

Beziehungen zwischen Mikroben und blutgruppenaktiven Substanzen^[*]

von PROF. DR. G. F. SPRINGER

IMMUNOCHEMISTRY DEPARTMENT^[**], EVANSTON HOSPITAL AND DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, NORTHWESTERN UNIVERSITY, EVANSTON, ILLINOIS (USA)

Substanzen mit Blutgruppenspezifität ABH(0) sind nicht auf die roten Blutzellen des Menschen beschränkt. Sie sind vielmehr antigene, ubiquitäre Oberflächenstrukturen, die die Natur als Bauprinzip von Mikroben bis zu Säugetieren beibehalten hat. Sogenannte „präexistierende natürliche“ Antikörper lassen sich experimentell als das Resultat „stiller“ Immunisierung durch diese weitverbreiteten Antigene nachweisen. Die blutgruppenspezifischen Strukturen der Bakterien sind denen der menschlichen ABH(0)-Substanzen chemisch sehr ähnlich. Die Situation bei den aktiven Substanzen aus höheren Pflanzen ist komplizierter; sie geben außergewöhnliche immunchemische Reaktionen, und zwei ihrer blutgruppenspezifischen Monosaccharide präzipitieren Antikörper. In jüngster Zeit wurde die Natur der M- und N-Blutgruppensubstanzen aus Erythrocytenmembranen aufgeklärt, welche zudem hervorragende Influenzavirus-Rezeptoren und -Hemmer sind. M- und N-antigene Glycoproteine sind die Hauptsubstanzen des zweiten von mindestens 14 Blutgruppensystemen des Menschen. Das NN-Antigen ist die erste physikalisch homogene, chemisch definierte, hochblutgruppenaktive Zelloberflächenstruktur menschlichen Ursprungs. Als Oberflächenstrukturen haben blutgruppenaktive Substanzen Rezeptoreigenschaften, von denen die Blutgruppenspezifität wohl häufig nur eine von mehreren ist.

1. Einleitung

Im Titel dieser Arbeit wird bewußt von blutgruppenaktiven Substanzen und nicht von Blutgruppensubstanzen^[1] gesprochen, denn das Wort Blutgruppensubstanzen wird heute meist für die in epithelialen Sekreten des Menschen und der höheren Tiere vorkommenden Blutgruppen-A-, -B-, -H(0)- und Le^a-spezifischen Glycoproteine gebraucht^[2-5]. Die Bezeichnung „Blutgruppensubstanz“ wird nur durch die historische Entwicklung, nämlich ihre Entdeckung an der Oberfläche menschlicher Erythrocyten^[1], verständlich; ihre Isolierung aus epithelialen Flüssigkeiten zeigt bereits die Fragwürdigkeit dieses Namens.

Bei blutgruppenaktiven Substanzen handelt es sich um Oberflächenstrukturen mit Rezeptoreigenschaften, die neben der Funktion als Antikörperrezeptoren auch andere, physiologisch bedeutendere Aufgaben haben können^[6]. In diesen Oberflächenstrukturen ist

[*] Eigene hier mitgeteilte Untersuchungen wurden von der National Science Foundation, den National Institutes of Health, der American und Chicago Heart Association, der John A. Hartford Foundation sowie der Atomic Energy Commission unterstützt.

[**] Unterhalten durch den Susan Rebecca Stone Fund for Immunochemistry.

- [1] K. Landsteiner, Wiener klin. Wschr. 14, 1132 (1901).
- [2] F. Schiff u. M. Akune, Münchener med. Wschr. 1931, 657.
- [3] K. Freudenberg, H. Eichel u. W. Dirscherl, Naturwissenschaften 20, 657 (1932).
- [4] W. T. J. Morgan, Proc. Roy. Soc. (London) B 151, 308 (1960).
- [5] E. A. Kabat: Blood Group Substances. Academic Press, New York 1956.
- [6] G. F. Springer in R. W. Jeanloz u. E. A. Balazs: The Amino Sugars. Academic Press, New York 1965, Band IIb, S. 267.

nämlich ein Bauprinzip verwirklicht, das von den niedrigsten bis zu den höchsten Lebensformen durch alle phylogenetischen Entwicklungsstufen beibehalten wurde^[7,8]. Die blutgruppenaktiven Substanzen, die weder auf das Blut noch auf den Menschen beschränkt sind, stellen Rezeptoren im Sinne Paul Ehrlichs dar^[9,10].

Die Funktion dieser Substanzen – man kennt beim Menschen 14 Blutgruppensysteme mit weit über 60 Faktoren – ist nur teilweise geklärt. Ihre Rolle bei Transfusionen^[11,12], Mutter - Foetus - Unverträglichkeit^[13-15], als Bifidusfaktor^[16,17] und die Beziehung zum Intrinsicfactor^[18] sollen hier nicht besprochen werden.

- [7] G. F. Springer, C. S. Rose u. P. Gyorgy, J. Lab. clin. Med. 43, 532 (1954).
- [8] G. F. Springer in O. Westphal u. L. ter Haak: Immunchemie. 15. Mosbacher Kolloquium. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965, S. 90.
- [9] P. Ehrlich (1901). Nachgedruckt in P. Ehrlich: Gesammelte Arbeiten. Springer-Verlag, Berlin 1957, Band 2, S. 316.
- [10] R. Kuhn, Naturwissenschaften 46, 43 (1959).
- [11] P. Dahr u. M. Kindler: Erkenntnisse der Blutgruppenforschung seit der Entdeckung des Rhesusfaktors. Schattauer Verlag, Stuttgart 1962, 2. Aufl.
- [12] O. Schuerch, H. Willenegger u. M. Knoll: Blutkonservierung und Transfusion von konserviertem Blut. Springer-Verlag, Wien 1942.
- [13] P. Levine u. R. E. Rosenfield, Advances Pediatrics 6, 97 (1953).
- [14] A. S. Wiener u. G. J. Brancato, J. Lab. clin. Med. 46, 757 (1955).
- [15] R. R. Race u. R. Sanger (übersetzt von O. Prokop): Die Blutgruppen des Menschen. Thieme, Stuttgart 1958, Kap. 19.
- [16] G. F. Springer, C. S. Rose u. P. Gyorgy, J. Lab. clin. Med. 43, 532 (1954).
- [17] R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 (1954).
- [18] G. F. Springer u. P. Gyorgy, Klin. Wschr. 33, 627 (1955).

2. Herkunft der „präexistenten natürlichen“ Blutgruppenantikörper

Antigene werden entdeckt, bestimmt und charakterisiert durch ihre Fähigkeit, mit Antikörpern zu reagieren, und die Entdeckung des ersten Blutgruppensystems ABH(0)^[1] beruht auf der erstaunlichen Tatsache der Präexistenz der Blutgruppen-anti-A- und -anti-B-Antikörper. Jedes über 6 Monate alte Individuum besitzt diejenigen Blutgruppenantikörper des ABH(0)-Systems, die nicht gegen seine eigenen Blutgruppenantigene gerichtet sind. Der Ursprung dieser Blutgruppenantikörper ist ein altes Rätsel der Immunbiologie, denn es ist nicht erforderlich, daß das betreffende Individuum jemals in Kontakt mit roten Blutzellen gekommen ist, welche die entsprechenden Antigene enthalten. Die vorherrschende Theorie der letzten 40 Jahre war, daß diese Antikörper ererbt seien (siehe^[5, 19, 20]). Es wurde daher eine Kopplung des Gens, das die Bildung der Blutgruppe A kontrolliert, mit einem Gen, das die Bildung von anti-B-Antikörpern steuert, angenommen; Analoges wurde für Antigen B und anti-A-Antikörper postuliert. Antikörper sind aber definitionsgemäß auf einen Antigenreiz hin entstehende oder modifizierte Serumglobuline.

Madeleine Dupont^[21] vertrat als erste die selbst von Landsteiner^[21a] abgelehnte, später aber von anderen unterstützte Auffassung, daß die Isoagglutinine (Blutgruppen-anti-A- und -anti-B-Antikörper) das Resultat exogener Reize und kreuzreagierende Antikörper seien^[5, 19–24].

Dieses Argument schien experimentell nachprüfbar, und zwar mindestens auf zwei Wegen, besonders seit die weite Verbreitung der Blutgruppen-A-, -B- und -H(0)-Aktivität in der Natur erkannt worden war^[24–25a]. Zum einen sollten Lebewesen, die solche Antikörper bilden können, unter keimfreien Bedingungen aufgezogen werden. Sind die Antikörper Genprodukte, so müssen sie im keimfreien wie im gewöhnlichen Tier in gleicher Menge auftreten; sind sie aber umweltbedingt, so könnten sie in keimfreien Tieren fehlen. Zum zweiten sollte es möglich sein, normalerweise niedrige

Isoagglutintiter durch Immunisierung auf „normalem“ Wege, d.h. durch Inhalieren oder Verschlucken weitverbreiteter Antigene, zu erhöhen.

Es ist seit langem bekannt, daß Hühner zahlreicher Rassen im Alter von etwa 20 Tagen regelmäßig Menschenblutgruppen-anti-B-Antikörper bilden^[26, 27]; auch diese Antikörper wurden als Genprodukte aufgefaßt. Wir prüften daher die Richtigkeit dieser Annahme an keimfreien und gewöhnlichen Hühnern aus dem gleichen Ausschlupf. Es zeigte sich^[28] (Abb. 1), daß keimfreie Weiße Leghornhühner am 45. Lebenstage keinerlei Blutgruppen-anti-B-Antikörper besitzen, während die gewöhnlichen Hühner diese in etwa gleicher Titerhöhe wie

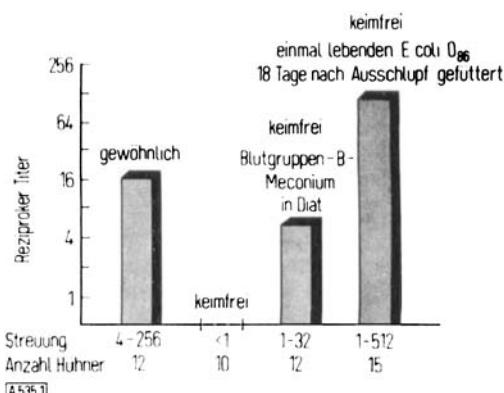


Abb. 1. Menschenblutgruppen-anti-B-Agglutinine in 45 Tage alten Weißen Leghornhühnern (Durchschnittsgewicht gewöhnlicher Hühner 489 g, keimfreier Hühner 545 g).

Menschen aufweisen. Füttern mit blutgruppen-B-aktivem Meconium oder Versprühen desselben führt zu mäßigem anti-B-Titer, einmaliges Verfüttern von B-aktivem *Escherichia coli* O₈₆ zu extrem hohem anti-B-Titer in keimfreien Hühnern. Durch Verfüttern von Bakterien ohne Blutgruppenaktivität bilden sich keine Blutgruppenantikörper.

Fütterungsversuche haben wir auch am Menschen durchgeführt^[29], wenngleich nicht unter ähnlich „idealen“ Bedingungen. Die Resultate (Tabelle 1) zeigen,

Tabelle 1. Blutgruppen-anti-B-Isoagglutininstimulation durch Verfüttern von totem blutgruppenaktivem *E. coli* O₈₆ [29].

Individuum	Alter bei Versuchsbeginn	Fütterungsschema	Reziproker Isoagglutintiter		
			direkt vor Versuchsbeginn	7–28 Tage nach Versuchsbeginn	5–8 Monate nach Versuchsbeginn
6 Säuglinge, Diarrhoe	7–15 Wochen	1 g/Tag, 3–7 Tage	<1–4	32–128	16–64
5 Säuglinge, gesund	7–15 Wochen	nichts	<1–4	<1–4	2–8
M.L. Colitis ulcerosa	erwachsen	2 g/Tag, 1 Tag	16	256	32
G.A. Coloncarcinom	erwachsen	2 g/Tag, 1 Tag	32	128–256	

[19] A. S. Wiener: Blood Groups and Transfusion. Hafner Publishing Co., New York 1962, 3. edition reprint.

[20] P. Dahr, Z. Rassenphysiol. 12, 1 (1941).

[21] M. Dupont, Arch. internal Med. exp. 9, 33 (1924).

[21a] K. Landsteiner: The Specificity of Serological Reactions. 2. Aufl., Harvard University Press, Cambridge (Mass.) 1945.

[22] A. S. Wiener, J. Immunology 66, 287 (1951).

[23] G. F. Springer, Klin. Wschr. 38, 513 (1960).

[24] G. F. Springer, Naturwissenschaften 43, 93 (1956).

[25] G. F. Springer, J. Immunology 76, 399 (1956).

[25a] S. Iseki, E. Onuki u. K. Kashiwagi, Gunma J. med. Sci. 7, 7 (1958).

daß bei Kindern und Erwachsenen Isoagglutinine auf immunogene Reize hin gebildet werden. Verfütterung durch Trocknen getöteter *E. coli* O₈₆ an schwer diarrhoische Säuglinge des Alters, in dem die Iso-

[26] C. E. Bailey, Amer. J. Hyg. 3, 370 (1923).

[27] F. Schiff u. L. Adelsberger, Zbl. Bakteriol. 93, 172 (1924).

[28] G. F. Springer, R. E. Horton u. M. Forbes, J. exp. Medicine 110, Nr. 2, 221 (1959).

[29] G. F. Springer, H. Tritel u. W. Leuterer, 8. internat. Congress for Microbiology, E 32A, 12 (1962).

agglutininbildung beginnt, führte innerhalb einer Woche zu einem hochsignifikanten, 32-fachen Titeranstieg der anti-B-Antikörper. Es dauerte viele Monate, bis der Titer etwas abfiel. Es ist damit erwiesen, daß die Isoagglutininbildung sogar durch Einnahme toter *E. coli* stimuliert werden kann, und zwar zum Ansteigen bei Erwachsenen mit schweren intestinalen Störungen und de novo bei Kleinkindern. Individuen mit schweren Darmläsionen wurden gewählt, weil ihre Därme eine erhöhte Durchlässigkeit für Makromoleküle haben. Um die Darmflora nicht zu schädigen, wurden keine lebenden Bakterien in großen Quantitäten verabreicht.

Diese Untersuchungen beweisen, daß „normale“ Hämagglutinine durch immunogene Stimulation entstehen können. Diese für das Bluttransfusionswesen wichtigen Befunde sind wahrscheinlich zu verallgemeinern. Ererbt ist nur der Antikörper produzierende Apparat, nicht aber der spezifische Antikörper selbst [29-31].

3. Blutgruppenspezifische Substanzen bei Bakterien

Der in Abschnitt 2 angeführte *E. coli* O₈₆ hat eine außergewöhnlich hohe B-Aktivität, aber Blutgruppenaktivität ist bei den gramnegativen Bakterien, die einen Großteil der Darmflora des Menschen ausmachen, keine Seltenheit (Tabelle 2). 137 von 282 Bakterienstämmen zeigten A-, B- oder 0-Spezifität oder eine Kombination davon [32]. Diese Bakterien stellen teilweise eine Auswahl dar; auch waren die Aktivitäten häufig niedrig.

Tabelle 2. Verbreitung der Blutgruppenaktivität bei gramnegativen Bakterien [32].

Genus	Anzahl der untersuchten Stämme	Spezifität								inaktiv
		A ₁	B	H(0)	A ₁ BH(0)	A ₁ B	A ₁ H(0)	BH(0)		
<i>Escherichia</i>	135	8	18	22	6	3	3	4	71	
<i>Salmonella</i>	19	1	2	9	0	0	1	0	6	
<i>Arizona</i>	3	0	1	1	0	0	0	1	0	
<i>Klebsiella</i>	42	2	6	4	3	1	1	5	20	
<i>Citrobacter</i>	24	2	2	2	0	2	2	3	11	
<i>Pasteurella</i>	8	0	1	0	0	0	0	2	5	
<i>Proteus</i>	20	0	6	2	0	0	0	1	11	
<i>Pseudomonas</i>	15	1	1	2	0	0	1	0	10	
<i>Serratia</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	
<i>Alcaligenes</i>	8	0	0	0	0	0	1	1	6	
<i>Shigella</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	5	
<i>Herellea</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	282	14	38	44	9	6	9	17	145	

Die immunologische Simulation der Blutgruppen-ABH(0)-Substanzen des Menschen durch toxische bakterielle Lipopolysaccharide kann so weit gehen, daß menschliche Erythrocyten blutgruppenaktives Material von Bakterien adsorbieren und somit ihren genetisch bestimmten Charakter ändern [33, 34]. Das muß bei Bluttransfusionen beachtet werden.

[30] F. C. McDuffie u. E. A. Kabat, J. Immunology 77, 61 (1956).
 [31] L. H. Muschel, E. Osawa u. D. A. McDermott, Amer. J. clin. Pathol. 29, 418 (1958).

[32] G. F. Springer, P. Williamson u. W. C. Brandes, J. exp. Medicine Nr. 6, 1077 (1961).

[33] G. F. Springer u. R. E. Horton, J. gen. Physiol. 47, Nr. 6, 1229 (1964).

[34] G. F. Springer, E. T. Wang, J. H. Nichols u. J. M. Shear, Ann. New York Acad. Sci. 316, 17 (1966).

den. Darüber hinaus weist die Fähigkeit der Erythrocyten, mit ihrer immensen Oberfläche derartige toxische Substanzen zu binden, auf eine bisher kaum beachtete Transport- und Entgiftungsfunktion der roten Blutzellen hin [33-35]. Diese und die sich daraus ergebende therapeutische Möglichkeit der Toxinblockierung mit löslichen Erythrocytenmembrankomponenten werden in unserem Laboratorium untersucht [34].

Am Beispiel der blutgruppen-B-spezifischen Substanzen aus *Escherichia coli* O₈₆ B:7 sollen nunmehr chemische und immunologische Beziehungen zwischen der bakteriellen B-spezifischen Substanz und der Substanz menschlichen Ursprungs diskutiert werden. Tabelle 3 zeigt, daß das isolierte Lipopolysaccharid mindestens so aktiv wie hoch gereinigtes menschliches Glykoprotein aus Ovarcysten ist. Wir haben ferner nachgewiesen, daß *E. coli* O₈₆ nicht nur spezifisch die Hämagglytination

Tabelle 3. Blutgruppen-B-aktive Polysaccharide.

Aktive Substanz	Kleinste Menge (µg/ml), die 4 hämagglutinierende Dosen menschliches Anti-B völlig hemmt [a]
<i>E. coli</i> O ₈₆ , Lipopolysaccharid	1
<i>E. coli</i> O ₈₆ , intaktes Bakterium	10-20
Menschliches Ovarcysten-Glykoprotein	1-2
Menschliches Meconium-Glykoprotein	2
Pferdemagen-Glykoprotein	10

[a] Zur Terminologie siehe z. B. [6].

hemmt und die Bildung von anti-B-Antikörpern stimuliert, sondern auch, daß dieses Bakterium Blutgruppen-anti-B-Antikörper absorbiert [24, 32, 33]. Hyperimmune Blutgruppen-anti-B-Sera verzögern das Wachstum von

E. coli O₈₆ in Abwesenheit von Komplement [24] und töten das Bakterium, wenn Komplement vorhanden ist [36]. Dies ist das erste Beispiel, daß Blutgruppenantikörper eine pathophysiologische Bedeutung außerhalb des Gebietes der Blutgruppen erlangen können.

Der blutgruppenaktive Komplex aus *E. coli* O₈₆ B:7 wurde mit Pyridin/Wasser [37] oder Phenol/Wasser [38] extrahiert,

[35] F. Gramlich u. H. E. Mueller, Acta haemat. 30, 153 (1963).

[36] L. H. Muschel u. E. Osawa, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101, 614 (1959).

[37] W. F. Goebel, F. Binkley u. E. Perlman, J. exp. Medicine 81, 315 (1945).

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

mit Alkohol fraktioniert gefällt und ultrazentrifugiert [33], bis im zweidimensionalen Agar-Gel-Diffusionstest nur eine Linie mit menschlichem anti-Blutgruppen-B-Serum auftrat. Die Zuckerbausteine dieses Lipopolysaccharids und des menschlichen Ovarcysten-Glykoproteins sind in Tabelle 4 angeführt. In allen daraufhin untersuchten stark blutgruppenaktiven Bakterien fanden sich zumindest drei der vier Zucker, die für die menschlichen blutgruppen-ABH(0)-spezifischen Glykoproteine charakteristisch sind. In jedem Fall war der Zucker, welcher vorwiegend die Spezifität einer menschlichen Blutgruppensubstanz bedingt, auch in den entsprechenden bakteriellen Substanzen vorhanden [32].

Tabelle 4. Zuckerbausteine blutgruppen-B-spezifischer Antigene, charakteristische Werte (%). Die unterstrichenen Zucker sind Bestandteile der menschlichen Blutgruppensubstanzen ABH(0) [4, 5, 34].

Zucker	<i>E. coli</i> O ₈₆ -Lipopolysaccharid	Menschliches Ovarcysten-Glykoprotein
D-Galaktose	+	+
Glucose	+	0
Galaktosamin	+	5
Glucosamin	+	14
	17,5	19
Fucose	7	15
Neuraminsäure	< 1	+
Heptose	+	0
K.D.O. [a]	4,5	0

[a] Nur mit der Warren-Reaktion nachgewiesen.

Für die Blutgruppenspezifität menschlicher Glykoproteine sind sich wiederholende, über die Oberfläche der Makromoleküle verteilte Oligosaccharide verantwortlich [39, 40]. Es wurde daher geprüft, ob ähnliche Strukturen die B-Spezifität bakterieller Antigene bewirken [41, 34]. Milde Säurehydrolyse des gereinigten Lipopolysaccharids mit einem wasserlöslichen Ionen austauscher [41] ergab im Dialysat blutgruppen-B-spezifische Oligosaccharid-Fraktionen, die durch präparative Papierchromatographie in etwa 5 % Ausbeute (Gewichtsbasis) erhalten wurden [34, 8, 41]. Das aktivste dieser Präparate ist mehr als zehnmal aktiver als α -D-Galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-galaktose, das aktive Disaccharid der menschlichen Blutgruppensubstanz B [42, 40, 39]. Die Totalhydrolyse und quantitative Bestimmung der bakteriellen Oligosaccharide (12 Std., 2 N HCl, 100 °C) zeigte, daß Pentabioctasaccharide vorlagen [34, 41].

Ihre Zusammensetzung [41, 34] ist der der menschlichen blutgruppen-B-spezifischen Strukturen, die durch milde Säurehydrolyse erhalten werden, zwar ähnlich, unterscheidet sich aber in wichtigen Punkten. Auch sind die aus Bakterien isolierten Oligosaccharide aktiver. Dies läßt sich möglicherweise durch die stets vorhandene Fucose (ein Molekül pro Oligosaccharid) erklären [34, 41], die den durch saure Hydrolyse erhaltenen blutgruppen-B-spezifischen Oligosacchariden menschlichen Ursprungs fehlt [39, 40, 42]. Ein weiterer Unterschied ist das Vorkommen von Galaktosamin in den bakteriellen [34, 41] im Gegensatz zu Glucosamin in den menschlichen Oligosacchariden [39, 42, 40]. Alle B-aktiven *E. coli* O₈₆-Oligosaccharide enthielten Glucose, einen im menschlichen B-Glykoprotein nicht vorhandenen [4, 5] und an der B-Spezifität unbeteiligten Zucker [6].

D-Galaktose muß terminal und α -glykosidisch an *E. coli* O₈₆ gebunden sein, da Kaffeebohnen- α -Galaktosidase die Blutgruppen-B-Aktivität des Makromoleküls sowie die der daraus isolierten Oligosaccharide unter Freiset-

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

[40] G. Schiffman, E. A. Kabat u. W. Thompson, Biochemistry 3, 587 (1964).

[41] G. F. Springer, J. H. Nichols u. B. Kolecki, 147. Amer. chem. Soc. Meeting S. 13c, 28 (1964).

[42] T. J. Painter, W. M. Watkins u. W. T. J. Morgan, Nature (London) 199, 282 (1963).

zung von Galaktose zerstörte [43]. Gleichzeitig trat Blutgruppen-H(0)-Aktivität auf. Diese Befunde entsprechen denen an Ovarcysten-Glykoproteinen [44, 45] und deuten auf die Entblößung nichtreduzierender Fucose hin, die somit für anti-H(0)-Antikörper zugänglich wird.

Nach Einwirkung von α -Galaktosidase nahm auch die Kreuzreaktivität des Makromoleküls mit *Antipneumococcus*-Typ-XIV-Pferdeserum zu [34], ein Hinweis darauf, daß sich nun nichtreduzierende β -Galaktosyleinheiten – wahrscheinlich an N-Acetylhexosamin gebunden – an der Oberfläche der Moleküle befinden. In Übereinstimmung hiermit haben wir gefunden, daß *E. coli* β -Galaktosidase [46] Galaktose freisetzt [34], nachdem die α -glykosidisch gebundene Galaktose abgespalten ist. β -N-Acetylhexosaminidase [47] setzt aus den mit den beiden Galaktosidasen vorbehandelten Oligosacchariden 1 mol N-Acetylgalaktosamin frei.

Basierend auf diesen chemischen, serologischen und enzymatischen Untersuchungen und in Analogie zu Befunden anderer Autoren an blutgruppen-B-spezifischen Strukturen des Menschen [39, 40] ist es wahrscheinlich, daß die in Abbildung 2 wiedergegebene Oligosaccha-

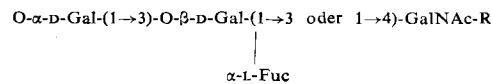


Abb. 2. Vorschlag für die Struktur der blutgruppen-B-aktiven Determinanten in *E. coli* O₈₆. R enthält Glucose, manchmal auch Galaktose und Galaktosamin [34, 43].

ridstruktur in *E. coli* O₈₆ die Blutgruppen-B-Spezifität bedingt. Der strikte chemische Beweis für diese Struktur steht aber noch aus. Serologische Befunde sprechen dafür, daß der Fucopyranosylrest in α -glykosidischer Bindung an das subterminale β -Galaktosyl gebunden ist, da H(0)-Spezifität de novo als Resultat von α -Galaktosidase-Behandlung des Lipopolysaccharids (nach Dialyse) sowie des daraus gewonnenen B-aktiven Oligosaccharids auftritt [43, 34]. Die Bindung eines Fucosyls an ein β -Galaktosyl verhindert die hydrolytische Abspaltung des β -Galaktosyls nicht (5 Tage Inkubation; Enzym: Substrat = 1:3, Gewichtsbasis) [47a]. Eine ähnliche Struktur, die aber N-Acetylglucosamin und daran gebundene Fucose enthält, wurde kürzlich in *Salmonella* Gruppe U [48] beobachtet; diese Salmonellengruppe besitzt das 0-Antigen 43, dessen Blutgruppen-B-Spezifität wir schon früher beschrieben [32].

Die chemischen Befunde über die blutgruppenaktiven Oligosaccharide gramnegativer Bakterien stehen also

[43] G. F. Springer, J. H. Nichols u. H. J. Callahan, Science (Washington) 146, 946 (1964).

[44] M. L. Zarnitz u. E. A. Kabat, J. Amer. chem. Soc. 82, 3953 (1960).

[45] M. L. Zarnitz, W. M. Watkins u. E. A. Kabat, Nature (London) 195, 1204 (1962).

[46] K. Wallenfels, M. L. Zarnitz, G. Lanle, H. Bender u. M. Kesser, Biochem. Z. 331, 459 (1959).

[47] V. P. Bhavanandan, E. Buddeke, R. Carubelli u. A. Gottschalk, Biochem. biophys. Res. Commun. 16, 353 (1964).

[47a] K. Wallenfels, persönliche Mitteilung.

[48] O. Lüderitz, D. A. R. Simmons u. O. Westphal, Biochem. J. 97, 820 (1965).

in Einklang mit den früheren, rein immunologischen Befunden über die nahe Beziehung von *E. coli* O₈₆-Strukturen und denen anderer Bakterien mit denen der menschlichen Blutgruppen ABH(0) [24–25a, 28, 32, 33, 49].

4. Blutgruppenspezifische Substanzen bei höheren Pflanzen

Wir fanden blutgruppenspezifische Substanzen nicht nur in Bakterien, sondern auch in höheren Pflanzen und Viren. Bei diesen blutgruppenaktiven Antigenen (welche nicht mit Pflanzenagglutininen zu verwechseln sind [50]) in der Eibe (*Taxus cuspidata* und *baccata*) sowie im Sassafrasbaum (*Sassafras albidum*) ist die chemische Situation anders als bei blutgruppenaktiven Substanzen der Bakterien [51–54]. Wir haben physikalisch-chemisch homogene Polysaccharide durch Wasserextraktion und Fraktionierung mit organischen und anorganischen Lösungsmitteln aus den Zweigen dieser Pflanzen isoliert. Tabelle 5 zeigt als Beispiel Daten des Sassafras-Polysaccharids. Die mit Aalserum gemessene Blutgruppen-H(0)-Aktivität dieser Präparate ist so hoch wie die der aktivsten Präparate menschlichen Ursprungs (Tabelle 6). Im Gegensatz zu den Blutgruppen-Glykoproteinen des Menschen hemmen aber diese pflanzlichen Polysac-

Tabelle 5. Physikalische Daten des hochgereinigten H(0)-aktiven Sassafras-Polysaccharids [54].

$[\alpha]_D^{23}$ (grad)	+63,2 (c = 0,25, H ₂ O, 1 dm)
$s_{20,w}$ (S)	8,5 (c = 0)
$D_{20,w}$ (Fick-Einheiten)	2,0 (c = 0,5)
M_w	$2,5 \times 10^5$ (aus s und D abgeleitet)
η_{sp}/c (dl/g)	2,5 (c = 0,018; G = 0)
dn/dc (ml/g)	$1,766 \times 10^{-5}$ ($\lambda = 5461 \text{ \AA}$; 20 °C)
M_w	$4,6 \times 10^5$ (aus der Lichtstreuung abgeleitet)
f/f ₀	2,6

Tabelle 6. Kohlenhydratkomponenten blutgruppen-H(0)-aktiver Makromoleküle [32, 51, 52, 54].

	Menschliches Glykoprotein	<i>Sassafras albidum</i> -Polysaccharid	<i>Taxus cuspidata</i> -Polysaccharid	<i>E. coli</i> O ₁₂₈ -Lipo-polysaccharid
Blutgruppenaktivität (μg/ml) mit Aalserum und menschlichen Erythrocyten gemessen	3	3	3	6
Monosaccharide nach Hydrolyse	L-Fucose N-Acetyl-D-glucosamin N-Acetyl-D-galaktosamin D-Galaktose	3-O-Methyl-D-galaktose Galaktose Glucose L-Arabinose Xylose Rhamnose Galakturonsäure	2-O-Methyl-L-fucose Galaktose Arabinose Xylose Rhamnose Glucose	Fucose N-Acetylglucosamin N-Acetylgalaktosamin Galaktose Glucose Heptose(n)

[49] H. Pettenkofer, W. F. Maassen u. R. Bickerich, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 119, 415 (1960).

[50] M. Krüpe: Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phytagglytine). F. Enke, Stuttgart 1956.

[51] G. F. Springer, N. J. Ansell u. H. W. Ruelius, Naturwissenschaften 3, 256 (1956).

[52] G. F. Springer in G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. Churchill, London. Little, Brown, Boston 1958, S. 216.

[53] G. F. Springer, P. R. Desai u. B. Kolecki, Biochemistry 3, 1076 (1964).

[54] G. F. Springer, T. Takahashi, P. R. Desai u. B. Kolecki, Biochemistry 4, 2099 (1965).

charide anti-H(0)-Agglutinine vom Menschen, vom Kaninchen oder aus Pflanzen nur schwach oder gar nicht. Sie wirken aber in Tieren antigen, wenn auch nur in wenigen der geprüften Hühner und Kaninchen [24, 54].

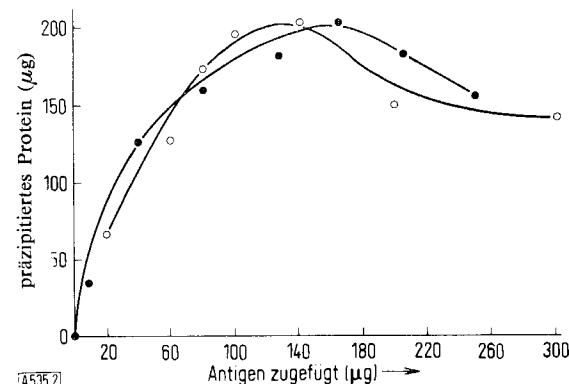


Abb. 3. Präzipitation menschlicher H(0)-Substanz (o) (Morgan human ovar. cyst 277/PI/WS PR XXXIII) und H(0)-aktiver Substanz aus Sassafras (●) (Sassafras C-70 PR XXIV) mit Aal-anti-H(0)-Serum [54].

Nicht nur Hämagglytination-Hemmungsteste, sondern auch Agar-Gel-Diffusionsteste und strikt quantitative Präzipitinteste (Abb. 3) ergaben die immunologische Äquivalenz der Blutgruppen-H(0)-Substanzen vom Menschen und aus Sassafras sowie aus der Eibe (nicht in Abb. 3 gezeigt), wenn mit Aalserum gemessen wurde, obwohl erstaunlicherweise die drei Substanzen chemisch sehr verschieden sind. Zwar sind die Moleküle ungefähr gleich groß [4, 52, 54], doch enthalten die pflanzlichen blutgruppen-H(0)-aktiven Substanzen im Gegensatz zu denen des Menschen keinen Stickstoff und auch keine Fucose, obwohl die L-Form dieses Zuckers in α -glykopyranosidischer Bindung als hauptverantwortlich für die Blutgruppen-H(0)-Spezifität menschlicher H(0)-Substanzen erachtet wird [55, 56].

Vielmehr erwies sich 2-O-Methyl-L-fucose [51, 52] als der „blutgruppenaktive“ Zucker in der Eibe; er wurde bis dahin in der Natur noch nicht gefunden. Die Blutgruppenaktivität im Sassafras-Polysaccharid wird durch die sehr seltene 3-O-Methyl-D-galaktose bedingt [54]. Tabelle 6 zeigt die Bausteine blutgruppen-H(0)-aktiver Antigene. Galaktose ist der einzige Zucker, den Sassa-

[55] W. M. Watkins u. W. T. J. Morgan, Nature (London) 169, 825 (1952).

[56] R. Kuhn u. H. G. Osman, Z. physiol. Chem. 303, 1 (1956).

fras-Polysaccharid und menschliches Ovarcysten-Glykoprotein gemeinsam haben. Dieser Zucker spielt aber in der Blutgruppen-H(0)-Aktivität keine primäre Rolle und ist H(0)-inaktiv^[55-58]. Von den übrigen Monosacchariden des Sassafras-Polysaccharids hätte nur Arabinose blutgruppen-H(0)-aktiv sein können^[55,57]. Sie erwies sich aber als das D-Enantiomer^[54], während nur die L-Form aktiv ist. Das Sassafras-Polysaccharid enthält (bezogen auf ein Molekulargewicht von $2,5 \times 10^5$) 355 3-O-Methyl-D-galaktoseeinheiten pro mol Polysaccharid^[54]; ein Molekül H(0)-Cystensubstanz weist bemerkenswerterweise etwa die gleiche Anzahl blutgruppenaktiver Zuckerreste in Form von L-Fucose auf^[59]. Die Zusammensetzung des Sassafras-Polysaccharides zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7. Bausteine des blutgruppen-H(0)-aktiven Sassafras-Polysaccharides [54].

Struktureinheiten	(%)	mol/mol Sassafras- Polysaccharid
3-O-Methyl-D-galaktose	25,0	355
Rhamnose	26,0	445
Xylose	9	171
Galaktose	8	124
Galakturonsäure	5,6	78
L-Arabinose	5	95
Glucose	2	31
Acetyl	11,33	660

Diese so nahe immunologische Verwandtschaft der blutgruppen-H(0)-spezifischen Makromoleküle von Menschen und höheren Pflanzen, wie sie sich mit vier Methoden, nämlich der Hämagglutinationshemmung, der quantitativen Immunpräzipitation, der zweidimensionalen Agar-Gel-Diffusion und der Immunisierung kundtut, ist äußerst überraschend, da die Blutgruppensubstanzen von Menschen, Taxus und Sassafras chemisch sehr verschieden sind. Die Befunde scheinen auf die Grenzen der immunologischen Methode hinzuweisen, besonders wenn heterologe Reagenzien benutzt werden wie sie die Blutgruppenantikörper vorwiegend sind (siehe^[54]). Es wird jedoch gezeigt werden, daß die immunologischen Reagenzien wohl nur scheinbar „unzuverlässig“ sind^[54,60,68].

5. Zur Spezifität heterologer immunchemischer Reaktionen

Wir haben das Problem gleicher Blutgruppenspezifität und Aktivität verschiedener Zucker mit Hilfe synthetischer Modellsubstanzen^[57,53] und an Hand methylzuckerhaltiger Naturprodukte studiert. Manche Herzglykoside und Antibiotika haben mit gewissen Reagenzien die gleiche serologische Spezifität wie die menschliche Blutgruppensubstanz H(0), obwohl sie chemisch völlig verschieden sind^[58]. Als Beispiel diene die Struktur des aktiven Odorosids H, das aus dem inaktiven Odorotriosid-G-monoacetat durch Abspaltung von 2 mol Glucose oder einem mol Gentiobiose (und

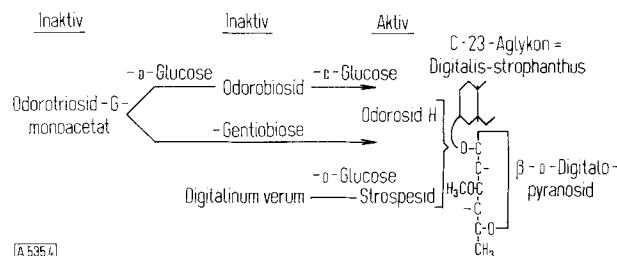
[57] G. F. Springer u. P. Williamson, Biochem. J. 85, 282 (1962).

[58] G. F. Springer u. P. Williamson, Vox Sanguinis 8, 177 (1963).

[59] W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, Brit. J. exp. Pathol. 34, 94 (1953).

[60] B. Kolecki u. G. F. Springer, Federat. Proc. 24, 631 (1965).

einer Acetylgruppe) entsteht^[61] (Abb. 4). Ähnlich steht es mit dem Übergang des inaktiven Digitalinum verum in aktives Strospesid (Abb. 4). Ist ein ungewöhnlicher Zucker wie Digitalose (3-O-Methyl-D-fucose) Bestandteil eines Herzglykosids, so ist er stets direkt an das Aglykon gebunden^[62]. Nur digitalosehaltige Substanzen, die diesen Zucker in terminaler Stellung enthalten, sind aktiv^[58].



Alle mit Aalserum oder Lotusreagens als blutgruppen-H(0)-aktiv befindenen Substanzen enthielten im Hapten mindestens eine Methylgruppe. Wir haben daher die Methyläther der L- und der D-Fucose und der D-Galaktose sowie ihre Methylglykoside systematisch untersucht; eine Anzahl wurde erstmals dargestellt [57, 53, 54]. In Tabelle 8 finden sich einige eklatante Beispiele der Aktivitäten von Fucose- und Galaktosederivaten, die demonstrieren, daß Enantiomere gleich und ebenso blutgruppenaktiv sein können wie L-Fucose. Für eine vollständige Aufstellung aktiver und inaktiver Fucose- und Galaktosemethyläther siehe [53, 54, 57]. Dieser Befund, der sich zunächst nicht mit der klassischen Auffassung der Spezifität und besonders der Stereospezifität biologischer Reaktionen in Einklang bringen ließ, wurde von Kabat einleuchtend erklärt [67].

Nicht nur Enantiomere können gleich aktiv sein, sondern auch zwei ganz verschiedene Zucker, wie L-Fucose und 3-O-Methyl-D-galaktose. Diese Resultate wurden zuerst mit der semiquantitativen Hämaggulationshemmungsmethode erzielt. Strikt quantitative Präzipitationshemmungsversuche führten zum gleichen Ergebnis [57, 53]. Unsere experimentellen Untersuchungen und Konformationsstudien an Modellen haben ergeben [53, 54, 60], daß die minimale komplementäre Struktur für den Aal-Antikörper kleiner als ein einziger Zucker ist und sich daher in verschiedenen, sonst nicht miteinander verwandten Monosacchariden finden kann [53, 54, 57, 60]. Eine so kleine komplementäre Struktur wurde bisher weder für anti-Kohlenhydrat- noch für anti-Eiweiß-Antikörper in Betracht gezogen. Diese minimale komplementäre Struktur scheint aus einem Methylsubstituenten in äquatorialer Stellung an einem Pyranosering zu bestehen; ein Äthersauerstoff muß sich in unmittelbarer Nähe dieser Methylgruppe befinden, und ein axialer, sauerstofftragender Substituent muß in cis-Stellung zur Methylgruppe an einem benachbarten Kohlenstoffatom vorhanden sein. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim anti-H(0)-Reagens von *Lotus tetragonolobus*.

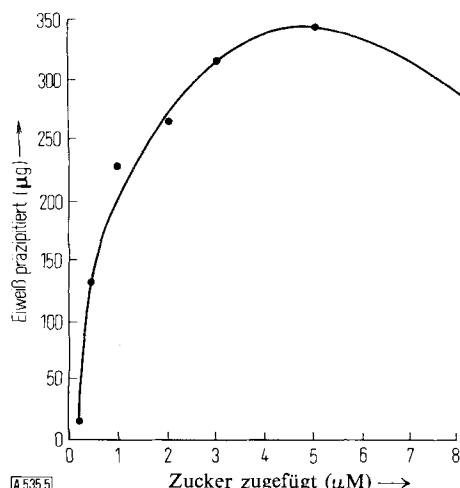


Abb. 5. Quantitative Präzipitinkurve, erhalten mit Aal-anti-H(0)-Serum und 3-O-Methyl-D-fucose (Versuch Nr. 49: Antiserum 0,5 ml Aal M'; Gesamttestvolumen 1,5 ml).

[67] E. A. Kabat, Biochem. J. 85, 291 (1962).

Ein weiteres, mit den Vorstellungen der klassischen Immunchemie schwer zu vereinbarendes Phänomen beobachteten wir bei unseren Studien mit Fucose- und Galaktosemethyläthern: die anti-H(0)-Antikörper der meisten, aber nicht aller Aal-anti-H(0)-Seren wurden durch 3-O-Methyl-D-fucose und 3-O-Methyl-D-galaktose präzipitiert [54, 60] (Abb. 5). Das Präzipitat besteht aus dem anti-H(0)-spezifischen Eiweißkörper des Aalserums, welcher sich in der Ultrazentrifuge wie eine einzige Komponente mit den Eigenschaften eines 7-S-Globulins verhält [68, 54, 60]. Der Antikörper kann aus dem Präzipitat quantitativ wiedergewonnen werden und zeigt in Hämaggulations- und Präzipitinversuchen unveränderte Aktivität [60, 68]. Die beiden präzipitierenden Zucker dürfen die kleinsten bisher beschriebenen ungeladenen Haptene sein, die Antikörper fällen können [54]. Die Präzipitation läßt sich spezifisch mit Haptene wie α -Methyl-L-fucopyranosid und 2-O-Methyl-L-fucose hemmen.

Der Ablauf dieser Präzipitation ist schwer aus der klassischen Theorie („Lattice Theory“) abzuleiten, da die niedrigmolekularen Haptene keine charakteristischen, sich wiederholenden Gruppierungen besitzen wie sie zu einer raumnetzartigen Verknüpfung mit dem Aal-antikörper erforderlich wären. Weder Dampfdruckosmometrie noch Kryoskopie [68] ergaben Anhaltspunkte für eine Aggregation der Zuckermoleküle in Lösung. Beide Haptene tragen aber mindestens je eine lipophile Gruppe, die eine „hydrophobe Bindung“ eingehen kann. Karush [69] nimmt an, daß jede apolare Gruppe in einer antigenen Determinanten [**] einen großen Einfluß auf die Stabilität eines Antigen-Antikörperkomplexes ausübt. Die Situation ist in unserem Fall aber kompliziert [60], da Modifikationen wie Reduktion an C-2 oder 2-O-Methylierung und/oder Methylglykosidierung der beiden 3-O-Methylzucker ihre Präzipitationsfähigkeit aufhebt und sie in hochaktive Haptene umwandelt [60, 68] (Tabelle 9).

Tabelle 9. Antikörper präzipitierende Monosaccharide und ihre Umwandlung in Hemmer durch Änderungen an einem C-Atom.

Präcipitinogen	Hemmer	% Hemmung [a] relativ zu L-Fucose (= 100 %)
3-O-Methyl-D-galaktose	2,3-Di-O-methyl-D-galaktose	100–200
3-O-Methyl-D-fucose	2,3-Di-O-methyl-D-fucose	100–200
	2-Desoxy-3-O-methyl-D-fucose	100
	Methyl- α -3-O-methyl-D-fucopyranosid	200–500
	Methyl- β -3-O-methyl-D-fucopyranosid	500

[a] Hämaggulations- und Präzipitationshemmung.

In höheren Pflanzen befinden sich Stoffe, die spezifisch und in recht niedrigen Konzentrationen die Wirkung von Antikörpern des Rhesussystems (Rh) neutralisieren [70]. Tabelle 10 gibt Resultate wieder, welche wir mit Extracten von Flieder- und Forsythienzweigen erhielten. Wie ersichtlich, hemmten Fliederextrakte alle Antikörper des Rh-Systems. Die Extrakte waren sogar ak-

[68] G. F. Springer, K. A. Roberson, B. Kolecki u. A. Bezkrovny, unveröffentlicht.

[69] F. Karush, Advances Immunology 2, 10 (1962).

[**] Definition siehe [6].

[70] G. F. Springer u. H. Tegtmeyer, Nature (London) 293, 298 (1964).

tiver als rhesusaktive Präparate aus menschlichen Erythrocyten^[71]. Das pflanzliche Material hat jedoch ganz andere physikalische und chemische Eigenschaften als das menschliche. Auch erwiesen sich Ligninbausteine, die uns Prof. K. Freudenberg freundlichst überließ^[72], als aktiv. Dr. Ph. Levine teilte uns mit, daß die Fliederextrakte mit anti-Rh-Seren in Agar präzipitieren. Trotz der Spezifität der Reaktion steht bei diesem überraschenden Befund der Beweis aus, daß die Hemmer mit der „combining site“ des Antikörpers reagieren und ihn nicht etwa im Sinne eines allosterischen Effektes beeinflussen.

Tabelle 10. Hemmung von anti-Rh-Agglutininen durch Substanzen aus höheren Pflanzen [70]. Anti-M-, -N-, -A- und -B-Antiseren werden nicht gehemmt.

Nicht dialysierbare Extrakte aus Zweigen von:	Kleinste Menge (mg/ml), die 4 agglutinierende Dosen folgender Antiseren völlig hemmt:						
	Rh ₀ [a]	rh'	rh''	hr'	hr''	P	0[c]
<i>Syringa sp.</i>	0,2–0,6	5	2,5	2,5	± 5	NA [b]	NA
<i>Forsythia giraldiana</i> (gereinigt)	0,1					NA	NA
<i>Taxus cuspidata</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,002
Menschl. Erythrocyten, A. F., Stroma [71]	0,3–0,6	5	NA	0,6	5	2,5	2,5

[a] Arithmetische Durchschnittswerte, mit 5 verschiedenen Seren erhalten.

[b] NA = nicht aktiv.

[c] Aalserum.

6. Blutgruppenspezifische Substanzen bei Viren

Als Vertreter der Viren wurden Myxoviren studiert. An ihnen sollen die beiden letzten Aspekte dieser Übersicht behandelt werden: zunächst ein Problem ihrer Oberflächenstruktur, sodann das des Substrates ihrer Aktion. Influenzaviren des Typs A und B sowie das Virus der Geflügelpest wurden auf Blutgruppenaktivität untersucht^[73–75]. Alle Viren wurden auf Hühnereiern ge-

züchtet. Alle Viruspräparate und Vaccinen, inclusive chromatographisch gereinigte, zeigten in ihrem nicht dialysierbaren, die Antigenität besitzenden Rückstand signifikante Blutgruppen-A- und Forssman-Antigen-Spezifität. Diese Aktivität ließ sich vom intakten Virus nicht abtrennen und nahm mit zunehmender Reinigung zu (Tabelle 11). Bei der A-ähnlichen Substanz des Influenza- und Geflügelpestvirus handelt es sich wahrscheinlich um Komponenten aus dem Cytoplasma des Wirtes^[76–80].

Es ist bekannt, daß der Hühnerembryo Blutgruppen-antigen-A und Forssman-Antigen enthält^[81–83]. Bei der

Behandlung der Myxoviren mit Äther reicherte sich die A-Aktivität vorwiegend in der Ätherphase an; ein Teil schien auch mit den Hämaggglutininen assoziiert zu sein^[75]. Subcutane Injektion des makromolekularen Anteils kommerzieller Influenzavirusvaccine und hochgereinigter Influenzaviren in Menschen führten zu einer erheblichen anti-A-Isoagglutinin- und -Isohämolsinbildung^[74, 75, 84] (Tabelle 12).

Die außerordentlich nahe Verwandtschaft der Blutgruppen-A- und Forssman-Antigene ist auch chemisch erwiesen^[85]. Diese

Tabelle 11. Blutgruppenaktivität von Influenzavirus-Präparaten (makromolekularer Anteil nach Erhitzen auf 95 °C).

Präparat	C.C.A. [a]	Kleinste Menge (mg/ml) [b], die 4 hämagglutinierende Dosen völlig hemmt	
		A ₁	A ₂
Käuflicher Impfstoff (nicht dialysierbar, 0,40–1,13 mg/ml)	800	1,2	0,3–0,6
Asian Jap. 305 A ₂ -Influenzavirus chromatographiert	2000	0,3	0,05–0,1
1. nicht dialysierbar			
2. Überstand (11,5 %) der Zentrifugation von 1. bei 1600 g		0,05	0,01
3. Sediment (88,5 %)		0,6	0,1

[a] C.C.A. = Hühnererythrocyten agglutinierende Einheiten pro mg, berechnet nach Bestimmungen vor Erhitzen und Dialyse.

[b] Hemmerkonzentration vor Verdünnung mit ausgewählten Hyperimmunseren und Erythrocyten-Suspension, Endkonzentration: 1/3 der angegebenen Werte. Keine Hemmung im B-anti-B- und 0-anti-H(0)-System (Hemmerkonzentration bis 10 mg/ml).

[71] I. Wolff u. G. F. Springer, Proc. 10. internat. Congress Soc. Blood Transfusion, Stockholm 1964. Karger, Basel 1965, S. 511.

[72] K. Freudenberg, Science (Washington) 148, 595 (1965).

[73] G. F. Springer u. H. Tritel, Science (Washington) 138, 687 (1962).

[74] G. F. Springer u. R. Schuster, Klin. Wschr. 42, 821 (1964).

[75] G. F. Springer u. R. Schuster, Vox Sanguinis 9, 589 (1964).

Tabelle 12. Zunahme der Isohämolsine bei zehn Versuchspersonen (Blutgruppe 0) nach subcutaner Injektion (2–5 mg innerhalb 24 Std.) des nicht dialysierbaren Anteiles eines chromatographierten Influenzaviruspräparates (Asian Jap. 305 A₂-Virus) [75].

Maximaler Hämolsintiter-Anstieg [a] (zweifache geometrische Verdünnung)	Anzahl der Fälle		
	Seren getestet gegen Erythrocyten		
	A ₁	B	Schaf
64-fach			1
16- bis 32-fach	3	2	1
4- bis 8-fach	4	6	4
< 4-fach	3	2	4

[a] Endpunkt: Letztes Röhrchen mit mindestens 25 % Hämolyse.

[76] S. S. Cohen, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 358 (1958).

[77] L. Hoyle, J. of Hyg. 50, 229 (1952).

[78] W. Smith, G. Belyavin u. F. W. Sheffield, Proc. Roy. Soc. (London) B 143, 504 (1955).

[79] D. A. J. Tyrrell in: Mechanisms of Virus Infection. Academic Press, London-New York 1963, S. 245.

[80] J. E. Hotchin, S. M. Cohen, H. Ruska u. C. Ruska, Virology 6, 689 (1958).

[81] L. Schiff u. L. Adelsberger, Z. Immunitätsforsch. exp. Therapie 40, 335 (1924).

[82] E. Witebsky u. J. Szepsenwol, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 115, 221 (1934).

[83] R. Harris, G. S. Harrison u. C. J. M. Rondle, Acta genet. statist. Med. 13, 44 (1963).

[84] Communicable Disease Center, Influenza Surveillance Report No. 73: Influenza vaccine and AB0 incompatibility. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service IV: 12–14, 1962.

[85] I. A. F. L. Cheese u. W. T. J. Morgan, Nature (London) 191, 149 (1961).

Tatsachen wirken sich möglicherweise ungünstig auf Mutter-Foetus-Beziehungen aus (Mutter Blutgruppe 0, Foetus Blutgruppe A) und sind besonders im Hinblick auf Aborte diskutiert worden. Desgleichen wurde auf die hohe Cytotoxizität der Forssman-Antikörper hingewiesen [74, 85a]. Unsere mit verhältnismäßig großen Dosen (drei oder mehr Influenzavirusschutzdosen) durchgeführten Experimente beschränkten sich auf hühnerei-gezüchtete Influenzavirusspräparate. Das Problem der Immunisierung mit Agentien, die antigenen Komponenten mit dem Embryo, aber nicht seiner Mutter gemeinsam haben, ist von allgemeiner Bedeutung, vor allem wegen der möglichen schädigenden Wirkung auf den Foeten. Nach unseren Untersuchungen scheint das A-ähnliche Antigen eine Komponente aus dem Cytoplasma des Wirtes zu sein, das von Myxoviren nahezu unverändert übernommen und möglicherweise angereichert wird. Im auf natürlichem Wege infizierten Individuum dürften Influenzaviren daher dessen eigene blutgruppenaktiven Substanzen inkorporieren, die für den Wirtsorganismus normalerweise nicht antigen sind. Eine Isoantikörpervermehrung als Resultat natürlicher Infektion ist daher unwahrscheinlich und bei neuen epidemiologischen Untersuchungen auch nicht beobachtet worden [86].

7. Die Blutgruppensubstanzen des MN-Systems

Dieser Bericht begann mit den Blutgruppensubstanzen des Menschen, und zum Abschluß kehren wir zu ihnen zurück. Wir und kurz danach eine finnische Arbeitsgruppe haben weitere Beziehungen der Influenzaviren zu Blutgruppensubstanzen aufgedeckt [87, 88]. Influenzaviren zerstören in spezifischer Weise [81] die Hauptantigene des zweiten der menschlichen Blutgruppensystems [89, 90], des MN-Systems (Tabelle 13). Andere Arbeitsgruppen haben nach diesen Befunden zur Erforschung der Chemie der MN-Blutgruppen beigetragen [91-93]. Es

Tabelle 13. Einfluß von Influenzaviren und „Receptor Destroying Enzyme“ auf Erythrocyten-Antigene des Menschen [87]. Die Agglutinogene A₁, B, H(0), Le^a, Le^b, S, s, P, Jk^a, K, k, Fy^a, Rh₀, rh', rh'', hr' und hr'' werden nicht inaktiviert.

	Menschliches Blutgruppen-Agglutinogen			
	M	N	Lu ^a	Lu ^b
<i>Influenzavirus</i>				
Typ A				
Melbourne	+	+	+	+
Swine S ₁₅	+	+	+	+
Typ B				
Lee	+	+	+	+
<i>Vibrio cholerae</i>				
Receptor Destroying Enzyme	+	+	-	0

± = inaktiviert; — nicht inaktiviert; 0 = nicht getestet.

- [85a] E. M. T. Berkinshaw-Smith, R. S. Morgan u. O. Payling Wright, Brit. J. exp. Pathol. 43, 665 (1962).
[86] M. K. Fagerhol, A. Harboe u. O. Hartmann, Nature (London) 203, 1185 (1964).
[87] G. F. Springer u. N. J. Ansell, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 182 (1958).
[88] O. Mäkelä u. K. Cantell, Ann. Med. exp. Biol. fenn. 36, 366 (1958).
[89] K. Landsteiner u. P. Levine, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 24, 941 (1927).
[90] K. Landsteiner u. P. Levine, J. exp. Medicine 48, 731 (1928).
[91] E. Klenk u. G. Uhlenbrück, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 151 (1960).
[92] G. Uhlenbrück, Proc. 10. internat. Soc. Congress Blood Transfusion, Stockholm 1964. Karger, Basel 1965, S. 476.
[93] T. Baranowski, E. Lisowska, A. Morawiecki, E. Romanowska u. K. Strozecka, Arch. Immunol. Terapii Doswiadczałnej 7, 15, 759 (1959).

ist uns gelungen, hochaktive immunogene MM-, MN- und NN-Substanzen aus Erythrocyten zu isolieren. Es handelt sich um Glykoproteine [6, 8, 94-96]. Aus menschlichen Meconien erhielten wir neuerdings ein N-ähnliches, immunogenes Glykoprotein in guter Ausbeute [6, 8, 95, 96]. Die Methode zur Isolierung dieser Antigene bestand in schonender Extraktion in Anwesenheit von Elektrolyten, Differentialzentrifugation und Fraktionierung an Agargel- sowie Sephadexsäulen mit vorausgehender und anschließender Fällung mit organischen und anorganischen Lösungsmitteln, erneuter Differentialzentrifugation und Elektrodialyse [96]. Erhitzen schädigt die Erythrocyten-Substanzen biologisch und chemisch. Wir haben die N- und N-ähnlichen Antigene in physikalisch-chemisch homogener Form erhalten [95] und biologisch und chemisch charakterisiert [6, 8, 94-96].

In Tabelle 14 sind physikalische Daten des NN-Antigens und des aus Meconium isolierten Antigens (Me-Vg) zusammengestellt. Das NN-Antigen hat ein etwas höheres Molekulargewicht und eine etwas größere Diffusionskonstante, aber eine niedrigere Viscosität als die Meconium-Substanz [95]. Die hohen f/f_0 -Werte sprechen für eine erhebliche Asymmetrie beider Präparate. Beide Antigene sind linksdrehend und absorbieren zwischen 255 und 282 m μ . Die stark negative Ladung der als homogene Substanzen wandernden Glykoproteine ergab sich aus ihrer Laufrichtung zur

Tabelle 14. Physikalische Daten für NN- und Me-Vg-Antigene des Menschen [95].

	Erythrocyten-Antigen (NN) Ca 825	Meconium-Antigen (Me-Vg) Ca 851
$S_{20,w}$ (S)	12,8 (c = 0)	10,8 (c = 0)
$D_{20,w}$ (Fick-Einheiten)	1,67 [a]	1,41 (c = 0)
V (Partielles spez. Vol.)	0,68	0,63
(ml/g)		
M _w	595000	520000
f/f ₀	2,34	2,96
[α] _D ²⁰ (H ₂ O, 1 cm) (°)	-27,0 (c = 0,1)	-32,4 (c = 0,5)
η (0,85 % NaCl, 37,5 °C)	1,052 [b]; 1,095 [c]	1,707 [b]; 2,408 [c]
A 1 %/274 m μ	10 90	4,49

[a] Durchschnitt der Werte für 8,9 und 4,4 mg/ml (nicht konzentrations-abhängig).

[b] 0,5 % Konzentration.

[c] 1,0 % Konzentration.

Anode (zwischen pH = 4,5 und 9,2). Auf Whatman No. 1-Papier verhielt sich das NN-Antigen wie menschliches Serumalbumin und das Me-Vg-Antigen wie ein α -Globulin. Auf Celluloseacetat war die Beweglichkeit beider Antigene etwas geringer.

Besonders auffallend ist die augenscheinliche Fähigkeit des NN-Antigens, in Untereinheiten zu disaggregieren. So hatte eine früher von uns mit nur wenig schärferen Methoden erhaltene Substanz ein Molekulargewicht von 150000, d.h. ein Viertel des hier angegebenen [8]. Für Aggregations-Desaggregationsphänomene des Erythrocyten-Antigens sprechen folgende weitere Beobachtungen: die Asymmetrie der Grenzflächen (Boundaries) unserer Präparate in der Ultrazentrifuge [95] sowie die Extraktion eines Glykoproteins aus Erythrocyten mit heißer alkalischer Phenol-

[94] G. F. Springer u. K. Hotta, Federat. Proc. 22, 2261 (1963).

[95] A. Bezkrovainy, G. F. Springer u. K. Hotta, Biochim. biophysica Acta 115, 501 (1966).

[96] G. F. Springer, Y. Nagai u. H. Tegtmeyer, Biochemistry 5, Oktober (1966), im Druck.

Lösung [97], welches ähnliche chemische und biologische Eigenschaften wie die hier beschriebene Substanz aufwies [6, 8, 96], aber ein Molekulargewicht von nur etwa 30000 besaß. Auch dissozierte ein inhomogenes NN-Antigenpräparat bei Zusatz von Alkylsulfatdetergentien in Untereinheiten vom Molekulargewicht 30000 [98]. Es sei jedoch betont, daß das NN-Antigen mit dem höchsten Molekulargewicht auch die bei weitem höchsten Aktivitäten (bezogen auf gleiches Gewicht) besaß. Die isolierten Antigene sind nahezu lipoidfrei [96].

Tabelle 15. NN- und Me-Vg-Antigene: Aktivität in vitro und enzymatische Inaktivierung [96].

Antigen	Behandlung	Kleinste Menge (mg/ml), die die Agglutination menschl. Erythrocyten durch 4 agglutinierende Dosen völlig hemmt				
		Anti-N				
		Mensch (Armst.)	Mensch (Kon. SN-6, Stur. 25543)	Kaninchen [55-57]	<i>Vicia graminea</i>	Influenzavirus PR 8
NN [a] Ca 825	keine	0,01-0,02	0,6-2,0	0,1	0,003-0,005	0,003
	R.D.E. [b]	N.A. [c]	N.A.	N.A.	0,003	0,425
	Trypsin	N.A.	N.A.	2,5	N.A.	0,135
Me-Vg [a] Ca 851	keine	N.A.	N.A.	N.A.	0,1	0,03
	R.D.E.	N.A.	N.A.	N.A.	0,1	>1
	Trypsin	N.A.	N.A.	N.A.	0,1	0,03

[a] Inaktiv mit 3 menschlichen und 4 Kaninchen-anti-M-Seren.

[b] Receptor Destroying Enzyme.

[c] N.A. = Keine Agglutinationshemmung mit 10 mg/ml oder weniger.

Biologische Daten der beiden Antigene sind in Tabelle 15 zusammengestellt; die Antigene sind nicht nur Blutgruppensubstanzen von hoher Aktivität, sondern auch, wie aus der letzten Spalte hervorgeht, außerordentlich wirksame Myxovirushemmer. Das Meconiumantigen war weniger aktiv, wenn mit Influenzaviren vom Typ A (PR 8 und Melbourne) getestet wurde; es war aber viermal aktiver als das NN-Antigen gegen den Maryland 1/59-Typ B-Stamm [96].

Die NN- und MM-Substanzen sind gute Antigene, mit denen sich blutgruppenspezifische Antiseren erzeugen lassen [6, 8, 96]. Das Meconium-Antigen besitzt die mit dem *Vicia*-Reagens bestimmbare Aktivität; N-Spezifität ließ sich mit menschlichen und tierischen Antiseren nicht nachweisen. Nach Immunisierung mit Me-Vg-Antigen bildeten sich nur in einem von 17 Kaninchen anti-N-spezifische Antikörper [96].

Das NN-Antigen ist ein gutes Beispiel für die Mosaikstruktur der Blutgruppenantigene im allgemeinen [100]. Sein serologisches Studium ergab, daß Antikörper verschiedenen Ursprungs mit der gleichen Allgemeinspezifität doch befähigt sind, vorzugsweise mit nicht völlig identischen Strukturen am gleichen Makromolekül zu reagieren. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, zeigen verschiedene menschliche anti-N-Seren deutlich verschiedene Aktivitäten. Alle menschlichen Seren unterscheiden sich in ihrer Affinität aber von

[97] R. H. Kathan, R. J. Winzler u. C. A. Johnson, J. exp. Medicine 113, 37 (1961).

[98] A. Morawiecki, Biochim. biophysica Acta 83, 339 (1964).

[99] M. Krüpe u. G. Uhlenbrück, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 126, 408 (1964).

[100] A. S. Wiener, J. Moor-Jankowski u. E. B. Gordon, J. Immunology 92, 391 (1964).

[100a] Y. Nagai u. G. F. Springer, Federat. Proc. 21, 67d (1962).

den in Kaninchen produzierten anti-N-Seren. Aber tierische wie menschliche Antiseren reagieren mit Bestandteilen der gleichen Rezeptoroberfläche, die der Kaninchen anscheinend mit einem größeren Gebiet [96]. Das *Vicia graminea*-Agglutinin lagert sich dagegen an eine Oberflächenstruktur, die sich von der für die N-Spezifität verantwortlichen unterscheidet, an. Unsere Befunde [100a, 96] weisen darauf hin, daß der Rezeptor für das *Vicia graminea*-Agglutinin nicht wie bisher angenommen ein Bestandteil des NN-Antigens ist, sondern daß er entweder eine genetische Vorstufe der NN- und

MM-Antigene darstellt, oder daß die *Vicia*-Spezifität heterophil ist und diese Antigene nur zufällig begleitet. Trotz der milden Extraktions- und Reinigungsbedingungen wies das isolierte NN-Makromolekül Zeichen der Schädigung seiner biologischen Wirksamkeit gegenüber einigen menschlichen anti-N-Antikörpern auf (Tabelle 15, Spalte 4) [96].

Blutgruppen-N-Aktivität sowie die antiviralen Eigenschaften des NN-Antigens werden durch Influenzaviren, „Receptor Destroying Enzymes“ (R.D.E.) von *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* sowie proteolytische Enzyme zerstört. Behandlung des NN-Antigens und des desialisierten NN-Antigens mit Galaktoseoxidase oder *D. pneumoniae*- β -Galaktosidase zerstörte die *Vicia*-Spezifität; Galaktoseoxidase zerstörte bemerkenswerterweise die mit menschlichem (Armstrong) Serum und in geringerem Ausmaß auch die mit Kaninchen-serum gemessene N-Spezifität [96]. Auf die antivirale Aktivität hatten die beiden letzteren Enzyme keinen Einfluß. Die mit dem pflanzlichen Reagens aus *Vicia graminea* bestimmmbaren Rezeptoreneigenschaften des NN-Antigens wurden ebenfalls von Proteasen, nicht dagegen von Sialidasen inaktiviert. Analoge Befunde wurden mit diesen Enzymen am MM-Antigen erhalten [6, 8, 96]. α -Galaktosidase, *E. coli*- β -Galaktosidase, β -Hexosaminidase und Lysozym hatten keinen Einfluß auf die Blutgruppen- und Virusrezeptoren der NN- und MM-Antigene. Der *Vicia*-Rezeptor des Me-Vg-Antigens wurde durch keines der verwendeten Enzyme inaktiviert [96].

Enzymatische Hydrolysen wiesen zuerst auf die Bedeutung von Sialinsäure für die Blutgruppen-N- und -M-Spezifität hin [87, 88, 91, 93, 96]. Milde Säurehydrolyse ergab die gleichen Befunde [100a, 96]. Neueste Resultate mit Galaktoseoxidase und die Analyse von blutgruppenaktiven dialysierbaren Abbauprodukten des NN-Antigens deuten darauf hin, daß Galaktose in subterminaler

oder in einer der Sialinsäure benachbarten verzweigten Stellung zur vollen Entfaltung der N-Aktivität erforderlich ist. Diese Interpretation ergibt sich nicht nur aus der Zerstörung der N-Aktivität durch Galaktoseoxidase, sondern auch aus der Zusammensetzung der durch milde Säure- sowie Pronasehydrolyse erhaltenen blutgruppen-N-spezifischen Haptene, welche als Zuckerbestandteile 1-2 N-Acetylneuraminsäuren pro 1-2 Galaktosäuren besaßen. Die Anwesenheit von Hexosamin war für die Aktivität nicht erforderlich [96, 101]. Dialysierbare hexosamin- und sialinsäurehaltige Strukturen [102, 96] wurden ebenfalls isoliert. Für die *Vicia*-Rezeptoreigenschaften scheint Galaktose [99, 96] in β -glykosidischer Bindung [96] verantwortlich zu sein. Für die virus- und blutgruppenspezifischen Strukturen scheinen daher überwiegend Sialyl-, Sialyl-galaktopyranosyl- und β -Galaktopyranosylgruppen verantwortlich zu sein.

NN- und Meconium-Antigene sind Glykoproteine. Bei beiden Antigenen herrscht Galaktose (molare Basis) bei den Kohlenhydraten vor. In anderen NN-Antigenpräparaten überwog aber Sialinsäure etwas [8]. Beide Antigene enthalten in großer Menge N-Acetylneuraminsäure, Galaktosamin, Glucosamin und Mannose, das Me-Vg-Antigen zusätzlich einen hohen Anteil an Fucose. Der Quotient Glucosamin:Galaktosamin ist im NN-Antigen ungewöhnlich niedrig, nämlich 0,75. Beide Antigene, vorwiegend aber das aus Meconium, enthalten Komponenten mit den chromatographischen Eigenschaften von N,O-Diacetylneuraminsäuren [96]. Diese Substanzen wurden beim Menschen bisher noch nicht beschrieben [8, 96].

Die Zusammensetzung beider Antigene ist in den Tabellen 16 und 17 wiedergegeben. Die Gesamtwerte addieren sich zu etwa 100 %, da das NN-Antigen zusätzlich ca. 10 % Wasser und 2,5 % Asche enthält, das Me-Vg-Antigen 14 % Wasser und 0,7 % Asche. Das molare Verhältnis Sialinsäure:Gesamt-Hexosamin:Galaktose beträgt etwa 1:1:1 im NN-Antigen und nahezu 1:4:5 im Me-Vg-Antigen.

Threonin, Serin, Leucin und Glutaminsäure sind die vorherrschenden Aminosäuren in der NN-Substanz, während in der Meconium-Substanz Prolin vor Serin steht und Alanin an vierter Stelle folgt. Im NN-Antigen beträgt die Summe der sauren Aminosäuren etwa drei Viertel und die Summe der basischen zwei Drittel der Summe der Hydroxyaminosäuren; beim Me-Vg-Antigen lauten diese Zahlen ein Drittel und ein Sechstel. Beide Makromoleküle zeichnen sich durch ihren geringen Gehalt an aromatischen Aminosäuren (außer Prolin) aus; Tryptophan und Cystin fehlen ganz [96]. Die Aminosäurenzusammensetzung der beiden Antigene, besonders aber des Me-Vg-Antigens, ähnelt denen der ABH(0)-Blutgruppensubstanzen aus Ovarzysten [103, 104].

Der Erforschung der Bindung des Kohlenhydrates an den Peptidanteil der Makromoleküle diente der alkalische Abbau [96] nach *Anderson, Hoffman und Meyer* [105] sowie *Kabat*

[101] *K. Hotta u. G. F. Springer*, Proc. 10. internat. Congress Soc. Blood Transfusion, Stockholm 1964. Karger, Basel 1965, S. 505.

[102] *E. Romanowska*, Nature (London) 191, 1408 (1961).

[103] *M. E. Carsten u. E. A. Kabat*, J. Amer. chem. Soc. 78, 308 (1956).

[104] *A. Puszta u. W. T. J. Morgan*, Biochem. J. 88, 546 (1963).

[105] *B. Anderson, P. Hoffman u. K. Meyer*, J. biol. Chemistry 240, 156 (1965).

und Mitarbeitern [106]. Die Resultate sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. Galaktosamin, Galaktose, Threonin und Serin sind in beiden Antigenen anscheinend an der Kohlenhydrat-Peptidbindung beteiligt und werden durch β -Elimination zerstört. Im Me-Vg-Antigen wurde zudem Glucosamin zu 30 % zerstört. Die Daten zeigen, daß ein Teil der Kohlenhydrate in beiden Antigenen durch eine zusätzliche „peeling reaction“ zerstört sein muß, da etwa zweimal soviel Zucker wie Aminosäuren im NN-Antigen zerstört sind, während dieses Verhältnis beim Me-Vg-Antigen sogar 5:1 beträgt [96].

Tabelle 16. Kohlenhydratanteile hochgereinigter NN- und Me-Vg-Antigene [96].

Struktureinheiten	NN-Antigen Ca 825		Me-Vg-Antigen Ca 851	
	(%)	mol/mol Antigen	(%)	mol/mol Antigen
Acetylneuraminsäure	16,2	312	10,4	175
Galaktosamin	4,32	144	7,50	217
Glucosamin	3,1	103	15,03	436
Galaktose	11,1	367	20,3	586
Mannose	5,4	179	7,5	216
Glucose	0,3	10	1,7	49
Methylpentose	0,7	25	8,4	266

Tabelle 17. Aminosäuren-Analyse der NN- und Me-Vg-Antigene [96].

Aminosäure	NN-Antigen Ca 825			Me-Vg-Antigen Ca 851		
	[a]	[b]	[d]	[a]	[b]	[d]
Asparaginsäure	2,93	131	6,3	0,92	36	6,3
Threonin	4,26	213	10,3	2,99	131	22,8
Serin	3,58	203	9,8	1,34	66	11,5
Glutaminsäure	4,21	170	8,2	1,04	37	6,4
Prolin	2,93	151	7,3	1,85	83	14,4
Glycin	1,46	116	5,6	0,55	38	6,6
Alanin	2,21	148	7,2	0,72	42	7,3
Valin	3,07	156	7,5	0,57	25	4,3
Isoleucin	2,52	114	5,5	0,37	15	2,6
Leucin	4,07	185	8,9	0,72	29	5,0
Tyrosin	1,78	58	2,8	0,15	4	0,7
Phenylalanin	1,85	67	3,3	0,33	10	1,7
Lysin	2,31	94	4,5	0,35	13	2,3
Histidin	2,08	80	3,9	0,25	8	1,4
Arginin	2,54	87	4,2	0,35	10	1,7
Methionin	2,46	98	4,7	0,92 [c]	28 [c]	4,9 [c]
Summe	44,26	2071		13,42	575	
Tryptophan	0,00			0,01		
NH ₄ ⁺	0,77	255		0,77		222
Methionin-sulfoxid				0,06		

[a] g Aminosäure/100 g Antigen.

[b] mol Aminosäure/mol Antigen (nächste ganze Zahl).

[c] Methionin-sulfoxid mitgerechnet.

[d] mol Aminosäure/mol Gesamtaminosäuren.

Tabelle 18. Komponenten der NN- und Me-Vg-Antigene, die durch 0,5 N NaOH bei 23 °C (63 Std.) zerstört werden [96] [a].

Komponente	% Zerstörung	
	NN-Antigen Ca 825	Me-Vg-Antigen Ca 851
Hexosamin, gesamt	48	43
Galaktosamin	80-90	61
Glucosamin	0	30
Galaktose	66	≈ 30
Threonin	48	46
Serin	39	34
Tyrosin	56	0

[a] Andere Bausteine wurden nicht zerstört.

[106] *E. A. Kabat, E. W. Bassett, K. Pryzwanski, K. O. Lloyd, M. E. Kaplan u. E. J. Layug*, Biochemistry 4, 1632 (1965).

Die Gesamtheit der chemischen und biologischen Befunde erlaubt die Annahme, daß die Zuckerketten im NN-Antigen nur aus vier bis sechs Monosacchariden bestehen, während im Meconium-Antigen erheblich längere Ketten angenommen werden müssen. Die immunologische Spezifität dürfte von noch kleineren Oligosaccharidgruppen bestimmt werden: multiple Einheiten von nicht mehr als zwei Zuckern für die *Vicia*-Spezifität und nicht mehr als vier für die mit menschlichem Serum gemessene N-Spezifität. Die Gesamtzahl der Ketten mit N-Spezifität, mit menschlichem Serum bestimmt, beträgt maximal etwa 300 pro Molekül NN-Antigen^[96].

Die MM- und NN-Antigene können, da sie mehrere biologische Funktionen besitzen, nicht nur in der Blutgruppenserologie, der biochemischen Genetik des Menschen und der Virologie als Modelle dienen, sondern auch auf einigen anderen Gebieten. Es handelt sich hier erstmals um physikalisch homogene, chemisch definierte Zellmembrankomponenten eines Säugers, die eine Blutgruppenaktivität der gleichen Größenordnung wie die besten aus Körperflüssigkeiten isolierten ABH(0)-Glykoproteine zeigen (bestimmt mit ihren Antikörpern).

Eingegangen am 17. März 1966, ergänzt am 17. August 1966 [A 535]

ZUSCHRIFTEN

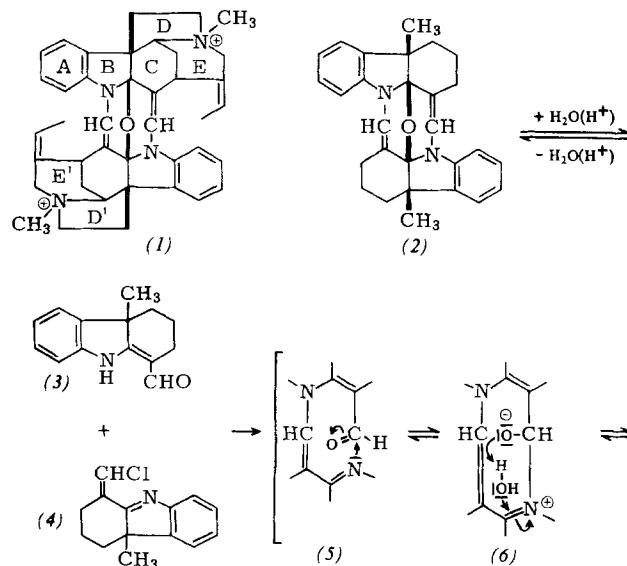
Synthese der zentralen octacyclischen Struktur des Calebassencurare-Hauptalkaloids C-Curarin-I^[11]

Von Prof. Dr. H. Fritz und Dipl.-Chem. R. Oehl

Institut für Organische Chemie
der Universität Frankfurt am Main

Eliminiert man formal aus dem C-Curarin-I^[2] (1) die in der Peripherie angegliederten Ringe D und E sowie D' und E', so erhält man ein octacyclisches Ringsystem (2), den Chromophor des Alkaloids. Es ist uns gelungen, diesen lange gesuchten^[3] Chromophor zu synthetisieren, dessen strukturelle Besonderheit das in seiner Mitte befindliche, von einem Äthersauerstoff überbrückte Diazacyclooctadien-System ist.

Läßt man eine äquimolare Mischung des vinylogen Formamids (3)^[4] und des Imidchlorids (4)^[5] in wasserhaltigem Äther gelöst etwa 18 Std. bei 20 °C stehen, so wird zunächst in etwa 20-proz. Ausbeute in stereospezifischer Reaktion das Racemat des Indolins (8) (Fp = 216 °C) gebildet^[5].



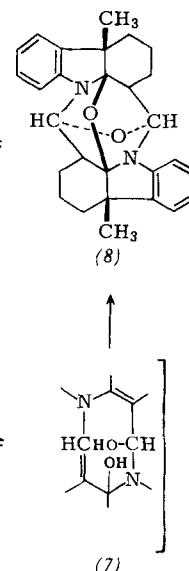
Für die Konstitution (8) sind beweisend: die Elementaranalyse, das UV-Spektrum (Indolin-Absorption), das IR-Spektrum (Ätherbande bei 8,38 μ ; keine OH- und NH-Bande) und das Massenspektrum ($M^+ = 426$). Insbesondere beweist das NMR-Spektrum (in $CDCl_3$), zusammen mit $MG = 426$, zwei äquivalente C-Methylgruppen (6H-Singulett bei $\tau = 8,93$; TMS als interner Standard) und zwei äquivalente Aminoacetal-Protonen (2H-Singulett^[6] bei $\tau = 4,63$). Aus der Äquivalenz dieser Gruppen folgt die für Formel (8) geforderte Symmetrie C_2 . Das zentrale tricyclische System von (8) – das sich im Modell praktisch spannungsfrei aufbauen

läßt – ist mit Adamantan isoster, und zwar ist es ein substituiertes 2,6-Dioxa-4,8-diaza-adamantan. Sehr wahrscheinlich stimmt die aus C-Curarin-I erhaltene „Indolinbase-VII“ bisher unbekannter Konstitution^[7] in ihrer zentralen nonacyclischen Struktur mit Verbindung (8) überein.

(8) entsteht aus (3) und (4) und einem Molekül Wasser vermutlich über (5), (6) und (7).

Durch säurekatalysierte Dehydratisierung (methanol. 1 N HCl; 20 °C; 24 Std.) läßt sich (8) mit (2) ($F_p = 205$ °C) – das hierbei in ebenfalls sterisch einheitlicher Form entsteht – ins Gleichgewicht setzen. Es resultiert eine Mischung von (8) und (2) im Molverhältnis $\approx 1:1$, gleichgültig ob man von reinem (8) oder von reinem (2) ausgeht. Die beiden Substanzen lassen sich leicht chromatographisch an Kieselgel-G mit Benzol als Fließmittel präparativ trennen und kristallisieren leicht.

Mit der Konstitution (2) sind im Einklang: die Elementaranalyse, das massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewicht 408 und das IR-Spektrum (keine OH- und NH-Bande). Aus dem NMR-Spektrum ist ersichtlich, daß (2),



ebenso wie (8), C_2 -Symmetrie besitzt, da die sechs Protonen der beiden C-Methylgruppen ein scharfes Singulett bei $\tau = 8,87$ (in $CDCl_3$; TMS als interner Standard) verursachen. Die beiden an den Enamin-C-Atomen stehenden Protonen zeigen ein durch Allylkopplung schwach aufgespaltenes Signal bei $\tau = 3,30$, das an genau der gleichen Stelle liegt, wie das Signal dieser Protonen im Nor-C-curarin-I^[2b]. Damit kann für unser Syntheseprodukt eine zu (2) alternative Formel (O-Brücke zwischen den beiden CH-Gruppen und entsprechend andere Lage der Doppelbindungen) mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da in dieser die beiden relevanten