolonien (R-Formen) auf Agar bilden, während die Mutterstämme in glatten, glänzenden Kolonien (S-Formen) wachsen [3]. Mit dem Wechsel in der Kolonieform ist der Verlust einiger biologischer Eigenschaften verbunden. R-Mutanten haben die serologische O-Spezifität des Ausgangsstammes verloren; sie agglutinieren im allgemeinen nicht in dessen O-Antiserum. In flüssigen Nährmedien zeigen R-Formen häufig Spontan-Agglutination. Relativ zu den Wildformen (S-Formen) sind die R-Mutanten weniger oder nicht pathogen; sie werden im höheren Organismus rasch phagozytiert und intrazellulär abgetötet. R-Mutanten synthetisieren jedoch auch ein Zellwand-Lipopolysaccharid, welches mit Phenol/Wasser extrahiert werden kann [41, 42] und das sich im Tier im allgemeinen als ebenso wirksames Endotoxin wie das Lipopolysaccharid aus der zugehörigen S-Form erweist.

Wegen des Verlustes der serologischen O-Spezifität bei der S→R-Mutation war anzunehmen, daß R-Lipopolysaccharide sich in ihrer Konstitution von den entsprechenden O-spezifischen S-Lipopolysacchariden unterscheiden. *F. Kauffmann* hat, ausgehend von etwa 25 verschiedenen *Salmonella*-S-Formen mit O-Antigenen nahezu aller Chemotypen (vgl. Abb. 3), R-Mutanten isoliert, aus welchen wir das jeweilige Lipopolysaccharid extrahierten [42]. Das Ergebnis der Zuckeranalyse dieser R-Lipopolysaccharide kann in einfacher Weise aus Abbildung 3 ersehen werden. Im Gegensatz zur Vielfalt der Zuckerkombinationen (Chemotypen) in den Lipopolysacchariden der S-Formen enthielten die Lipopolysaccharide der R-Mutanten nur die basalen Zucker (in Abb. 3 schraffiert markiert), gleichgültig welchem Chemotyp die S-Form angehörte. Die spezifischen Zucker der Lipopolysaccharide der Wildformen sind in den entsprechenden R-Lipopolysacchariden verschwunden. Die Vielfalt im Aufbau der O-Antigene ist nach S→R-Mutation durch ein sehr gleichförmiges Bild ersetzt; die untersuchten R-Antigene gehören alle dem Chemotyp I (mit nur basalen Zuckern) an [42].

[41] *O. Westphal u. O. Lüderitz*, 6. Int. Kongr. Microbiol. 2, 22 (1953).

[42] *F. Kauffmann, L. Krüger, O. Lüderitz u. O. Westphal*, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 182, 57 (1961).

Zwei Tatsachen erschienen uns von Bedeutung: 1. daß *Salmonella*-O-Antigene neben den spezifischen Zuckern ohne Ausnahme stets die gleichen fünf basalen Zucker enthalten, und 2. daß die gleichen fünf Zucker die Lipopolysaccharide der untersuchten R-Mutanten aufbauen. Hiervon leiteten wir – und unabhängig *H. Nikaido* [44] – die Arbeitshypothese ab [42,43], daß die Polysaccharide der R-Formen möglicherweise in den Polysacchariden der S-Formen als Kern vorgebildet sind (siehe dazu Abb. 2).

Danach würden O-Antigene aus dem Kernpolysaccharid mit den fünf basalen Zuckern und den O-spezifischen Seitenketten bestehen. Die Seitenketten machen den Hauptteil des Gesamtmoleküls aus; das basale Kernpolysaccharid wäre allen O-Antigenen als unterliegende Struktur gemeinsam. Wenn bei einer enterobakteriellen Wildform die Biosynthese der O-spezifischen Seitenketten durch Enzymblock – auf Grund einer Mutation – gestoppt ist, käme es nur zur Synthese des Kerns, welcher demnach das R-spezifische Polysaccharid der R-Mutanten darstellen würde. Überdies wäre plausibel, daß die Polysaccharide von R-Formen keine Zuckerbausteine enthalten, die nicht auch in der S-Form vorhanden sind.

Diese Vorstellung vom ubiquitären basalen Polysaccharid und von den spezifischen Seitenketten ist zwar noch nicht endgültig als allgemeines Bauprinzip bewiesen worden, für *Salmonellen* inzwischen jedoch weitgehend akzeptiert. Zur Fundierung dieser Modellvorstellung (Abb. 2) konnten wir die in den folgenden Abschnitten mitgeteilten Befunde beitragen.

RI- und RII-spezifische Polysaccharide

Wie oben gezeigt, sind die Lipopolysaccharide aus R-Formen von *Salmonellen* chemisch sehr uniform. Alle untersuchten R-Lipopolysaccharide bestanden aus den fünf basalen Zuckern KDO, Glucosamin, Heptose, Galaktose und Glucose. Dieser chemischen Uniformität entspricht eine große serologische Uniformität. Die R-Lipopolysaccharide, welche die O-Spezifitäten der Wildformen verloren haben, zeigen untereinander starke serologische Kreuzreaktionen [3,45]. In Hämagglutinations-Hemmungsversuchen [45] zeigte es sich, daß R-Lipopolysaccharide auf Grund ihrer serologischen Reaktivität mit zwei R-Antisera in zwei serologische Gruppen eingeteilt werden können (Tab. 1).

Zur Durchführung der passiven Hämagglutination [46,47] fixiert man vorbehandelte (Hitze oder schwaches Alkali) Lipopolysaccharide an der Oberfläche von Erythrocyten. Inkubiert man die so sensibilisierten Blutkörperchen mit Antisera, die man durch Immunisierung von Kaninchen gegen das betreffende Bakterium herstellt, so werden die Erythrocyten agglutiniert. Diese Reaktion wird gehemmt, wenn man dem agglutinierenden System serologisch identische oder kreuzreagierende Lipopolysaccharide zusetzt, die dann mit

[43] O. Lüderitz, F. Kauffmann, H. Stierlin u. O. Westphal, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 179, 180 (1960).

[44] H. Nikaido, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1542 (1962).

[45] I. Beckmann, O. Lüderitz u. O. Westphal, Biochem. Z. 339, 401 (1964).

[46] E. Neter, Bacteriol. Rev. 20, 166 (1956).

[47] E. Neter, O. Westphal, O. Lüderitz u. E. A. Gorzynski, Ann. N.Y. Acad. Sci. 66, 141 (1956).

Tabelle 1. Serologische Klassifizierung von *Salmonella*-R-Lipopolysacchariden (Hämagglutinationshemmungstest) [45].

R Serogruppen	Lipopolysaccharid aus		Menge Lipopolysaccharid notwendig zur Hemmung der Antikörper gegen	
	<i>Salmonella</i>	Serotyp	<i>S. minnesota</i> RI	<i>S. invernensis</i> RII
I	<i>S. berlin</i>	R	1 bis 8 µg/ml	> 250 µg/ml
	<i>S. bergen</i>	R		
	<i>S. minnesota</i>	R		
	<i>S. worthington</i>	R		
	<i>S. munschau</i>	R		
II	<i>S. typhimurium</i>	R	> 250 µg/ml	0,5 bis 4 µg/ml
	<i>S. hvitvingfoss</i>	R		
	<i>S. invernensis</i>	R		
	<i>S. typhi</i>	R		
	<i>S. minnesota</i>	R		
	<i>S. binza</i>	R		
	<i>S. tel-aviv</i>	R		
	<i>S. weslaco</i>	R		
	<i>S. poona</i>	R		
	<i>S. bareilly</i>	R		
	<i>S. paratyphi C</i>	R		
	<i>S. paratyphi A</i>	R		
	<i>S. newport</i>	R		
	<i>S. aberdeen</i>	R		
	<i>S. greenside</i>	R		
<i>S. deversoir</i>	R			
<i>S. dugbe</i>	R			
<i>S. cerro</i>	R			
<i>S. dahlem</i>	R			
<i>S. djakarta</i>	R			

dem Antiserum reagieren, so daß die Hämagglutination ausbleibt. Diese Hemmungsreaktion ist hochspezifisch und kann mit µg-Mengen an Antigenen durchgeführt werden.

Die erste Gruppe von R-Lipopolysacchariden hemmt das Antiserum, welches mit einer R-Mutante aus *Salmonella minnesota* erhalten worden war (System I); die zweite Gruppe hemmt ein *Salmonella invernensis*-R-Antiserum (System II). Auf Grund ihrer serologischen Spezifitäten konnten die R-Lipopolysaccharide der Serogruppe R I oder R II zugeordnet werden.

Bei den analysierten *Salmonella*-R-Mutanten reduziert sich also die große serologische Vielfalt, wie sie im Kauffmann-White-Schema durch zahlreiche O-Antigenfaktoren (Spezifitäten der S-Formen) und ihre Kombinationen ausgedrückt ist, auf einige wenige R-Spezifitäten.

Zunächst hatten wir angenommen, daß die S→R-Mutation bei einigen *Salmonella*-Species aus unbekanntem Grund zu RI-Mutanten, bei anderen zu RII-Mutanten führen würde, daß also das Ergebnis der Mutation durch Eigenschaften der Wildform festgelegt sei. Dann isolierte *F. Kauffmann* jedoch eine zweite R-Mutante von *Salmonella minnesota*, die sich serologisch von der früher erhaltenen RI-Form unterschied: ihr Lipopolysaccharid ergab die Zugehörigkeit zur RII-Gruppe. Zur gleichen Zeit isolierte auch *B. A. D. Stocker* [48,50] in London RI- und RII-Mutanten von *Salmonella typhimurium*, und seither nehmen wir an, daß jede *Salmonella*-Species prinzipiell Mutation sowohl zu RI als auch zu RII erleiden kann.

In Rekombinationsversuchen mit colicinogenen Stämmen konnten *T. V. Subbaiah* und *B. A. D. Stocker* [48] zeigen, daß bei *S. typhimurium* die Mutation zu R-Mu-

[48] T. V. Subbaiah u. B. A. D. Stocker, Nature (London) 201, 1298 (1964).

tanten der Serogruppe RI am Gen-Ort rou A stattfindet, während bei der Mutation zu RII-Mutanten der Gen-Ort rou B betroffen ist. Die weiteren Versuche ergaben, daß der Locus rou A für die Biosynthese des Kernpolysaccharids, der Locus rou B für die Biosynthese der O-spezifischen Ketten wesentlich ist [49].

Die Erforschung der chemischen Struktur sowie der Biosynthese von RI- und RII-spezifischen (Lipo)Polysacchariden, ihre Beziehung zueinander und zum (Lipo)Polysaccharid der S-Form ist inzwischen von mehreren Arbeitskreisen aufgenommen worden. Wir haben uns vor allem mit der vergleichenden Analyse der S-Form von *Salmonella minnesota* und den daraus isolierten Mutanten *S. minnesota* RI und RII befaßt. *S. minnesota* gehört zur O-Gruppe L. Neben dem Hauptantigen 21 besitzt es den schwach ausgebildeten Faktor 26 [3], welcher auf Grund einer Kreuzreaktion mit Species der Gruppe E₁ (z. B. *S. london*) mit den Faktoren 3, 10 eingeführt wurde. Die Formeln lauten daher: *S. minnesota* 21, 26 und *S. london* 3, 10, 26. Der Faktor 26 wurde nicht in das Kauffmann-White - Schema aufgenommen. *S. minnesota*-Lipopolysaccharid enthält außer den basalen Zuckern Galaktosamin als spezifischen Zuckerbaustein [28].

Zur Aufklärung der chemischen Struktur des O-Antigens und der R-Antigene von *S. minnesota* wurden Partialhydrolysen durchgeführt und Oligo-

Von den aufgeführten RII-Oligosacchariden können fünf Teilstücke zu einem Pentasaccharid rekombiniert werden. Dieses Pentasaccharid hat die Struktur einer N-Acetylglucosaminyl-glucosyl-galaktosyl-glucose mit einem α(1→6) gebundenen Galaktosyl-Rest in der Seitenkette und Glucose als reduzierendem Ende. Die provisorische Formel für das RII-Polysaccharid (Abb. 6, unten) enthält Einheiten dieses Pentasaccharids an Heptose gebunden. Die Formel basiert u. a. auf Untersuchungen von H. Nikaido an anderen Mutanten [52], der ein Glucose-Heptose-Oligosaccharid isoliert hat. Kuriki und Kurahashi [52a] haben kürzlich aus dem Lipopolysaccharid einer Mutante, der UDP-Glucose fehlt, Oligosaccharide isoliert, die aus 10 Heptose-Einheiten und einer (reduzierten) KDO-Einheit bestehen. Damit ist bewiesen, daß ein Teil der Heptosen in glykosidischer Bindung (wahrscheinlich 1 → 2) vorliegt.

Das RI-Polysaccharid

Ein ähnlicher Satz von Oligosacchariden, denen jedoch das terminale N-Acetylglucosamin fehlt, wurde aus dem Partialhydrolysat von *S. minnesota*-RI-Lipopolysaccharid erhalten (Abb. 6). Hieraus läßt sich die Formel des

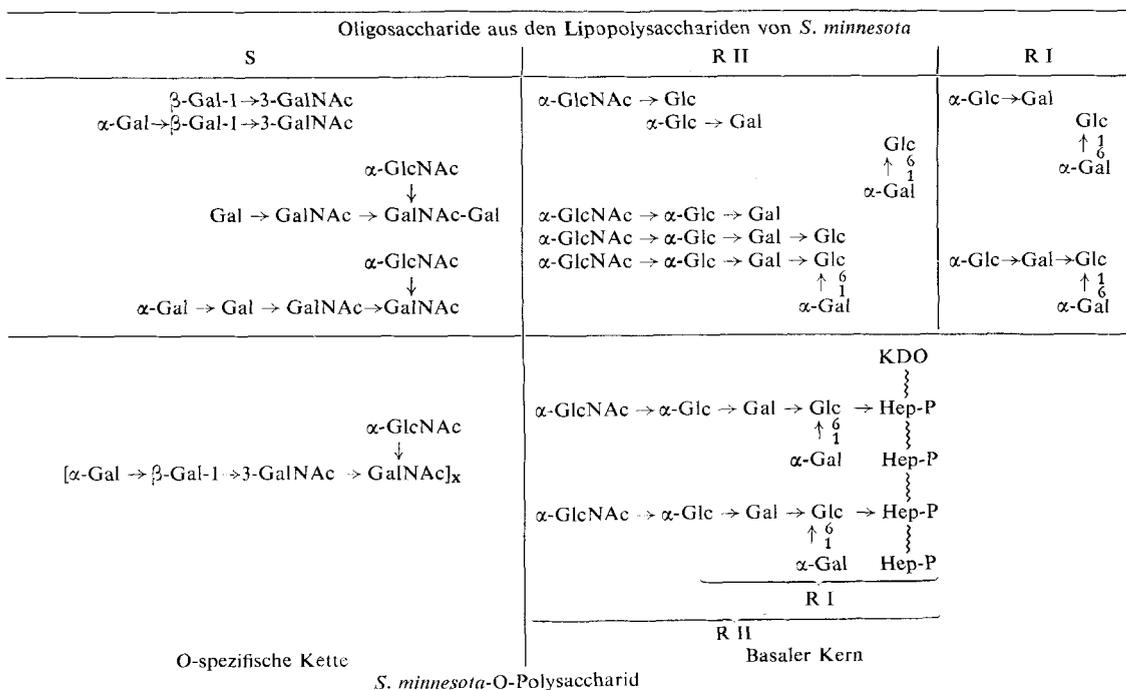


Abb. 6. Mögliche Struktur von Oligosacchariden aus *S. minnesota*-S-, -RI- und -RII-Lipopolysacchariden (oben) sowie hypothetische Formel des O-spezifischen Polysaccharids (unten) [51, 53].

saccharid-Spaltstücke isoliert und analysiert. In Abbildung 6 sind die aus dem RI- und RII- sowie aus dem S-Lipopolysaccharid erhaltenen Oligosaccharide aufgeführt [51].

[49] P. H. Mäkelä, J. gen. Microbiol. 41, 57 (1965).

[50] I. Beckmann, T. V. Subbaiah u. B. A. D. Stocker, Nature (London) 201, 1299 (1964).

[51] I. W. Sutherland, O. Lüderitz u. O. Westphal, Biochem. J. 96, 439 (1965).

RI-Polysaccharids rekonstruieren, welche in Abbildung 6, unten, als Teil der RII-Formel aufgezeichnet ist. Es ergibt sich, daß das RI-Polysaccharid von *S. minnesota* gegenüber demjenigen aus RII lediglich um die terminale nicht-reduzierende Glucosamin-Einheit ärmer ist, oder daß RII aus RI chemisch hervorgeht, wenn man an den nicht-reduzierenden terminalen Glucose-

[52] H. Nikaido, Biochemistry 4, 1550 (1965).

[52a] Y. Kuriki u. K. Kurahashi, J. Biochem. (Tokio) 58, 308 (1965).

Rest in RI die Glucosamin-Einheit anfügt (Abb. 6). Somit verhält sich das RI-spezifische Polysaccharid wie die Vorstufe zur RII-Struktur.

Wir haben auch die Lipopolysaccharide der RII-Mutanten von *S. typhimurium*, *S. inverness* und *S. poona* untersucht. In den Partialhydrolysaten dieser drei RII-Lipopolysaccharide haben wir die gleichen Oligosaccharide wie im *S. minnesota*-RII-Lipopolysaccharid gefunden. Das zeigt, daß RII-Lipopolysaccharide verschiedener Herkunft nicht nur serologisch übereinstimmen, sondern auch chemisch gleichartig zusammengesetzt sind.

Das O-spezifische Polysaccharid der Wildform

Aus dem Lipopolysaccharid der S-Form (Wildform) von *S. minnesota* hat *H. Schulte-Holthausen* in unserem Institut 15 verschiedene basische und neutrale Oligosaccharide isoliert^[53]. Bislang sind jedoch nur die vier in Abbildung 6, links, gezeigten soweit gereinigt worden, daß Analysen durchgeführt werden konnten (Zuckerbestimmungen vor und nach Borhydrid-Reduktion, Morgan-Elson-Reaktion, Spaltversuche mit Glykosidasen). Die wiedergegebenen Formeln sind noch nicht endgültig gesichert, doch spielt α -gebundenes N-Acetylglucosamin sicher die Rolle eines spezifitätsbestimmenden immunodominanten^[11] Zuckers im Antigenfaktor 21^[54], während α -gebundene Galaktose möglicherweise für die Spezifität des Antigenfaktors 26 wesentlich ist^[34]. Die im unteren linken Teil der Abbildung 6 aus den Strukturen der Oligosaccharid-Spaltstücke rekonstruierte Formel ist provisorisch. Wir können jedoch annehmen, daß diese oder ähnliche Oligosaccharide als sich wiederholende Einheiten die langen Ketten des O-Antigens von *S. minnesota* bilden.

Wenn die RI-Struktur eine Vorstufe der RII-Struktur ist, und wenn die RII-Struktur bei allen Salmonellen die gleiche ist, könnte man annehmen, daß das RII-Lipopolysaccharid die ubiquitäre basale Struktur darstellt, an welche die spezifischen Seitenketten mit den sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten gebunden sind, die den S-Formen ihre O-antigene Spezifität verleihen. Dann müßte es möglich sein, durch Partialhydrolyse aus O-antigenen Lipopolysacchariden der Wildformen wenigstens geringe Mengen oligosaccharidischer RI- und RII-Spaltprodukte – entsprechend Abbildung 6 – zu isolieren. Tatsächlich gelang es *H. Schulte-Holthausen*^[53], aus Partialhydrolysaten des Lipopolysaccharids vom *S. minnesota*-O-Antigen neben den O-spezifischen galaktosamin-haltigen Oligosacchariden, drei glucose-haltige Oligosaccharide zu isolieren, die sich als identisch erwiesen mit den glucosamin-haltigen (in Abb. 6 dargestellten) Di-, Tri- und Tetrasacchariden aus dem RII-Lipopolysaccharid. Ähnlich konnte *D. A. R. Simmons* R-spezifische Oligosaccharide aus drei weiteren O-Antigenen von Salmonellen isolieren^[37].

In einer anderen Serie von Experimenten haben wir verschiedene Lipopolysaccharide von *Salmonella*-S-Formen der mil-

[53] *H. Schulte-Holthausen*, Dissertation, Universität Freiburg, in Vorbereitung.

[54] *O. Lüderitz*, *H. R. Risse*, *H. Schulte-Holthausen*, *J. L. Strominger*, *I. W. Sutherland* u. *O. Westphal*, *J. Bacteriol.* 89, 343 (1965).

den Säurehydrolyse unterworfen und die Partialhydrolysate auf ihre Hemmwirkung gegenüber RI- und RII-Antisera in Hämagglutinations-Hemmungstest geprüft^[55]. Dabei ergab sich, daß auch von den Lipopolysacchariden höherer Chemotypen im Lauf der Hydrolyse RI-spezifische Strukturen freigelegt werden. RII-Strukturen konnten auf diese Weise nicht nachgewiesen werden, vermutlich weil die RII-Struktur gegen Säure empfindlicher ist als die RI-Struktur. Bemerkenswert ist, daß bei der Partialhydrolyse eines serologisch kreuzreagierenden *Coli*-Stamms (Vergleich von *Salmonella adelaide* mit *E. coli* O111, deren O-Antigene chemotypisch identisch sind: Basalzucker plus Colitose^[56]) zu keiner Zeit RI- oder RII-Strukturen serologisch nachweisbar wurden^[55]. Ob der Aufbau von *Coli*-Polysacchariden prinzipiell von dem der *Salmonella*-Polysaccharide verschieden ist, muß durch Versuche an weiteren *Coli*-Stämmen geklärt werden. Immerhin gibt es einige *Coli*-O-Antigene, welche keine Galaktose enthalten^[31, 32], oder auch einige Shigellen ohne Glucose^[57], die bei Salmonellen zu den basalen Zuckern gehören und an den RI- und RII-Strukturen teilhaben (Abb. 2 und 6).

Die oben geschilderten Ergebnisse sprechen dafür, daß das RII- (und RI)-Polysaccharid bei Salmonellen eine unterliegende Struktur und ein Bestandteil des jeweiligen O-antigenen Lipopolysaccharids der Wildform (S-Form) ist.

Biochemische Untersuchungen an R-Mutanten

Auf Grund von Untersuchungen über Verlustmutanten bei Salmonellen, welche insbesondere *H. Nikaido* et al.^[44, 58] in Boston durchgeführt haben, konnte angenommen werden, daß bei der S→R-Mutation in den resultierenden RII- und RI-spezifischen *Salmonella*-Stämmen Enzymdefekte eintreten. Ein erster Einblick in den Mechanismus der S→RII- und S→RI-Mutation bei *S. minnesota* wurde erhalten, als wir die drei Stämme S, RII und RI hinsichtlich ihrer Enzymausrüstung prüften, welche für die Biosynthese des O-Antigens der S-Form notwendig ist.

Die Biosynthese der O-spezifischen Polysaccharide verläuft nach bisherigen Kenntnissen in zwei Stufen: die aktivierten Monosaccharide werden in Form ihrer Nucleosiddiphosphat-Derivate synthetisiert. Die daran beteiligten Enzyme faßt man als Synthetasen zusammen. In zweiter Stufe werden die Zuckerreste durch spezifische Transferasen auf das wachsende Polysaccharid übertragen^[59–61].

Das *S. minnesota*-O-Antigen enthält außer den basalen Zuckern zusätzlich Galaktosamin, und dieser Zucker ist es, der als einziger in den Lipopolysacchariden der R-Mutanten fehlt.

Galaktosamin wird in den Bakterien aus Glucosamin unter der Wirkung einer 4-Epimerase gebildet, welche UDP-N-

[55] *O. Lüderitz*, *I. Beckmann* u. *O. Westphal*, *Biochem. Z.* 339, 416 (1964).

[56] *O. Westphal*, *F. Kauffmann*, *O. Lüderitz* u. *H. Stierlin*, *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig.* 179, 336, (1960).

[57] *W. T. J. Morgan*, *Helv. chim. Acta* 21, 469 (1938); *D. A. L. Davies*, *W. T. J. Morgan* u. *R. R. Record*, *Biochem. J.* 60, 290 (1955).

[58] *H. Nikaido*, *K. Nikaido*, *T. V. Subbaiah* u. *B. A. D. Stocker*, *Nature (London)* 201, 1301 (1964).

[59] *L. F. Leloir*, *Biochem. J.* 91, 1 (1964).

[60] *V. Ginsburg*, *Adv. Enzymology* 26, 35 (1964).

[61] *M. J. Osborn*, *S. M. Rosen*, *L. Rothfield*, *L. D. Zeleznick* u. *B. L. Horecker*, *Science (Washington)* 145, 783 (1964).

Acetylglucosamin in UDP-N-Acetylglaktosamin umwandelt. Wir haben dieses Enzym in der S-Form und in den beiden R-Formen von *S. minnesota* bestimmt^[54] (Abb. 7). Dazu wurde [¹⁴C]-UDP-N-Acetylglucosamin dargestellt und mit zellfreiem Extrakt aus S- und R-Zellen inkubiert. Entsprechende Proben dienten als Kontrolle. Die Ansätze wurden anschließend hydrolysiert, die freien N-Acetylhexosamine auf borat-behandeltem Papier chromatographisch getrennt und die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Es wurde gefunden, daß Inkubation von radioaktivem UDP-N-Acetylglucosamin mit S- und RI-Extrakt zur Bildung von Galaktosamin führt, während im RII-Extrakt kein Galaktosamin entsteht. Der RII-Stamm ist daher eine Mutante, der die UDP-Acetylglucosamin-4-Epimerase fehlt. Wir nehmen an, daß das Unvermögen, Galaktosamin in Form von UDP-N-Acetylglaktosamin zu synthetisieren, die Ursache für den Syntheseblock am Zellwandpolysaccharid ist, so daß dessen Biosynthese auf der Stufe der RII-Struktur stehen bleibt.

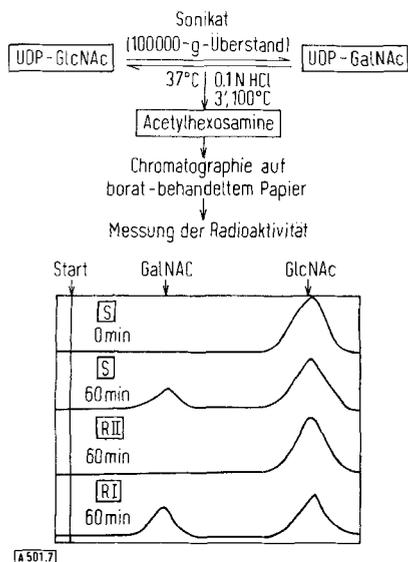


Abb. 7. Nachweis von UDP-N-Acetylglucosamin-4-Epimerase in *S. minnesota*-S-, -RI- und RII-Formen [54].

Andere RII-Mutanten, welche ebenfalls durch einen Defekt in der Synthese eines Zuckers der Seitenkette im O-Antigen charakterisiert sind, konnten aus *S. typhimurium*-Kulturen isoliert werden, so etwa eine Mutante, die TDP-Rhamnose nicht bilden kann^[58], und eine Mutante, die keine GDP-Mannose bildet^[61,62].

Die RI-Mutante von *S. minnesota* enthält dagegen UDP-Acetylglucosamin-Epimerase und kann daher Galaktosamin bilden. Jedoch wird hier Galaktosamin in das Zellwand-Lipopolysaccharid nicht eingebaut, weil durch tieferliegenden Biosyntheseblock (RI erscheint als Vorstufe von RII) das Substrat für den Galaktosamin-Einbau nicht vollständig synthetisiert wird.

Das O-spezifische Polysaccharid-Hapten in RI-Mutanten

Ein weiterer wichtiger Befund war die Entdeckung von O-spezifischem Polysaccharid in RI-Mutanten durch *I. Beckmann*^[50] an unserem Institut.

Zur Gewinnung der Lipopolysaccharide werden die Zellen meist mit Phenol/Wasser extrahiert^[17] (Abb. 8)

[62] L. D. Zeleznick, S. M. Rosen, M. Saltmarsh-Andrew, M. J. Osborn u. B. L. Horecker, VI. Internat. Congr. Biochem., New York 1964, Abstr. VI/Y125.

und der wäßrige Rohextrakt anschließend bei 100000 g zentrifugiert. Das Lipopolysaccharid wird als Sediment erhalten, während sich im Überstand hauptsächlich Nucleinsäure befindet. Bei der Aufarbeitung des Überstandes eines Extraktes aus *S. typhimurium* RI fand *I. Beckmann*^[50] ein Polysaccharid, welches die für das O-antigene Lipopolysaccharid der Wildform charakteristischen Zucker Mannose, Rhamnose und Abequose (siehe Abb. 3, Chemotyp XIV), jedoch keine Heptose, enthielt und das mit *S. typhimurium*-O-Antiserum spezifisch präzipitierte. Während das RI-Bakterium an der Zelloberfläche also nur die serologische RI-Spezifität erkennen läßt, bildet es zusätzlich ein relativ niedermolekulares Polysaccharid mit der O-Spezifität der Wildform.

Als *S. minnesota*-RI-Zellen nach Phenol/Wasser-Extraktion aufgearbeitet wurden, ergab die Analyse des in der Ultrazentrifuge erhaltenen Überstandes des wäßrigen Extraktes die Anwesenheit beträchtlicher Mengen von gebundenem Galaktosamin in undialysierbarer Form. Dieser Zucker fehlt im Lipopolysaccharid der RI-Mutante vollständig und ist spezifisch für die Seitenkette des Lipopolysaccharids der O-antigenen Wildform. Es konnte gezeigt werden^[54], daß Galaktosamin hier in der Tat Baustein eines Polysaccharids mit der O-Spezifität der *S. minnesota*-Wildform ist, welches mit *S. minnesota*-O-Antiserum präzipitiert.

Man findet also bei RI-Mutanten von Salmonellen verschiedener Serogruppen (B und L) R-Lipopolysaccharide in der Zellwand und darüberhinaus ein O-spezifisches Polysaccharid. Dieses Polysaccharid, welches vermutlich die isolierte Seitenkette des O-Antigens darstellt, ist für sich am Kaninchen nicht antigen, also ein typisches Hapten. – Bei RII-Zellen ist ein O-spezifisches Polysaccharid-Hapten dagegen niemals gefunden worden.

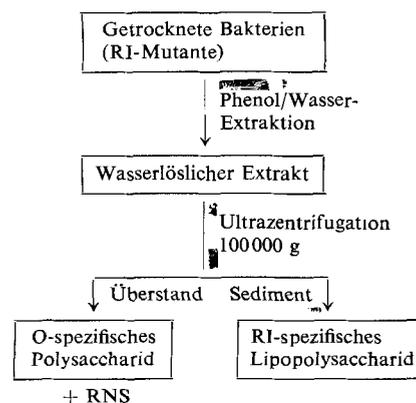


Abb. 8. Schema der Phenol/Wasser-Extraktion von RI-Mutanten [17,50]

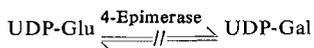
Daraus kann man schließen, daß bei RI-Mutanten ein Defekt in der Biosynthese der kompletten RII-Struktur vorliegt. Die RII-Struktur erscheint als Substrat für den Einbau der O-spezifischen Seitenketten, d. h. der sich wiederholenden O-spezifischen Oligosaccharid-Einheiten. Bei RII-Mutanten liegt offenbar ein Block in der Biosynthese eines der Zucker der Seitenkette oder in seiner Übertragung vor. In RI-Mutanten ist die Fähigkeit zur Bildung der spezifischen Seitenketten

erhalten, doch fehlt das notwendige Substrat – die komplette RII-Struktur (Abb. 6) mit terminalem N-Acetylglucosamin –, so daß die Seitenketten zwar synthetisiert, aber nicht in das Zellwand-Lipopolysaccharid eingebaut werden, da dessen Biosynthese nach Erreichung der RI-Struktur aufhört.

Weitere R-Formen

Wenn die geschilderten Vorstellungen über die S→R-Mutation bei Enterobacteriaceen richtig sind, so muß gefordert werden, daß neben RII- und RI-Mutanten weitere Mutanten existieren, welche sich von den beschriebenen durch ein noch unvollständigeres R-Antigen (R-Lipopolysaccharid), also durch Syntheseblock auf einer noch früheren Stufe unterscheiden. Das vollständige bakterielle Zellwand-Lipopolysaccharid wird ja in vielen Syntheseschritten aufgebaut, an denen zahlreiche Synthetasen und Transferasen beteiligt sind. Die Bildung jedes dieser Enzyme ist genetisch kontrolliert, und prinzipiell kann jedes Enzym durch eine Mutation betroffen sein. So sollte es theoretisch möglich sein, jede Stufe der (Lipo)Polysaccharid-Biosynthese durch Isolierung einer Mutante nachzuweisen, die gerade auf dieser Stufe durch einen Enzymdefekt blockiert ist. Tatsächlich sind vor einigen Jahren, besonders von japanischen Forschern, einige derartige Verlustmutanten von *S. typhimurium* beschrieben worden.

So hat zuerst *H. Nikaido* [44,63,64], basierend auf Untersuchungen von *H. Kalckar et al.* [65,66], eine Mutante beschrieben, der die UDP-Galaktose-4-Epimerase fehlt und die daher auf Glucose-Nährboden keine Galaktose bilden kann, weil die Reaktion



blockiert ist. Bei dieser M-Mutante hört die Biosynthese des Zellwand-Lipopolysaccharids da auf, wo (bei der Wildform) der erste Einbau von Galaktose erfolgt. Die Lipopolysaccharide der M-Mutante enthalten nur (Lipoid)-Glucosamin, KDO, Heptose und Glucose. – Später beschrieben *T. Fukasawa et al.* [67] eine Mutante, bei welcher der Übergang von Glucose-1-phosphat in UDP-Glucose durch Ausfall des Enzyms UDP-Glucose-Pyrophosphorylase blockiert ist. Diese Mutante bildet lediglich die Heptosephosphat-Grundkette mit KDO und Lipoid A, und schon der Einbau von Glucose ist gestoppt, weil die Zelle keine aktivierte Glucose synthetisieren kann.

Mutanten ohne UDP-Galaktose-4-Epimerase (M-Mutanten) oder ohne UDP-Glucose-Pyrophosphorylase sind später aus Kulturen von *Salmonella*- (und *E.coli*-) Species isoliert worden, so daß angenommen werden kann, daß ebenso wie RII- und RI-Mutanten auch diese Verlustmutanten prinzipiell aus jeder *Salmonella*-Species hervorgehen können.

[63] *T. Fukasawa u. H. Nikaido*, Nature (London) 184, 1168 (1959).

[64] *H. Nikaido*, Proc. nat. Acad. Sci. 48, USA 1337 (1962).

[65] *T. A. Sundararajan, A. M. C. Rapin u. H. M. Kalckar*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 2187 (1962).

[66] *H. M. Kalckar*, Science (Washington) 150, 305 (1965).

[67] *T. Fukasawa, K. Jokura u. K. Kurahashi*, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 121 (1962).

Gemeinsam mit *J. Schlosshardt* [68] haben wir in den letzten Jahren versucht, aus *Salmonella minnesota* möglichst viele Mutanten zu isolieren und zu analysieren, um möglichst viele Zwischenstufen der Biosynthese des O-Antigens (Lipopolysaccharid der Wildform) zu erfassen. In die Untersuchungen wurde *S. ruru* (Antigenfaktor 21) einbezogen, welche zum gleichen Chemotyp und Serotyp gehört wie *S. minnesota*.

Zur Isolierung von Mutanten wurde synthetisches Medium, welches Citrat und Ammoniak bei pH = 8,2 enthielt, mit *S. minnesota* oder *S. ruru* angeimpft und bei 37 °C bebrütet. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben auf Agar überimpft und raue Einzelkolonien zur weiteren Kultivierung ausgesucht. Nach 5 Tagen waren fast alle Kolonien rau. Bei den bakteriologischen Untersuchungen bestand die prinzipielle Schwierigkeit, neue Mutanten mit noch unbekanntem Eigenschaften zu isolieren. *J. Schlosshardt* hat die Sensibilität von R-Stämmen gegenüber Phagen ausgenutzt, um R-Mutanten zu differenzieren. Sie versuchte, möglichst viele R-Stämme unterschiedlicher Phagensensibilität zu isolieren, in der Hoffnung, daß einige der Phagen strukturell verschiedene

Chemotyp	Stamm	%im Lipopolysaccharid							Hämagglutinationssystem														
		Lipoid A	KDO	Heptose	Glucose	Galaktose	GNAC (PS) [★]	GalNAc	S	S•	1	RII	RI	2	2•	62	1•	3	4	3•	7	595	
II	S	+	5	3	4	13	10	17	⊗	○													
	S•	+	4	4	3	15	10	17	⊗	⊗													
II	1	+	10	5	1	5	10	14	○	○	⊗											○	
	608	+	8	7	2	18	n.b.	14	○	○													
	46	+	4	9	3	15	10	16	○	○													
	1001	+	5	12	4	11	n.b.	8	○	○													
	61	50	8	10	3	6	3	4	○	○	○				○	○	○						
2•	+	10	17	2	2	n.b.	4	○	○				⊗								○		
Ra	RII	+	5	7	6	8	6				⊗												
	555	45	9	11	3	6	2				○	○										○	
Rb	708	47	10	11	4	5	2				○	○											
	RI	+	5	10	4	9			○	○		⊗											
Rc	2	50	7	14	3	4						⊗											
	592	53	9	10	5	4						○	○	○	○	○							
Rd	5	+	8	11	5						○	○	○	○	○	○						○	
	8	+	10	6	4						○	○	○	○	○	○						○	
	62	52	9	10	4						○	○	○	⊗	○							○	
Re	1•	+	8	15	2																	○	
	541•	52	+	17																		○	
	3	63	9	7																		⊗	
	4	+	8	7																		⊗	
Re	3•	+	9	6																		⊗	
	597	+	11	5																		○	
	7	58	9	13																		⊗	
Re	1000	+	16																			○	
	128•	64	16																			○	
	595	+	16																			⊗	
	6/3	65	17																			○	

[A 501.9]

Abb. 9. Chemische und serologische Klassifizierung der R-Mutanten von *Salmonella minnesota* und *Salmonella ruru* [68]. Stämme, die hinter der Nummer einen Punkt haben, wurden aus *S. ruru* isoliert. Die übrigen stammen von *S. minnesota*.

+ = anwesend, aber nicht quantitativ bestimmt.

n.b. = nicht bestimmt.

[★] = Die Glucosaminbestimmungen wurden an den Polysacchariden, nach Abtrennung von Lipoid A, durchgeführt.

Hämagglutinationsysteme: alkali-behandeltes Lipopolysaccharid, an Erythrocyten fixiert, und homologes Serum.

Kreuze bedeuten: Hemmung des Hämagglutinationsystems durch das Lipopolysaccharid (welches aus dem links angegebenen Stamm isoliert wurde). Beispiel: *S. minnesota*-R3-Lipopolysaccharid (Block Rd, Zeile 2) hemmt die Systeme: *S. minnesota* R3 (homologes System, durch Kreuz markiert), *S. minnesota* R4 und *S. ruru* R3.

In der letzten Zeile der zweiten Spalte lies 613 statt 6/3.

[68] *O. Lüderitz, C. Galanos, H. J. Risse, E. Ruschmann, S. Schlecht, G. Schmidt, H. Schulte-Holthausen, R. Wheat, O. Westphal u. J. Schlosshardt*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966, im Druck.

R-Lipopolysaccharide an der Zelloberfläche als Rezeptor benötigen und daher verschiedene R-Klassen zu unterscheiden gestatten.

Etwa 30 mutierte Stämme wurden isoliert^[68], welche sämtlich die Geiselantigene (H-Antigene) und die Fermentationseigenschaften des Ausgangskeims besaßen. Die Lipopolysaccharide wurden mit Phenol/Wasser extrahiert und ihre Zuckerbausteine identifiziert und quantitativ bestimmt. Die Mutanten wurden dann auf Grund der Zuckerzusammensetzung ihrer Lipopolysaccharide chemotypisch klassifiziert (Abb. 9).

Durch Injektion der hitzegetöteten Keime wurden bei Kaninchen Antiseren hergestellt. Wiederum haben wir Hämagglutinations-Hemmungsteste (vgl. Abb. 6) benutzt, um serologische Kreuzreaktionen der R-Lipopolysaccharide zu ermitteln. Die Ergebnisse sind im rechten Teil der Abbildung 9 aufgeführt. Man sieht, daß Mutanten zahlreicher Chemotypen (Ra–Re) gefunden wurden^[11]. In Abbildung 9 werden die Lipopolysaccharide dieser Mutanten von oben nach unten immer zuckerärmer. In jeder folgenden Gruppe (Chemotyp) ist ein weiterer Zuckerbaustein abwesend. Am untersten Ende der Abbildung 9 enthalten die R-Antigene des Chemotyps Re keine Hexosen und auch keine Heptose mehr, und als Bausteine konnten nur noch Lipoid A und Ketodesoxyoctonsäure (KDO) identifiziert werden, welche zusammen mindestens 80–90 % der erhaltenen Substanz ausmachen.

Man erkennt, daß die chemisch klassifizierten Mutanten auch serologisch Gruppen bilden, und Ähnliches trifft für das Phagenmuster der verschiedenen Gruppen zu^[68]. Diese Parallelität zwischen chemischer Zusammensetzung, serologischer Spezifität und Phagensensibilität mag darauf hindeuten, daß auch in den Mutanten die teilweise sehr unvollständigen Lipopolysaccharide als determinante Gruppen bei der Antikörperbildung wie auch als Phagenrezeptoren fungieren können.

Tatsächlich sind mit den aufgefundenen R-Mutanten viele Zwischenstufen der Biosynthese des *S. minnesota*-O-Antigens nachgewiesen worden. Dies macht die Abbildung 10 deutlich, welche Lipopolysaccharid-Strukturen enthält, die – sofern unsere Konzeption richtig ist – im Laufe der Biosynthese der O-Antigene durchlaufen werden. Einzelheiten dieser Strukturen, welche den innersten Teil des basalen Kernpolysaccharids darstellen, müssen noch ermittelt werden. Wir hoffen, daß die neu entdeckten R-Stämme und ihre R-Lipopolysaccharide die Strukturaufklärung erleichtern werden.

Von besonderem Interesse sind die heptose-haltigen (jedoch hexose-freien) und die heptose-freien Lipopolysaccharide. Es ist möglich, daß Heptose in den Rd-Mutanten ein spezifitätsbestimmender Zucker ist. Wir wissen nicht, welche Gruppierungen in den heptose-freien Mutanten Träger der serologischen Spezifität sind. Das gleiche gilt für die Phagenrezeptoren. Die heptose-freien Mutanten werden besonders geeignet sein, den Anabolismus und die Aktivierung der Heptose zu untersuchen, worüber bislang noch sehr wenig bekannt ist. Heptose in der basalen Grundkette der *Salmonella*-Lipopolysaccharide wurde als L-Glycero-D-mannoheptose identifiziert^[69, 70].

[69] G. Bagdian, W. Dröge, K. Kotelko, O. Lüderitz u. O. Westphal, *Biochem. Z.* 1966, im Druck.

[70] M. J. Osborn, S. M. Rosen, L. Rothfield u. B. L. Horecker, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 1831 (1962).

Von besonderem Interesse sind die beschriebenen Mutanten für das Studium der biologischen Wirkungen von bakteriellen Lipopolysacchariden (Endotoxinen), insbesondere für die Suche nach aktiven Strukturen. In den Lipopolysacchariden der Enterobacteriaceen ist der Polysaccharidteil für die serologische Spezifität verantwortlich. Außerdem mag er die Rolle eines wasserlöslichen Trägers spielen und insofern für die unspezifischen, endotoxischen Wirkungen indirekt von Bedeutung sein. Wir haben jedoch vermutet, daß das in allen Lipopolysacchariden enthaltene Lipoid A für die endotoxischen Eigenschaften der wesentliche Faktor ist. Nakano^[71] hat kürzlich gezeigt, daß Lipopolysaccharide aus M-Mutanten (vgl. Abb. 10) – mit nur Lipoid A,

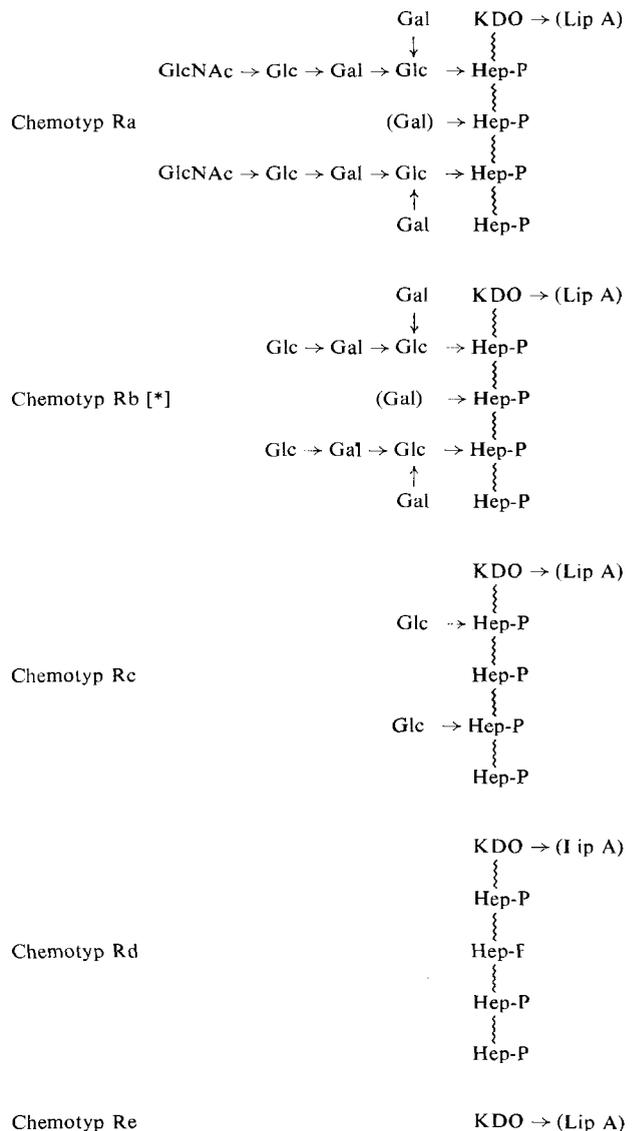


Abb. 10. Mögliche Strukturen der aus R-Mutanten isolierten Polysaccharide (Zwischenstufen bei der Biosynthese von O-spezifischen Polysacchariden).

[*] Die hier dargestellte Struktur ergibt sich aus der Analyse des RI-Polysaccharids von *S. minnesota*. Es ist zu erwarten, daß zwischen der Rb- und der angegebenen Rc-Struktur noch intermediäre Stufen existieren, die alle dem Chemotyp Rb angehören (d. h. aus Lipoid-A-Glucosamin, KDO, Heptose, Galaktose und Glucose bestehen). Siehe z. B. I. W. Sutherland et al. [51].

[71] M. Nakano, *Nature (London)* 196, 1118 (1962).

KDO, Heptose und Glucose – die gleiche Toxizität wie die Lipopolysaccharide der zugehörigen Wildform mit komplettem O-spezifischem Polysaccharid zeigen. Lipoid A kann nur durch Säurehydrolyse aus Lipopolysacchariden gewonnen werden, wobei mehr oder weniger große Aktivitätsverluste nicht zu vermeiden sind. Bei allzu schonender Hydrolyse ist andererseits keine Gewähr dafür gegeben, daß nicht noch Reste der Polysaccharid-Komponente am Lipoid gebunden bleiben. Extrakte aus Re-Mutanten (Abb. 10), welche nur noch Lipoid A und KDO – mit einem Lipoid-A-Gehalt von >70% – enthalten und frei von Heptose und Hexosen sind, scheinen geeignet, die Frage der Bedeutung der Lipoid-A-Komponente und der Polysaccharid-Komponente für die endotoxischen Wirkungen erneut aufzugreifen.

Wir haben, gemeinsam mit E. Eichenberger in den Wander-Laboratorien in Bern/Schweiz, die pyrogene Aktivität zweier extremer Lipopolysaccharide geprüft: des Lipopolysaccharids der S-Form und der Re-Mutante von *S. minnesota*. Die Abbildung 11 zeigt, daß beide Präparate am Kaninchen (intravenöse Applikation) etwa gleich starkes Fieber erzeugen.

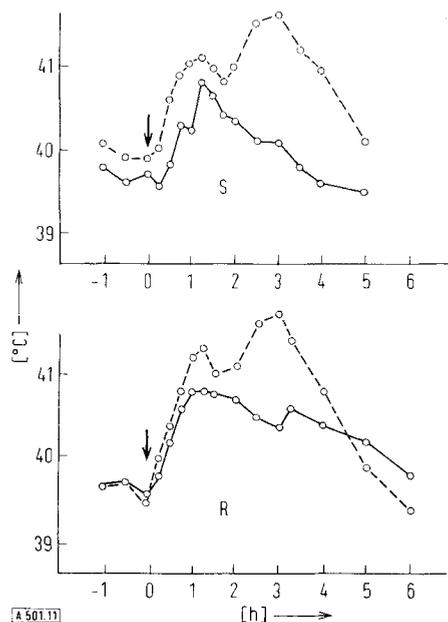


Abb. 11. Pyrogenität von *S. minnesota*-S- (oben) und R- (unten) Lipopolysacchariden in Kaninchen (E. Eichenberger).
 O—O: 0,1 µg/kg.
 O---O: 1 µg/kg.
 Ordinaten: Körpertemperatur [°C].
 Abszissen: Stunden nach der Applikation.
 Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Applikation.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis von Toxizitätsbestimmungen an der Maus (intraperitoneale Applikation) wiedergegeben. Die LD₅₀ für das Lipopolysaccharid der S-Form von *S. minnesota* beträgt ca. 250 µg/Maus. Der Lipoid-A-KDO-Komplex aus der R-Mutante ist zwar schwächer wirksam (ca. 1/4 der Wirksamkeit des Wildform-Lipopolysaccharids), aber auch hier ist das „polysaccharid-freie“ Lipoid A endotoxisch aktiv, wobei noch berücksichtigt werden muß, daß das Präparat nur mäßig wasserlöslich ist. Ähnliche Ergebnisse wurden von D. Tripodi und A. Nowotny^[79] mit unseren R-Lipopolysacchariden erhalten.

Tabelle 2. Letale Toxizität von *S. minnesota*-S- und -R-Lipopolysacchariden in Mäusen [68]. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten Zahl der gestorbenen Mäuse/Zahl der insgesamt verwendeten Mäuse.

Lipopolysaccharide aus	Injizierte Mengen pro Maus				
	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg
<i>S. minnesota</i> S-Form	0/16	11/20	19/26	16/16	
<i>S. ruru</i> S-Form	1/10	7/10	7/10	7/10	
<i>S. minnesota</i> RII			7/10	7/10	10/10
<i>S. minnesota</i> RI			8/10	10/10	10/10
<i>S. minnesota</i> R3			1/10	3/10	10/10
<i>S. minnesota</i> R4			2/10	8/10	8/10
<i>S. minnesota</i> R595	0/6		2/26	9/26	11/20
<i>S. minnesota</i> R613			0/10	2/10	9/10

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß für die endotoxischen Wirkungen am Tier die Polysaccharid-Komponente der bakteriellen Lipopolysaccharide wenig oder keine Bedeutung hat, es sei denn als Löslichkeitsvermittelnder Träger. Vielmehr scheint das Lipoid A zumindest für einige endotoxische Wirkungen wesentlich zu sein.

Intermediär-Formen

Semi-R-Mutanten

Wenn die Konzeption richtig ist, daß in Lipopolysacchariden von *Salmonella*-S-Formen die sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten der spezifischen Seitenketten am terminalen N-Acetylglucosamin der RII-Struktur (Kernpolysaccharid) gebunden sind (Abb. 6 u. 12), so ist die Bindungsart der ersten Oligosaccharid-Einheit verschieden von der aller folgenden. Die sich wiederholenden Einheiten vieler *Salmonella*-Lipopolysaccharide bestehen aus (Mannose → Rhamnose → Galaktose →)-Oligosacchariden (Abb. 4 und 12), wobei die Galaktose der ersten Einheit (in Abb. 12 als Gal I bezeichnet) an N-Acetylglucosamin der RII-Struktur, die Galaktose der zweiten Einheit (Gal II), wie alle weiteren Galaktose-Reste, dagegen an die Mannose der vorhergehenden Einheit gebunden ist. Mithin ist die Gal(I)-Transferase, welche zum Einbau der Galaktose der ersten Einheit führt, verschieden von der Gal(II)-Transferase, die am Einbau der Galaktose-Reste aller weiteren Einheiten beteiligt ist. Man könnte also erwarten, daß *Salmonella*-Mutanten existieren, deren Gal(II)-Transferase blockiert ist. Solche Mutanten sind von Y. Naide, H. Nikaido, P. H. Mäkelä, R. G. Wilkinson und B. A. D. Stocker^[72] in letzter Zeit tatsächlich aus *S. typhimurium*-Kulturen isoliert worden. Sie wurden als semi-rough oder SR-Mutanten bezeichnet. Der SR-Stamm von *S. typhimurium* wächst in Kolonieförmigen zwischen rau und glatt. Die Zellen werden von Anti-O-Seren agglutiniert, aber nicht so stark wie die Wildform; O-Phagen lysieren dagegen nicht. Das Lipopolysaccharid enthält im Gegensatz zur Wildform relativ geringe Mengen Mannose, Rhamnose und Abequose. Charakteristisch ist auch das Ergebnis der Partialhydrolyse, bei der das SR-Lipopolysaccharid im Gegensatz zur Wildform nur ein Disaccharid mit reduzierender Rhamnose, nämlich Mannosyl-rhamnose, liefert^[40].

[72] Y. Naide, H. Nikaido, P. H. Mäkelä, R. G. Wilkinson u. B. A. Stocker, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 147 (1965).

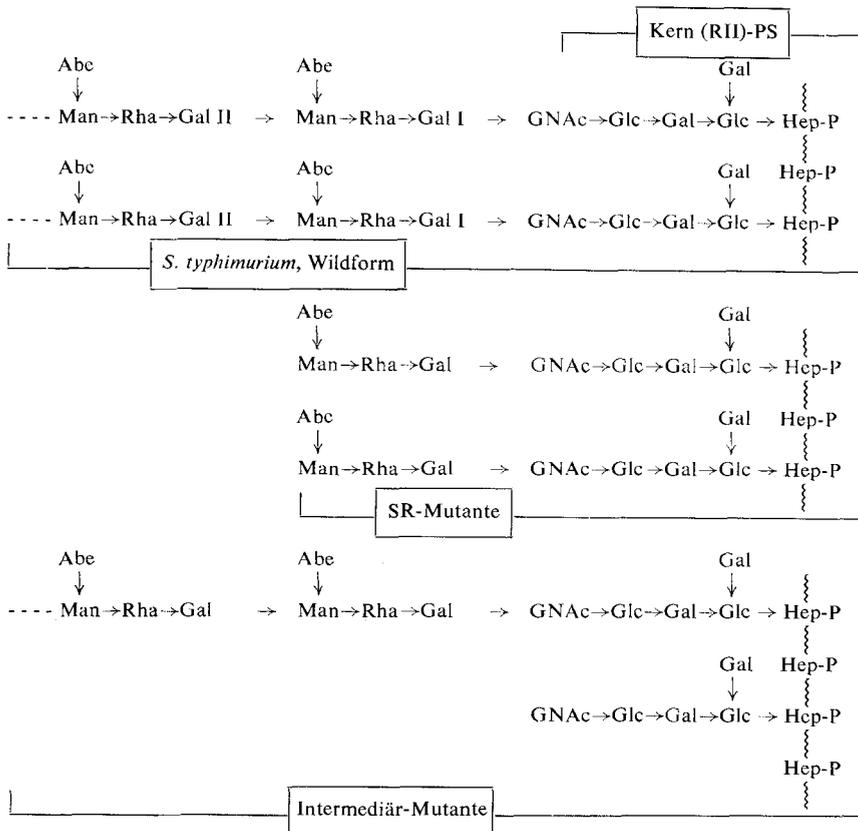


Abb. 12. Vorgeschlagene Strukturen von Polysacchariden aus *S. typhimurium* (Wildform) sowie aus SR- und Intermediär-Mutanten [72].

Andere Intermediär-Mutanten

Die gleichen Autoren haben bei *S. typhimurium* eine andere Klasse von Mutanten entdeckt [42, 72], deren Lipopolysaccharid analytisch die gleiche Zusammensetzung wie die SR-Mutante besitzt, d. h. wenig Mannose, Rhamnose und Abequose enthält. Diese Mutante wird zum Unterschied zur SR-Mutante von O-Phagen lysiert, sie wird von Anti-O- und Anti-R-Seren agglutiniert, und aus dem Partialhydrolysat des Lipopolysaccharids kann man die gleichen Oligosaccharide (mit reduzierender Rhamnose) wie aus Wildform-Lipopolysaccharid isolieren. Auf Grund dieser Eigenschaften wird für dieses Antigen die im unteren Teil der Abbildung 12 wiedergegebene Formel vorgeschlagen; an den RII-Kern sind hier wenige aber vollständige O-spezifische Ketten gebunden. Der enzymatische Defekt, der zu einer solchen Mutante führt, ist noch nicht mit Sicherheit bekannt.

T-Formen

Wir beschäftigen uns seit einiger Zeit mit einer dritten Klasse von intermediären *Salmonella*-Mutanten, welche von F. Kauffmann [3, 73] vor etwa 10 Jahren entdeckt und als „transient“ oder T-Formen bezeichnet wurden. Sie haben einerseits, wie R-Formen, die O-Spezifität der Wildform verloren und enthalten nicht die spezifischen Zucker der Seitenkette, sie wachsen aber andererseits, wie die Wildform, in glatter Kolonieförmigkeit (S-Form). Serologisch sind sie durch T-Spezifität charakterisiert, [73] F. Kauffmann, Acta pathol. microbiol. scand. 39, 299 (1956).

d. h. sie reagieren spezifisch mit Anti-T-Seren. Diese T-Mutanten beanspruchen besonderes Interesse: wir fanden [29, 68, 74], daß ihr Lipopolysaccharid einen Zucker enthält, der weder im Lipopolysaccharid der Wildform noch in dem der R-Form Baustein ist. Während alle bisher untersuchten *Salmonella*-Mutanten sich als Verlustmutanten erwiesen und ihr Lipopolysaccharid im Vergleich zur Wildform weniger Zuckerbausteine enthält, zeigt sich, daß T-Formen in ihrem Lipopolysaccharid große Mengen Ribose haben.

In Tabelle 3 ist die Analyse verschiedener T-Lipopolysaccharide aufgeführt. Sie enthalten alle die basalen Zucker; darüber hinaus sind 14–22% Ribose und ebensoviel Galaktose vorhanden [74]. Ribose liegt nicht als Nucleosid vor (keine Absorption bei 260 m μ). Daß Ribose und Galaktose nicht ein separates Polysaccharid bilden, sondern an das T-Polysaccharid gebunden sind, konnten wir durch spezifische Präzipitation wahrscheinlich machen [74]. Wird T-Lipopolysaccharid durch spezifisches Anti-T-Serum präzipitiert, so findet sich die Ribose quantitativ im Präzipitat. Nach Behandlung mit

Tabelle 3. Zusammensetzung von Lipopolysacchariden, die aus verschiedenen *Salmonella*-T1-Mutanten isoliert wurden [74].

	KDO %	Hep %	Glc %	GlcN %	Gal %	Rib %
<i>S. typhimurium</i> T 1	4,0	7,1	4,8	5,9	20,8	14,9
<i>S. paratyphi</i> B T 1	4,1	4,2	6,9	5,7	13,6	16,4
<i>S. dessau</i> T 1	3,8	7,3	4,6	5,7	20,8	13,8
<i>S. friedenaui</i> T 1	3,6	5,3	4,4	6,3	18,4	22,2
	4,2	7,5	4,6	6,2	18,0	17,1

[74] R. W. Wheat, O. Lüderitz, E. Ruschmann u. O. Westphal, unveröffentlicht.

Alkali präzipitiert das gleiche Antiserum ein Polysaccharid ohne Ribose. Zur Zeit werden Partialhydrolysen durchgeführt mit dem Ziel, Oligosaccharide zu isolieren und zu analysieren, vor allem um die Beziehung zu S- und R-Antigenen zu erforschen. T-Formen mutieren relativ leicht zu R-Formen. Neben T-Formen gibt es *Salmonella*-Serogruppen (M, 52, 56; siehe Abb. 3), welche O-antigene Lipopolysaccharide bilden, die Ribose als Baustein der spezifischen Seitenketten enthalten [28, 29].

Schlußbetrachtung

Die Analyse von Lipopolysacchariden aus enterobakteriellen Wildformen (S-Formen) und ihren zahlreichen Verlustmutanten (SR- und R-Formen) hat es ermöglicht, die Struktur der komplexen Heteropolysaccharid-Komponenten zu ermitteln. Bislang hat man nähere Kenntnisse vor allem bei *Salmonellen* erhalten. Da die analysierten Verlustmutanten biosynthetische Zwischenstufen des kompletten Polysaccharids der Wildform bilden, ist es möglich, die Schritte der Polysaccharid-Biosynthese zu rekonstruieren. In Übereinstimmung mit der chemischen Strukturanalyse konnten *Horecker, Osborn et al.* [61, 75, 76] sowie *Nikaido et al.* [40, 52, 77], wie auch *E. C. Heath et al.* bei *E. coli* [24], viele Stufen der Polysaccharid-Biosynthese in isolierten Systemen und unter Verwendung radioaktiv markierter Nucleosid-diphosphat-hexosen im Detail studieren.

Bei Lipopolysacchariden von M-Mutanten – mit Polyheptosephosphat-Grundkette plus Glucose – konnte der Einbau von Galaktose experimentell verwirklicht werden [6, 24, 44]. Ausgehend von Mutanten, die keine UDP-Glucose-Pyrophosphorylase enthalten (nur Polyheptosephosphat-Kette) gelang der Einbau von Glucose, also die Biosynthese des M-Polysaccharids. Schließlich konnten alle Schritte der Biosynthese der Oligosaccharid-Kette der RII-Struktur (vgl. Abb. 6) durch schrittweisen Einbau von Glucose, Galaktose, wieder Glucose und N-Acetylglucosamin bestätigt werden [24, 61]. Zellwand-Präparate mit RII-Lipopolysacchariden wurden als Substrat für die Übertragung der spezifischen Zucker der Seitenketten erkannt [76–78] wiederum in Übereinstimmung mit chemischen und immunchemischen Analysen der Polysaccharide. Dabei ergab sich, daß die Einbaugeschwindigkeit jedes spezifischen Zuckers gesteigert ist, wenn alle an der sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheit beteiligten Zucker in Form ihrer Nucleosid-

diphosphat-Derivate zugesetzt wurden. Es wird heute angenommen, daß bei der Biosynthese der spezifischen Seitenketten die sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten – zumindest ihre Grundketten – (also z. B. Man → Rha → Gal → bei *Salmonellen* der Gruppen A, B, D und E; Abb. 4) zuerst als lipoid-gebundene Oligosaccharide vorgefertigt und dann als Ganzes auf die wachsende Kette übertragen werden [76, 78].

Somit entsprechen den beiden Bezirken der *Salmonella*-Polysaccharide – basales Kernpolysaccharid bis zur RII-Struktur und spezifische Seitenketten (Abb. 2) – auch zwei biochemische Synthesemechanismen: das ubiquitäre Basalpolysaccharid wird bis zur RII-Struktur durch Übertragung von Monosacchariden aufgebaut; die bei den Wildformen daran angefügten spezifischen Seitenketten entstehen durch Übertragung von aktivierten species-spezifischen Oligosacchariden.

Auf Grund ihrer biologischen Aktivität und ihres chemischen Aufbaus können drei Klassen von Zellwandlipoiden unterschieden werden. Lipoid A, an das O-spezifische Polysaccharid gebunden, ist ein Teil des O-Antigens und für dessen endotoxische Wirkungen wesentlich. – Das von *Rothfield* und *Horecker* [81] aus der Zellwand von *Salmonellen* isolierte Phosphatidyl-äthanolamin spielt die Rolle eines Cofaktors bei der Biosynthese der Basalstruktur der O-Antigene. – Ein weiteres Lipoid, dessen chemische Zusammensetzung noch unbekannt ist, wurde neuerdings als Aktivator der Oligosaccharid-1-phosphate erkannt, die von der Zelle zur Synthese der spezifischen Ketten der O-Antigene verwendet werden [76, 78].

Es ist verständlich, daß bei den R-Mutanten viele verschiedene Genotypen zu ein und demselben Phänotyp führen können. Beispielsweise werden Defekte in der Enzymausrüstung, die zur Bildung und zur Übertragung der spezifischen Zucker der sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheit einer spezifischen Seitenkette notwendig ist, phänotypisch im allgemeinen zu R-Formen mit RII-Polysaccharid führen. Entsprechendes gilt für andere Mutanten.

Die bislang durchgeführten chemischen, immunchemischen, biochemischen und genetischen Untersuchungen – an denen mehrere Arbeitskreise in verschiedenen Ländern beteiligt sind – stehen im Einklang mit den derzeitigen Vorstellungen über die Struktur und Biosynthese der enterobakteriellen Zellwand-Polysaccharide. Es wird von großem Interesse sein, viele weitere Enterobacteriaceen aus möglichst vielen Genera zu analysieren, um am Ende ein umfassendes Bild von der außerordentlichen Vielfalt der Ausstattung bakterieller Zelloberflächen mit spezifischen Polysacchariden und von der Auswirkung dieser Ausstattung auf das biologische Verhalten der Zelle zu erhalten.

[75] *M. J. Osborn u. L. D'Arì*, Biochem. biophysic. Res. Commun. 16, 568 (1964).

[76] *J. M. Weiner, T. Higuchi, L. Rothfield, M. Saltmarsh-Andrew, M. J. Osborn u. B. L. Horecker*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 228 (1965).

[77] *H. Nikaido u. K. Nikaido*, Biochem. biophysic. Res. Commun. 19, 322 (1965).

[78] *A. Wright, M. Dankert u. P. W. Robbins*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 235 (1965).

Eingegangen am 11. Dezember 1965 [A 501]

[79] *D. Tripodi u. A. Nowotny*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966, im Druck.

[80] *P. W. Robbins, I. M. Keller, A. W. Wright u. R. Bernstein*, J. biol. Chemistry 240, 384 (1965).

[81] *L. Rothfield u. B. L. Horecker*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 939 (1964).