

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

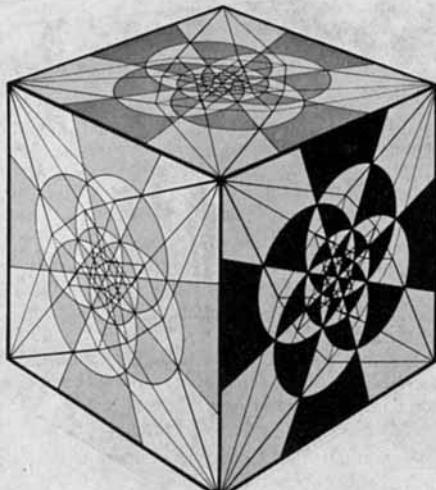
82. JAHRGANG 1970

HEFT 18

SEITE 707—782

Dieses Heft erscheint zur 106. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte vom 4.—8. Oktober 1970 in Düsseldorf. Der graphischen Gestaltung des Umschlages liegt als Motiv eine bildliche Darstellung der oktaedrischen Punktgruppe nach der Methode von Cayley (1878) zugrunde. Diese Figur verweist auf den Beitrag „Chemie und logische Strukturen“, in dem I. Ugi und Mitarbeiter versuchen, die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Elemente der modernen Mathematik für den Chemiker aufzuzeigen: Mathematische Konzeptionen, die durch die Vorurteile unserer Erfahrung nicht beeinflußt und eingeengt sind, machen in einfacher Weise die jeweils wesentlichen Merkmale der Moleküle erfassbar. | Entwurf des Titelblattes: Hans-Walter Herrbold, Opladen.

Angewandte Chemie
Zur 106. Versammlung der
Gesellschaft
Deutscher Naturforscher
und Ärzte
vom 4.—8. Oktober 1970
in Düsseldorf



Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand-Lipopolysaccharide von *Salmonella*-Bakterien^[\star\star]

Von Otto Lüderitz^[\star]

Lipopolysaccharide, in der Zellwand gram-negativer Bakterien lokalisiert, zeichnen sich durch ihre vielfältigen biologischen Aktivitäten aus. Sie stellen die O-Antigene der Bakterien dar, sie sind hochwirksame Endotoxine, und sie fungieren als Rezeptoren für Bakteriophagen. Die Erforschung der Wirkungsweise der Lipopolysaccharide und die Suche nach begrenzten Strukturen, die in den Makromolekülen für die biologische Aktivität verantwortlich sind, konnte begonnen werden, nachdem wesentliche Prinzipien des chemischen Aufbaus der Lipopolysaccharide erkannt waren. Dieser Aufsatz faßt neue Ergebnisse über die Lipopolysaccharidstruktur und den Biosyntheseweg sowie seine genetische Steuerung zusammen^[\star\star\star].

1. Einleitung^[\star\star\star]

Das Lebenswerk von *Fritz Kauffmann* ist das Kauffmann-White-Schema^[1,2], in dem viele Hunderte zum Genus *Salmonella* gehörende Spezies aufgrund ihrer serologischen und biochemischen Eigenschaften klassifiziert sind. Diese Klassifikation bildete die Voraussetzung und die Grundlage für alle späteren chemischen und biochemischen Arbeiten an *Salmonella*-Lipopolysacchariden. Dies soll Tabelle 1 verdeutlichen, in der Ergebnisse zusammengefaßt sind, die wir vor etwa zehn Jahren erhielten, als wir zusammen mit *Kauffmann* begannen, *Salmonella*-Spezies immunchemisch zu analysieren. Wir versuchten damals, die serologische Klassifizierung dieser Spezies mit der

[^{\star}] Dr. O. Lüderitz
Max-Planck-Institut für Immunbiologie
78 Freiburg/Br., Stübeweg 51

[^{\star\star}] Nach einem Vortrag an der Michigan State University, East Lansing, USA, am 23. Oktober 1968 (F. I. Huddleson Memorial Lecture); vgl. *O. Lüderitz*, Max-Planck-Ges. 1969, 93.

[^{\star\star\star}] Im folgenden benutzte Abkürzungen: Glc = Glucose, Gal = Galaktose, Man = Mannose, Hep = L-Glycero-D-mannoheptose, KDO = 2-Oxo-3-desoxyoctonsäure, Rha = Rhamnose, Fuc = Fucose, Abe = Abequose, Par = Paratose, Tyv = Tyvelose, GlcN = Glucosamin, GalN = Galaktosamin, Ac = Acetyl, EtN = Aminoäthanol, P = Phosphatreste.

[^{\star\star\star\star}] *Anmerkung bei der Korrektur:* Die Frage, ob Mannose in den Lipopolysacchariden der Gruppen B und E α - oder β -glykosidisch gebunden ist, war bislang nicht klar [56]. Kürzlich haben jedoch *B. Lindberg* (Stockholm) und *F. Egami* (Tokyo) und ihre Mitarbeiter unabhängig bewiesen, daß in der Gruppe B Mannose α - und in der Gruppe E β -glykosidisch gebunden ist. Aus technischen Gründen konnten die Tabelle 3 und die Abbildungen 6 und 9 nicht mehr geändert werden. Nur Abbildung 16 enthält Mannose in der korrekten α -Bindung.

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

[2] *F. Kauffmann*: The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Kopenhagen 1966, 2. Aufl.

Zuckerzusammensetzung ihrer Oberflächenantigene, die sich als Lipopolysaccharide erwiesen hatten, zu korrelieren. Die in Tabelle 1 angeführten 14 *Salmonella*-Spezies sind repräsentative Vertreter der Gruppen A–E des Kauffmann-White-Schemas. Es wurde

Tabelle 1. Serologische und chemische Klassifizierung einiger *Salmonella*-Spezies: Serotypen — Chemotypen [3].

Spezies	Gruppe	Antigen-Faktoren [a]	lipopolysaccharid-spezifische Zucker
<i>S. paratyphi</i> A	A	1, 2, 12	Mannose, Rhamnose, Paratose
<i>S. paratyphi</i> B	B	4, 5, 12	Mannose, Rhamnose, Abequose
<i>S. typhimurium</i>		4, 5, 12	Mannose, Rhamnose, Abequose
<i>S. abortus equi</i>		4, 12	Mannose, Rhamnose, Abequose
<i>S. paratyphi</i> C	C	6, 7	Mannose
<i>S. cholera suis</i>		6, 7	Mannose
<i>S. montevideo</i>		6, 7	Mannose
<i>S. typhi</i>	D	9, 12	Mannose, Rhamnose, Tyvelose
<i>S. enteritidis</i>		1, 9, 12	Mannose, Rhamnose, Tyvelose
<i>S. sendai</i>		1, 9, 12	Mannose, Rhamnose, Tyvelose
<i>S. anatum</i>	E	3, 10	Mannose, Rhamnose
<i>S. newington</i>		3, 15	Mannose, Rhamnose
<i>S. minneapolis</i>		(3), (15), 34	Mannose, Rhamnose
<i>S. senftenberg</i>		1, 3, 19	Mannose, Rhamnose

[a] Unter Antigen-Faktoren versteht man Teilspezifitäten der O-Antigene (zur Struktur der Antigen-Faktoren s. Abschnitt 5.2).

erstmals erkennbar, daß die Lipopolysaccharide der Spezies einer Gruppe jeweils identische Zuckerbausteine enthalten, daß also eine enge Beziehung zwischen dem Serotyp einer Spezies und dem Chemotyp

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

ihres Lipopolysaccharides besteht. Dieser Zusammenhang konnte später für die Spezies aller Gruppen des Kauffmann-White-Schemas nachgewiesen werden [3].

Die Gruppen A–E enthalten im Ganzen etwa 500 Spezies, und das Kauffmann-White-Schema umfaßt etwa 45 Gruppen. Jede *Salmonella*-Spezies ist charakterisiert durch die serologische Spezifität des (hitzestabilen) O-Antigens (Lipopolysaccharid) und des (hitzestabilen) H- (Flagellar-, Geissel-) Antigens. Analog wurden später *E. coli* [4], *Shigella* [5] und andere Genera klassifiziert. Die Bezeichnungen „O“- und „H“-Antigene sind historischen Ursprungs. H kommt von „mit Hauch“ nach den wie ein Hauch auf Agar wachsenden, begeisselten, sehr beweglichen Formen von *Proteus*-Bakterien. Mit O wurden „ohne Hauch“ wachsende, nicht schwärmende, geissellose *Proteus*-Formen bezeichnet. Häufig wird O-Antigen von „Oberflächenantigen“ abgeleitet, was gut paßt, historisch aber nicht richtig ist.

2. Isolierung von Lipopolysacchariden und ihre biologischen Eigenschaften

Seit der Einführung der nun klassischen Extraktionsverfahren von *Boivin* und *Mesrobeanu* [6], *Morgan* [7] sowie *Goebel* et al. [8] sind weitere Methoden zur Isolierung von Lipopolysacchariden aus gram-negativen Bakterien ausgearbeitet worden, unter denen sich das Phenol/Wasser-Verfahren [9] wegen seiner allgemeinen Anwendbarkeit besonders bewährt hat. Es wird von uns routinemäßig benutzt.

Getrocknete Bakterien werden in einer Mischung von Phenol und Wasser (45 : 55, v/v) kurze Zeit auf 68 °C erwärmt, wobei die Protein/Lipoid/Lipopolysaccharid-Komplexe der Zellwand dissoziieren und die Komponenten in Lösung gehen. Die Mischung, die bei dieser Temperatur monophasig vorliegt, trennt sich nach Abkühlen und Zentrifugation in drei Schichten. Die extrahierten Zellrückstände finden sich am Boden, die darüber liegende Phenolphase enthält Lipide und Proteine, und in der oberen, wäßrigen Phase befindet sich das Lipopolysaccharid neben Nucleinsäuren und Polysacchariden. Nach hochtouriger Ultrazentrifugation (100000 g) der Wasserphase wird das Lipopolysaccharid in reiner Form als Sediment erhalten und anschließend lyophilisiert (1–4 % der Trockenbakterien). Es bildet opaleszierende Lösungen in Wasser.

Neuerdings haben wir ein weiteres, sehr schonendes Extraktionsverfahren ausgearbeitet (PCP-Methode), das sich zur ausschließlichen Isolierung von R-Form-Lipopolysacchariden sehr bewährt [10].

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Bladen* und *Mergenhagen* [11] (Abb. 1) lassen eindrucksvoll die morphologischen Veränderungen an der Bakterien-

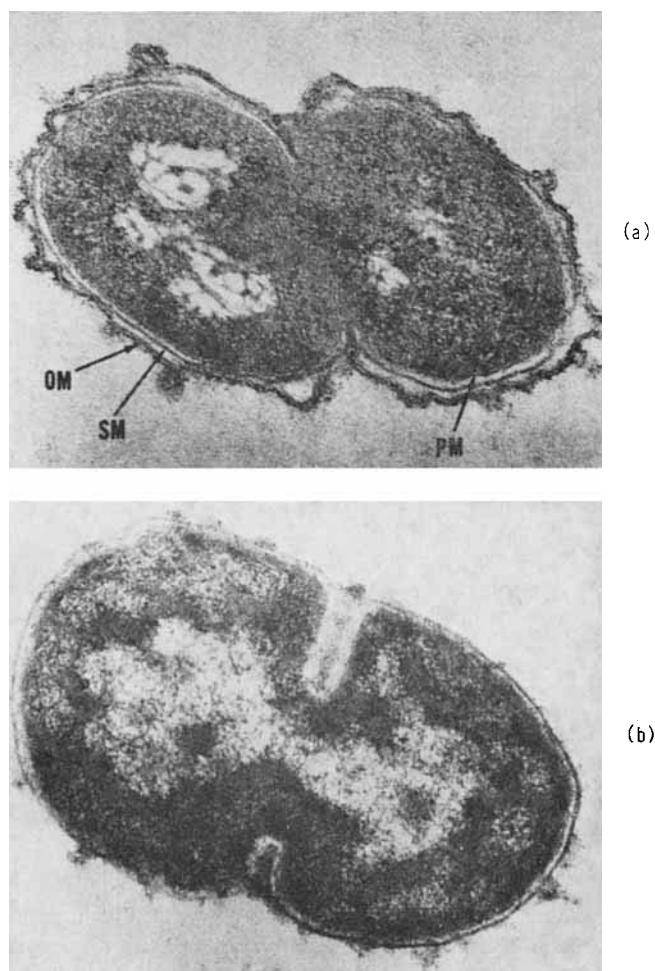


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (ca. 75000-fache Vergrößerungen) von *Veillonella*-Bakterien a) vor und b) nach Extraktion mit Phenol/Wasser [11]. OM = Zellwand, SM = Mureinring, PM = Plasmamembran.

zelle erkennen, die nach Extraktion mit Phenol/Wasser auftreten. Lediglich die äußere, plastische Schicht der Zelle, die Zellwand, ist abgelöst; die Zelle selbst, umgeben von der Plasmamembran und der rigiden Schicht, dem Murein, bleibt intakt. Diese Abbildungen zeigen, daß Lipopolysaccharide (mit Proteinen und Lipoiden komplexiert) auf der Oberfläche der Bakterienzelle lokalisiert sind, und es liegt nahe anzunehmen, daß sie in dieser exponierten Lage eine besondere Rolle bei der Auseinandersetzung zwischen Bakterienzelle und Wirtsorganismus spielen. In der Tat können durch Injektion von isoliertem Lipopolysaccharid viele der bei Infektionen auftretenden Krankheitserscheinungen hervorgerufen werden.

Unter den mannigfachen endotoxischen Aktivitäten der Lipopolysaccharide ist ihre pyrogene Wirkung besonders eindrucksvoll (Abb. 2). Die Injektion von 1 µg bewirkt am Menschen (und entsprechend kleinere Mengen am Versuchstier) nach kurzer Latenzzeit einen Fieberstoß auf 40 °C. Gleichzeitig treten drastische Veränderungen im weißen Blutbild auf; einem raschen Abfall der Leukozytenzahl (Leukopenie) folgt ein starker Anstieg (Leukocytose). Viele andere biologische Reaktionen werden von Lipopolysacchariden ausgelöst, z. B. das Shwartzman-Phänomen, Tumornekrose, Blutdruckveränderungen, Fibrinolyse, Ver-

[4] F. Ørskov, I. Ørskov, B. Jann, K. Jann, E. Müller-Seitz u. O. Westphal, Acta pathol. microbiol. scand. 71, 339 (1967).

[5] D. A. R. Simmons, European J. Biochem. 11, 554 (1969).

[6] A. Boivin u. L. Mesrobeanu, Revue d'Immunologie 1, 553 (1935).

[7] W. T. J. Morgan, Biochem. J. 31, 2003 (1937).

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

[9] O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforsch. 7b, 148 (1952).

[10] C. Galanos, O. Lüderitz u. O. Westphal, European J. Biochem. 9, 245 (1969).

[11] H. A. Bladen u. S. E. Mergenhagen, J. Bacteriol. 88, 1482 (1964).

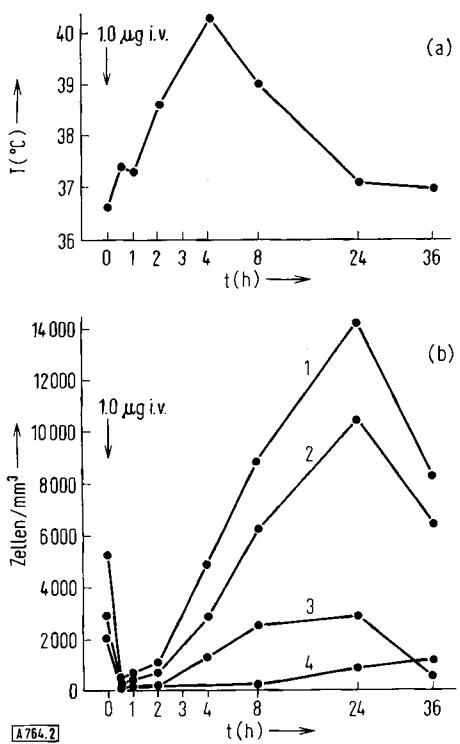


Abb. 2. Veränderungen a) der Körpertemperatur und b) des weißen Blutbildes nach Injektion von 1.0 µg eines Salmonella-Lipopolysaccharids beim Menschen. 1: Gesamt-Leukocyten; 2: Granulocyten; 3: Stabkernige; 4: Lymphocyten.

änderung der Resistenz gegenüber Infektionen, Adjuvans-Wirkungen; die Applikation größerer Mengen Lipopolysaccharid führt zum Tod der Versuchstiere [12–14].

Neben diesen unspezifischen, endotoxischen, von allen Lipopolysacchariden gleichermaßen ausgelösten Reaktionen entfalten diese Substanzen hochspezifische Wirkungen im Tier. Lipopolysaccharide sind die O-Antigene der Bakterien, und ihre Applikation stimuliert die Produktion O-spezifischer Antikörper, welche gegen begrenzte Strukturen im Lipopolysaccharid-Molekül gerichtet sind, mit dem immunisiert wurde.

Die Zellwände haben gelegentlich eine weitere, höchst spezifische Eigenschaft: Sie können als Rezeptoren für eine Anzahl von Phagen fungieren [15, 16]. Abbildung 3a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Lindberg [17], die nach Inkubation von Felix-O1-Phagen mit dem Lipopolysaccharid aus der *S. minnesota*-Mutanten Ra (s. Tabelle 6) erhalten wurde. Die Schwanzenden der Phagen haben mit dem kettenförmig aggregierten Lipopolysaccharid reagiert. Die Phagenköpfe, die ihren Inhalt ausgestoßen haben, sind als leere (inaktivierte) Hüllen („ghosts“) erkenn-

[12] M. Landy u. W. Braun: Symposium über „Bacterial Endotoxins“. Rutgers Univ. Press, New Brunswick 1964.

[13] A. Nowotny: Symposium über „Molecular Biology of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides“, Ann. New York Acad. Sci. 133, 279–786 (1966).

[14] L. Chédid: La Structure et les Effects Biologiques des Produits Bactériens provenants de Germes Gram-Négatifs. Coll. Intern. C.N.E.S., Paris, 24.–26. Okt. 1967, Bd. 174, (1969).

[15] W. F. Goebel u. M. A. Jesaitis, J. exp. Med. 96, 425 (1952).

[16] W. Weidel u. E. Kellenberger, Biochim. biophysica Acta 17, 1 (1955).

[17] A. A. Lindberg, J. gen. Microbiol. 48, 225 (1967).

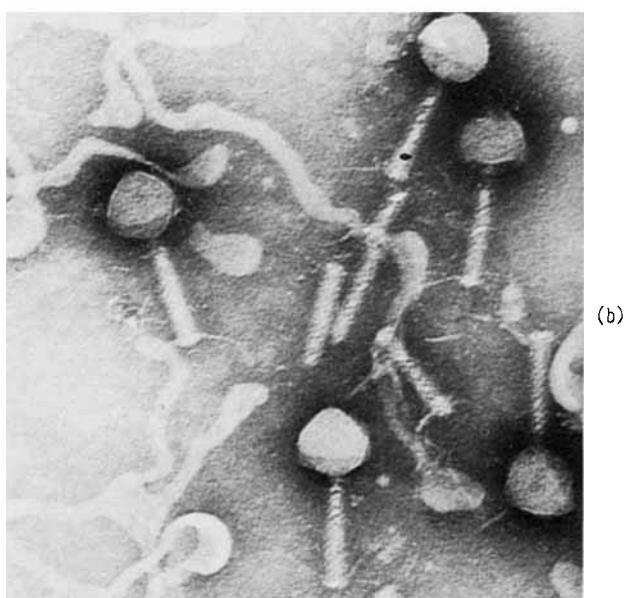
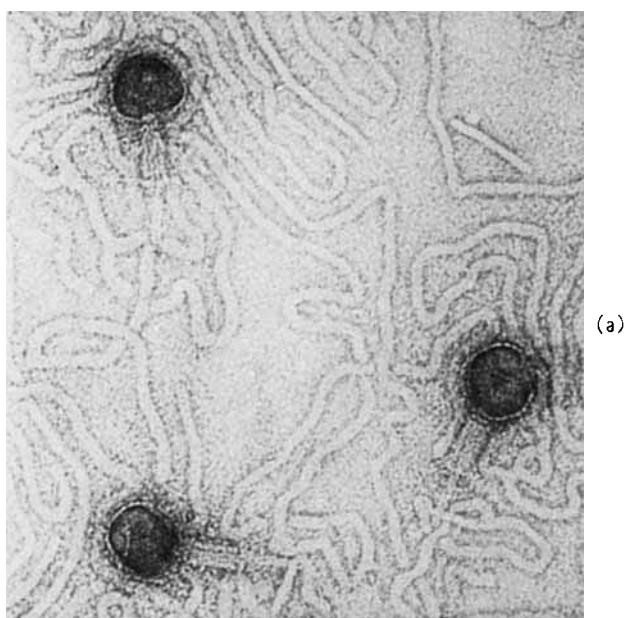


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (ca. 400000-fache Vergrößerungen) von Felix-O1-Phagen in Mischung mit Lipopolysacchariden a) aus *S. minnesota* Ra und b) aus *S. minnesota* Rb. Die Phagen haben nur mit dem Ra-Lipopolysaccharid reagiert (nach [17]).

bar. Die hohe Spezifität dieser Reaktionen geht aus dem Versuch der Abbildung 3b hervor. Hier wurde der gleiche Phage mit dem Lipopolysaccharid eines nahe verwandten Stammes, der *S. minnesota*-Mutanten Rb (s. Tabelle 6), inkubiert. Dieses Lipopolysaccharid unterscheidet sich vom vorigen lediglich durch die Abwesenheit eines terminalen Zuckers im Molekül, nämlich *N*-Acetylglucosamin. Diese geringfügige strukturelle Veränderung bedingt eine drastische Veränderung hinsichtlich der Rezeptoraktivität. Die Phagenschwänze treten nicht mit diesem Lipopolysaccharid in Kontakt, und die Phagen sind nicht inaktiviert.

Das bisher Gesagte macht deutlich, daß die Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien eine einzigartige, große Klasse biologisch höchst interessanter Naturstoffe bilden. Unmittelbar stellt sich die Frage nach

dem Bauprinzip dieser Substanzen, nach ihrer Wirkungsweise in vivo sowie nach biologisch aktiven Bezirken, die diese Makromoleküle befähigen, als Antigene, als Endotoxine^[12-14] oder als Phagenrezeptoren zu wirken.

3. Allgemeines Bauprinzip der Lipopolysaccharide

Bereits um 1960, bevor strukturrematische Untersuchungen begonnen wurden, führten einige analytische und biochemische Ergebnisse zu der Annahme, daß Lipopolysaccharide nach einem gemeinsamen Bauprinzip aufgebaut sind und aus drei Regionen verschiedener Struktur bestehen. Dieses Konzept (Abb. 4) erwies sich als richtig.

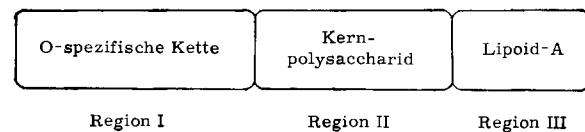


Abb. 4. Die drei Bauelemente der Lipopolysaccharide und ihre Verknüpfung.

Alle Lipopolysaccharide enthalten eine Lipoidkomponente, das *Lipoid-A* (Region III), an welches das *Kernpolysaccharid* (Region II) geknüpft ist. In nahe verwandten Lipopolysacchariden, z. B. denen aus Salmonellen, ist die Struktur des Kernpolysaccharids identisch oder sehr ähnlich. An die Region II sind die *O-spezifischen Ketten* (Region I) gebunden. Es ist dieser

Teil des Moleküls, der die Lipopolysaccharide verschiedener Spezies voneinander differenziert. Die Zuckerzusammensetzung der Region I, die Sequenz der Zucker in der Kette sowie die Art ihrer Bindungen sind spezifisch für jedes individuelle Lipopolysaccharid. Die Region I ist Träger der serologischen Spezifität; sie bedingt die enge Korrelation, die zwischen serologischer Klassifizierung in Serotypen und chemischer Klassifizierung in Chemotypen besteht.

Man muß sich vergegenwärtigen, daß in der Natur zahllose gram-negative Spezies (Serotypen) vorkommen, von denen bereits jetzt Tausende in den verschiedensten Genera identifiziert und charakterisiert sind. Entsprechend stehen prinzipiell Tausende serologisch verschiedener Lipopolysaccharide zur Verfügung, und tatsächlich sind in den letzten Jahren mehrere Hundert isoliert worden. Alle Lipopolysaccharide haben die allgemeine Struktur wie in Abbildung 4. Diese Substanzklasse ist daher ein ideales Objekt für vergleichende Untersuchungen.

4. Die Zuckerzusammensetzung von *Salmonella*-Lipopolysacchariden

Die in *Salmonella*-Lipopolysacchariden identifizierten Zuckerbausteine sind in Tabelle 2 aufgeführt^[18, 19]. Ihrem komplexen Aufbau entsprechend enthalten sie mindestens fünf, höchstens neun Zucker. Die 18 gefundenen Monosaccharide können in zwei Gruppen

Tabelle 2. *Salmonella*-Lipopolysaccharide: Zuckerzusammensetzung und Klassifizierung in Chemotypen [3]. ● = Basaler Zucker, ○ = spezifischer Zucker.

Chemotyp	3-Amino-3,6-dideoxyglucose	3-Amino-3,6-dideoxygalactose	2-Amino-2,6-dideoxyglucose	D-Mannosamin	D-Galactosamin	D-Glucosamin	2-Oxo-3-dideoxyoctonäure	L-Glycero-D-mannoheptose	D-Galaktose	D-Glucose	D-Mannose	L-Fucose	L-Rhamnose	D-Ribose	Colitose	Arabose	Paratose	Tyvelose	O-Gruppen
I						●				●									V, X, Y
II						●				●									L, P, 51
III						●				●									C ₁ C ₄ , H
IV						●				●									K, R
V						●				●									W
VI						●				●									G, N, U
VII						●				●									59
VIII						●				●									53, 57
XXV						●				●									52
IX						●				●									56
X						●				●									O
XI						●				●									Z
XII						●				●									I
XIII						●				●									E, F, 54
XIV						●				●									B, C ₂ , C ₃
XV						●				●									A
XVI						●				●									D ₁ , D ₂
XXXIV						●				●									J
XXXV						●				●									T
XXXVI						●				●									58
XXXVII						●				●									S
XXXVIII						●				●									55
XXXII	○ ○	○	○ ○		○ ○	○ ○	●	●	●	●	●	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	M (28 ₁ , 28 ₂)
XXXIX	○ ○		○ ○			○ ○	●	●	●	●	●	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	Q
XXXX	○ ○				○ ○	○ ○	●	●	●	●	●	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	M (28 ₁ , 28 ₂)

eingeteilt werden: Die fünf „basalen“ Zucker sind Bestandteile aller Lipopolysaccharide; sie bauen das Kernpolysaccharid (Region II) auf und werden in Abschnitt 6 besprochen. Die „spezifischen“ Zucker kommen in mehreren Kombinationen vor, von denen jede einem Chemotyp entspricht, der das Lipopolysaccharid charakterisiert. Während einige Zucker weit verbreitet in Naturstoffen vorkommen, wurden andere erstmalig in Lipopolysacchariden aufgefunden, wie die Gruppe der stereoisomeren 3,6-Didesoxyhexosen oder die 2- und 3-Amino-6-desoxyhexosen. Es ist sehr wohl möglich, daß die Liste der Chemotypen unvollständig ist und daß in *Salmonella*-Lipopolysacchariden noch neue Zucker entdeckt werden.

Das Prinzip der Methode sei kurz erwähnt: Die durch Hydrolyse vollmethylierter Polysaccharide erhaltenen partiell methylierten Zucker werden in die *O*-Acetyl-*O*-methyl-alditole überführt. Diese werden anschließend durch kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie identifiziert. Ein Vorteil dieser Methoden ist die Unabhängigkeit von individuell synthetisierten, partiell methylierten Vergleichszuckern. Durch Untermethylierung von Standard-Monosacchariden können sämtliche partiell methylierte Derivate hergestellt werden. Die Komponenten einer derartigen Mischung lassen sich nach Reduktion und Acetylierung gaschromatographisch und massenspektrometrisch erkennen und charakterisieren (Retentionszeiten).

Die Ergebnisse der Strukturanalyse haben gezeigt, daß *O*-spezifische Seitenketten aus einer Folge sich wiederholender gleicher Oligosaccharideinheiten, den „Re-

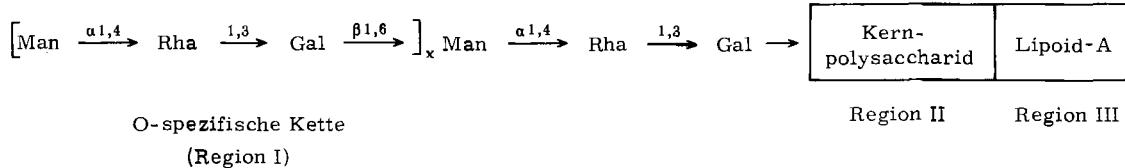


Abb. 5. Struktur der O-spezifischen Ketten (Region I) im Lipopolysaccharid von *S.newington* (3, 15) [21].

In Lipopolysacchariden aus anderen Genera wurden folgende Zucker zusätzlich gefunden: 4-Amino-6-desoxy-D-glucose und -D-galaktose; 2-Amino-6-desoxy-D-glucose, -D- und -L-galaktose, -L-mannose; D-Glycero-D-manno- und -D-galaktose-heptose; 2-Aminohexose; 6-Desoxy-L-talose; D-Rhamnose; Ascarylose; Glucuronsäure; Galakturonsäure (siehe [19, 20]).

5. Die O-spezifischen Ketten (Region I)

5.1. Die Struktur O-spezifischer Ketten einiger Lipopolysaccharide

Die Erkenntnis, daß die spezifischen Zucker ausschließlich am Aufbau der O-spezifischen Ketten (Region I) beteiligt sind, hat die Erforschung dieses Teiles der Lipopolysaccharide wesentlich gefördert und in einigen Fällen zur vollständigen Aufklärung der Struktur geführt. Diese Ergebnisse verdanken wir vornehmlich Staub et al. [18–20] sowie Robbins et al. [21], die mit immun-chemischen Methoden Fragmente aus Partialhydrolysaten der Polysaccharide analysierten und die Gesamtstruktur der Region I rekonstruierten konnten. Die vorgeschlagenen Strukturen bestätigten und ergänzten Lindberg et al. mit neuen Methoden der Methylierungsanalyse [22–24].

- [18] O. Lüderitz, A. M. Staub u. O. Westphal, Bacteriological Reviews 30, 192 (1966).
- [19] O. Lüderitz, K. Jann u. R. Wheat in M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry. Bd. 26 A, Elsevier, Amsterdam 1968, S. 105.
- [20] O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub u. H. Nikaido in S. J. Ajl, G. Weinbaum u. S. Kadis: Microbial Toxins. Academic Press, Bd. III, im Druck.
- [21] P. W. Robbins u. T. Uchida, Biochemistry 1, 323 (1962).
- [22] H. Björndal, C. G. Hellerqvist, B. Lindberg u. S. Svensson, Angew. Chem. 82, 643 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, Heft 8 (1970).
- [23] C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme u. A. A. Lindberg, Carbohydrate Res. 8, 43 (1968).
- [24] C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme u. A. A. Lindberg, Carbohydrate Res. 9, 237 (1969).

peating Units“, aufgebaut sind, wie dies am Beispiel des Lipopolysaccharids von *S.newington* (3, 15) in Abbildung 5 dargestellt ist [21]. Die spezifische Kette (Region I) enthält 10 bis 20 Trisaccharideinheiten aus Mannose, Rhamnose und Galaktose. Sie ist im Lipopolysaccharid über das Kernpolysaccharid an Lipoid-A gebunden.

Tabelle 3 zeigt Repeating Units, die in den Lipopolysacchariden der *Salmonella*-Gruppen B, D und E die spezifischen Ketten aufbauen [19, 20, 21, 24]. Sie alle enthalten ein gemeinsames Trisaccharid mit Mannose,

Tabelle 3. Die Repeating Units der O-spezifischen Ketten in Lipopolysacchariden der *Salmonella*-Gruppen B, D und E [18, 21, 23, 24].

Sero-gruppe	O-Faktoren	Repeating Units
E ₁	3, 10	6 → Man → $\alpha 1,4$ → Rha → $1,3$ → Ac Gal → 1
E ₂	3, 15	6 → Man → $\alpha 1,4$ → Rha → $1,3$ → Gal → $\beta 1$
E ₃	(3), (15), 34	6 → Man → $\alpha 1,4$ → Rha → $1,3$ → Gal → $\beta 1,4$
E ₄	1, 3, 19	6 → Man → $\alpha 1,4$ → Rha → $1,3$ → Gal → $\beta 1,6$ → 1
D ₂	(9), 46	6 → Man → $\alpha 1,4$ → Rha → $1,3$ → Gal → 1 ↓ $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1
B	1, 4, 12	2 → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1 2-Ac-Abe → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1
B	1, 4, 5, 12	2 → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1 Abe → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1
B	1, 4, 12, 27	6 → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1 Abe → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $1,3$ → Gal → 1
D ₁	9, 12	2 → Man → $\alpha 1,3$ → 1,4 → Rha → $\alpha 1,3$ → Gal → 1 Tyy → 2-Ac-Glc

Rhamnose und Galaktose in der Hauptkette, unterscheiden sich jedoch bezüglich der Bindungen und Substituenten.

Oligosaccharid-Einheiten, die aus Lipopolysacchariden anderer *Salmonella*-Gruppen isoliert wurden, sind in

Tabelle 4. Struktur der O-spezifischen Ketten in Lipopolysacchariden der *Salmonella*-Gruppen L, G, N, U, C [18, 25].

Sero-gruppe	O-spezifische Kette
L (21)	$\rightarrow \left[\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \downarrow \\ \text{Gal} \end{array} \right] \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GalNAc} \xrightarrow{\downarrow \alpha} \text{GalNAc} \rightarrow \dots$
G (13, 22)	$\rightarrow \left[\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \xrightarrow{\beta 1,3} \text{Glc?} \\ \text{GalNAc} \end{array} \right] \xrightarrow{1,3} \text{GalNAc} \rightarrow \text{Fuc} \rightarrow \dots$
N (30)	$\rightarrow \left[\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \downarrow 1,3 \\ \text{Glc} \\ \downarrow 1,4 \\ \text{GalNAc} \end{array} \right] \rightarrow \text{Fuc} \rightarrow \dots$
U (43)	$\rightarrow \left[\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \downarrow \alpha 1,3 \\ \text{Gal} \end{array} \right] \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GalNAc} \xrightarrow{1,3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1,4} \text{Fuc} \rightarrow \dots$
C (6, 7)	$\rightarrow \left[\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \downarrow 1,3 \\ \left[\begin{array}{c} \text{Man} \xrightarrow{1,2} \\ \text{Man} \end{array} \right]_2 \end{array} \right] \xrightarrow{1,2} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{Man} \xrightarrow{1,3} \text{GlcNAc} \rightarrow \dots$

Tabelle 4 aufgeführt [18, 25]. Wie zu erwarten (vgl. Tabelle 2), unterscheiden sie sich beträchtlich in Zuckerzusammensetzung und Struktur von den strukturell miteinander verwandten Oligosacchariden der Tabelle 3.

Die in Abbildung 5 sowie in den Tabellen 3 und 4 aufgeführten Oligosaccharid-Einheiten vermitteln uns einen bescheidenen Eindruck von der Mannigfaltigkeit der in Bakterien realisierten Lipopolysaccharid-Strukturen; sie lassen aber gleichzeitig ein Ordnungsprinzip erkennen: Identische Repeating Units bilden die Struktureinheiten der Seitenketten.

Die beschriebenen Ergebnisse führen zu einer Reihe von Fragen, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden sollen. Die O-spezifischen Ketten sind Träger der serologischen Spezifität der Lipopolysaccharide: Welches sind die chemischen Strukturen, die den serologischen Determinanten, den Antigen-Faktoren des Kauffmann-White-Schemas (vgl. Tabelle 1), entsprechen? Wie werden die Ketten in der Zelle synthetisiert, und wie ist ihre Biosynthese genetisch determiniert? Wir haben gesehen, daß der Aufbau der Seitenketten in Lipopolysacchariden verschiedener Spezies sehr ähnlich sein kann (Tabelle 3): Bestehen genetische Beziehungen innerhalb dieser Spezies? Die Beantwortung dieser Fragen war ein wesentliches Ziel der Forschung in den letzten Jahren.

5.2. Die Lokalisierung determinanter Gruppen (O-Antigen-Faktoren) in O-spezifischen Ketten

Immun-chemische Untersuchungen führten Staub [18, 20] und Robbins [26] zur Identifizierung konkreter Strukturen in den O-spezifischen Ketten, den determinanten Gruppen, die als Träger der Spezifität der O-Faktoren des Kauffmann-White-Schemas fungieren. In Präzipitations-Hemmungsversuchen wird zunächst dasjenige Monosaccharid ermittelt, welches ein Faktor/Antifaktor-System am besten hemmt. Das Monosaccharid, das die größte Affinität zum Antifaktor-

[25] N. Fuller, M. Etiévant u. A. M. Staub, European J. Biochem. 6, 525 (1968).

[26] T. Uchida, P. W. Robbins u. S. E. Luria, Biochemistry 2, 663 (1963).

Antikörper besitzt, wird als *immundominanter Zucker* [18] bezeichnet (Abequose im 4/anti-4-System, Mannose im 3/anti-3-System etc.). Anschließend werden Oligosaccharid-Fragmente, die den immundominanten Zucker enthalten, in analoger Weise im Präzipitations-Hemmungstest untersucht: Dasjenige Oligosaccharid, welches die stärkste Hemmwirkung entfaltet, hat die gleiche Struktur wie der untersuchte O-Faktor. In Abbildung 6 sind die Strukturen determinanter Gruppen und ihre Lokalisierung in O-spezifischen Ketten dargestellt [18, 20].

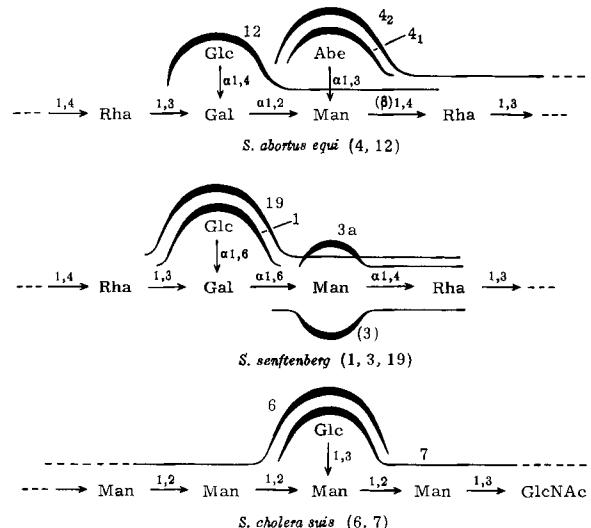


Abb. 6. Verteilung serologisch determinanter Gruppen entlang der O-spezifischen Kette von Lipopolysacchariden [18, 20].

Diese Untersuchungen haben folgendes gezeigt [20]: a) Theoretisch kann jeder Zuckerbaustein als immundominanter Zucker fungieren. b) Die determinanten Strukturen überlappen entlang der Kette (z. B. Faktoren 12 und 4, 19 und 3a). c) Gegen einen immundominanten Zucker wird eine *Familie von Antikörpern* produziert, die kleinere oder größere Bezirke der determinanten Gruppe erfaßt (z. B. Faktoren 4₁, 4₂ und 1,19). d) Vom immundominanten Zucker aus kann sich die determinante Gruppe zu den rechten und/oder linken Nachbarzuckern erstrecken (z. B. Faktoren 6 und 7). e) Das Kauffmann-White-Schema wurde von Kauffmann bewußt vereinfacht; viele O-Faktoren können in Subfaktoren differenziert werden (z. B. Faktor 4 in 4₁, 4₂; Faktor 3 in (3), 3a).

5.3. Die Biosynthese der O-spezifischen Ketten (Region I)

Die Reaktionsschritte, die im Laufe der Biosynthese der spezifischen Ketten durchlaufen werden, sind in Abbildung 7 am Beispiel von *S. newington* (3,15) dargestellt [27-30]. Alle Zwischenprodukte sind über eine Pyrophosphatbrücke an ein Trägerlipoid, das „Antigen Carrier Lipid“ (ACL), gebunden, einen Polyiso-

[27] H. Nikaido, Advances in Enzymol. 31, 77 (1968).

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

[29] B. L. Horecker, Annu. Rev. Microbiol. 20, 253 (1966).

[30] R. Losick u. P. W. Robbins, Sci. American 221, 121 (1969).

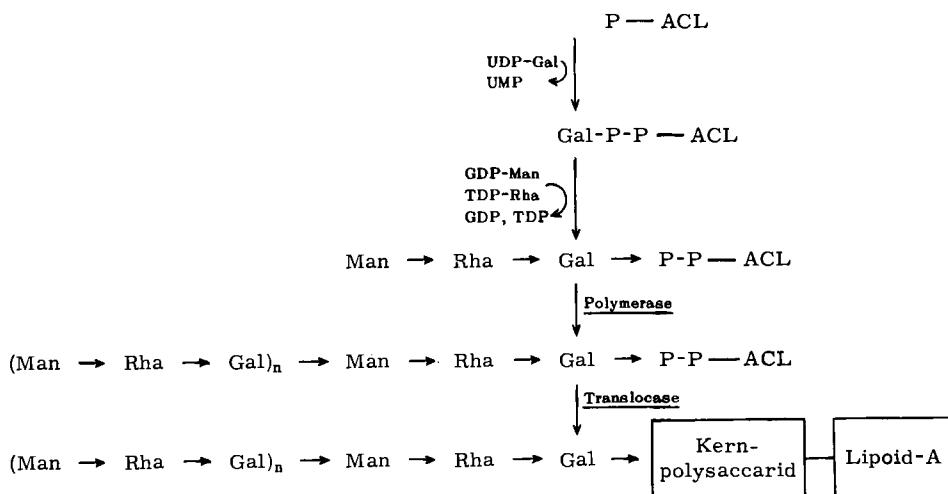
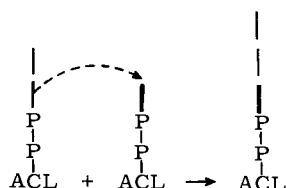


Abb. 7. Biosynthese der O-spezifischen Kette im Lipopolysaccharid von *S. newington* (3, 15) [30] (s. auch [27]).
ACL (Antigen Carrier Lipid) = $H(CH_2-C(CH_3)=CH-CH_2)_{11}-O$

prenoidalalkohol mit 55 C-Atomen. Im ersten Schritt werden die Zuckerreste aus den aktivierte Derivaten (im Falle *S. newington* UDP-Galaktose, TDP-Rhamnose und GDP-Mannose) mit spezifischen Transferasen zu einer Repeating Unit verknüpft. Anschließend werden diese Einheiten durch das Enzym Polymerase polymerisiert, wobei die Kette jedesmal um eine Repeating Unit verlängert wird. Dies geschieht in der Weise, daß jeweils das bereits polymerisierte Kettenstück (—) auf eine neue Repeating Unit (—) übertragen wird. Die Kette wächst daher am reduzierenden Ende [31].



Schließlich wird die fertige Seitenkette vom Enzym Translocase auf das vorfabrizierte Kernpolysaccharid-Lipoid-A übertragen. Die Syntheseschritte wurden *in vitro* studiert. Es zeigte sich, daß Substituenten wie Glucosyl oder Acetyl (jedoch nicht Abequosyl oder Tyvelosyl) erst auf das fertige Lipopolysaccharid transferiert werden [30].

Man glaubt, daß ACL als Anker zur Zellmembran fungiert, an der sich die Synthese der spezifischen Ketten vollzieht, und daß es beim Transport der Polysaccharide durch die Membran mitwirkt. Eine analoge Rolle könnte dem Lipoid-A bei der Synthese des Kernpolysaccharids zukommen. Der letzte Schritt, die Verknüpfung der beiden Polymeren (Region I und Regionen II, III), geschieht möglicherweise außerhalb der Membran. Lipoidträger spielen auch bei der Synthese anderer Polysaccharide eine Rolle (vgl. Mureinsynthese [32]).

[31] P. W. Robbins, A. Wright u. J. L. Bellows, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1302 (1964).

[32] J. M. Ghysen, J. L. Strominger u. D. J. Tipper in M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry. Bd. 26 A, Elsevier, Amsterdam 1968, S. 53.

5.4. Die genetische Determinierung der Biosynthese der spezifischen Ketten: SR-Mutanten

Gleichzeitig mit der Aufklärung des Biosynthesewegs der Region I führten genetische Untersuchungen in den Laboratorien von Stocker, Mäkelä und Nikaido zur Identifizierung eines Genbezirks (in der Nähe des *his*-Ortes), der die Synthese nahezu aller Enzyme determiniert, die am Aufbau der spezifischen Ketten beteiligt sind [33, 34, 34a]. Dieser Genbezirk, der O-Locus, wurde mit *rfb* bezeichnet (Abb. 8). Mutationen im

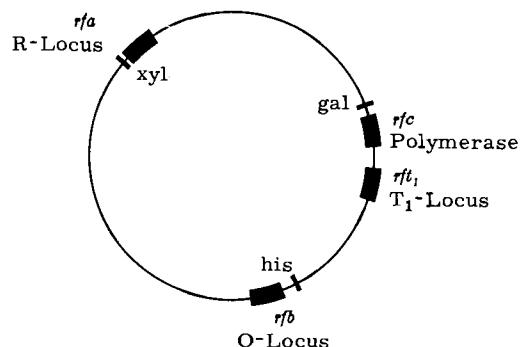


Abb. 8. Das Chromosom von *S. typhimurium* mit den Genorten der Lipopolysaccharid-Synthese [33].

rfb-Ort und die Konsequenzen für die Lipopolysaccharid-Synthese werden in Abschnitt 6.3 besprochen.

Eine Ausnahmestellung nimmt das Enzym Polymerase ein (s. Abb. 7). Für seine Synthese ist der Genort *rfc*, nahe dem *gal*-Locus, verantwortlich [35]. Mutationen, die *rfc* betreffen, führen zu einem Defekt der Polymerase-Synthese, wodurch die Polymerisation der

[33] B. A. D. Stocker, R. G. Wilkinson u. P. H. Mäkelä, New York, Acad. Sci. 133, 334 (1966).

[34] B. A. D. Stocker in: *La Structure et les Effects Biologiques des Produits Bactériens provenants de Germes Gram-Négatifs*, Coll. Intern. C.N.R.S., Paris, 24.–26. Okt. 1967, Bd. 174, 189 (1969).

[34a] P. H. Mäkelä u. B. A. D. Stocker, Annu. Rev. Genetics 3, 291 (1969).

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

Repeating Units blockiert ist. In *rfc*-defekten Mutanten werden die Zucker zu *einer* Repeating Unit verknüpft und dann direkt auf das Kernpolysaccharid übertragen. Die Struktur eines *rfc*-Lipopolysaccharids zeigt Abbildung 9. Da diese Klasse von Mutanten

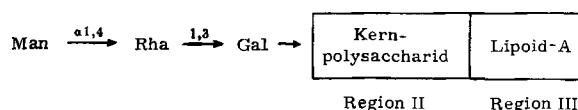


Abb. 9. Struktur des Lipopolysaccharids einer SR-Mutanten (*S. newington*) [35, 36].

bakteriologisch und serologisch eine Zwischenstellung zwischen S-Formen und R-Mutanten (s. Abschnitt 6.1) einnimmt, wurde sie als SR, *semi*-rauh, bezeichnet.

5.5. Eine genetische Basis für strukturelle Verwandtschaften bei Lipopolysacchariden verschiedener Spezies: Lysogene Konversionen

Tabelle 3 zeigte, daß sich mehrere *Salmonella*-Spezies hinsichtlich der Struktur ihrer Lipopolysaccharide ähneln können, obwohl sie serologisch keine Beziehungen zueinander haben (z. B. Gruppen B und E). Die Ursache solcher Verwandtschaften kann in vielen Fällen auf ein offensichtlich häufig auftretendes Phänomen zurückgeführt werden: die lysogene Konversion von *Salmonella*-Spezies durch temperante (nicht virulente) Phagen. Die Aufklärung der chemischen und biochemischen Prinzipien, die der Konversion zugrunde liegen, verdanken wir wiederum *Staub* [18, 20] und *Robbins* [26, 30, 36].

Abbildung 10 zeigt ein Beispiel [30]: Wird *S. anatum* (3,10) mit dem Phagen $\epsilon 15$ infiziert, so entsteht *S. newington* (3,15). Nach Superinfektion dieser Spezies

in *S. illinois* tragen die β -Galaktosylreste in 4-Stellung eine Glucosylseitenkette.

Obwohl die komplexen Vorgänge bei der lysogenen Konversion im Einzelnen noch nicht bekannt sind, ist es offensichtlich, daß das Phagengenom (Phagen-Nucleinsäure) nach Einbau in das Wirts-Chromosom (mit dem zusammen es an die folgenden Generationen weitergegeben wird) bestimmte Schritte der Lipopolysaccharid-Biosynthese beeinflußt und umdirigiert. So werden im obigen Beispiel Enzymaktivitäten des Wirtes unterdrückt (Acetylierung und α -Verknüpfung der Galaktose [37]) und andere, die im Wirt nicht manifestiert waren, neu eingeführt (β -Verknüpfung der Galaktose, Einführung einer Glykosyl-Seitenkette). Alle bislang untersuchten Konversionen betreffen Substituenten der spezifischen Kette oder Veränderung der Spezifität von Polymerasen.

Im Kauffmann-White-Schema (vgl. Tabelle 1) sind die Faktoren 3 und 15 von *S. illinois* in Klammern gesetzt ((3), (15)), um anzudeuten, daß sie mit den Faktoren 3 und 15 von *S. newington* serologisch kreuz-reagieren, jedoch nicht identisch mit ihnen sind. In *S. illinois* bestimmt Glucose die Spezifität von Faktor 34. Gleichzeitig modifiziert Glucose die Spezifität der β -Galaktose, an die sie gebunden ist. Im Gegensatz zur unsubstituierten Galaktose mit der Spezifität 15 determiniert die substituierte Galaktose die Spezifität (15), d. h. nicht alle Antikörper gegen unsubstituierte Galaktose „passen“ auf die substituierte Galaktose. In ähnlicher Weise wird die mannose-determinierte Spezifität des Faktors 3 durch die Gegenwart von Glucose beeinflußt.

Die stete Auffindung neuer Konversions-Systeme zeigt, daß viele *Salmonella*-Spezies genetisch verwandt sind. Man kann sich fragen, in welchem Maß die Vielfalt der *Salmonella*-Spezies auf lysogener Konversion beruht, oder, mit anderen Worten, wieviele Gene in den Chromosomen der Salmonellen von Prophagen stammen, die im Laufe der Evolution integriert wurden.

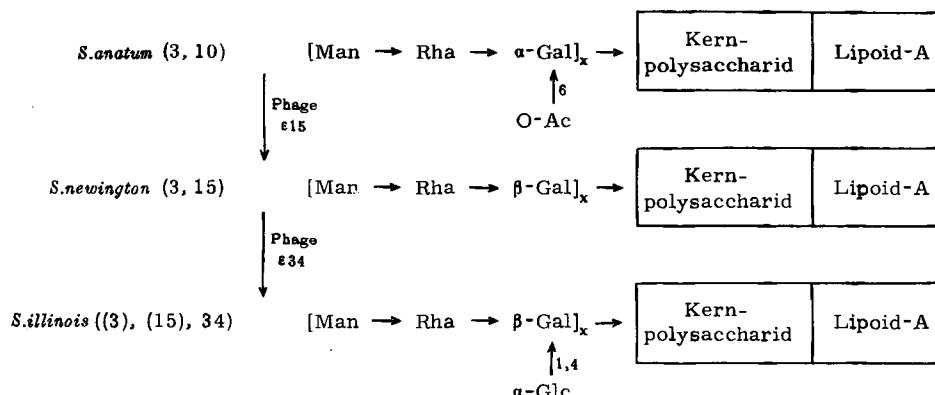


Abb. 10. Lysogene Konversion in der *Salmonella*-Gruppe E [26, 30].

mit dem Phagen $\epsilon 34$ wird *S. illinois* ((3), (15), 34) erhalten. Den serologischen Veränderungen (10 → 15 → 34) entsprechen spezifische Modifikationen an den Strukturen der spezifischen Ketten der Lipopolysaccharide (Abb. 10). *S. anatum* enthält α -gebundene acetylierte Galaktosylreste, in *S. newington* ist Galaktose β -glykosidisch gebunden und nicht acetyliert, und

[36] R. Losick u. P. W. Robbins, J. molecular Biol. 30, 445 (1967).

5.6. *Salmonella*-Mutanten mit atypischen spezifischen Ketten: T-Formen

1956 wurden in mehreren europäischen Kliniken zwei *Salmonella*-Stämme isoliert, die mit keinem der bekannten diagnostischen O-Seren typisiert werden konnten. *Kauffmann* [1, 2], der diese serologisch stark kreuz-reagierenden Stämme zur Typisierung erhielt,

[37] R. Losick, J. molecular Biol. 42, 237 (1969).

zögerte, sie einer neuen *Salmonella*-Gruppe zuzuordnen. Ihre weitere Untersuchung ergab nämlich, daß sie bezüglich ihrer Flagellen-Antigene und ihrer fermentativen Eigenschaften mit *S. paratyphi* B bzw. *S. typhimurium* identisch waren. Daraus schloß *Kauffmann*, daß es sich bei den neuen Stämmen um Mutanten dieser Spezies handelt, in welchem das O-Antigen durch ein neues, gemeinsames Antigen ersetzt ist, welches er T1-Antigen nannte (T = transient, weil T-Formen relativ unstabil sind und leicht in R-Formen übergehen). Später fand *Schlosshardt*, daß prinzipiell sehr viele, möglicherweise alle *Salmonella*-Spezies durch Mutation in T1-Formen übergehen können [38]. In natürlichem Material sind T1-Formen jedoch nur selten gefunden worden.

1957 identifizierte *Kauffmann* eine von T1 verschiedenen Mutante aus *S. bareilly*, die er mit T2 bezeichnete [1, 2].

Die Phenol/Wasser-Extraktion von T1- und T2-Formen führt zu T1- und T2-Lipopolsacchariden, welche wie alle *Salmonella*-Spezies die fünf „basalen“ Zucker enthalten (Tabelle 2). In T1-Lipopolsacchariden wurden außerdem große Mengen Ribose und Galaktose gefunden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß in T1-Mutanten die O-spezifischen Ketten der Wildformen durch T1-spezifische Ketten ersetzt sind, die in gleicher Weise an das Kernpolysaccharid-Lipoid-A gebunden sind. Diese T1-spezifischen Ketten bestehen aus Ribose- und Galaktose-Einheiten. Beide Zucker liegen als Furanoside, d.h. als fünfgliedrige Ringe, vor [39, 40]. Eine derartige Polysaccharidstruktur, die in der Natur sehr selten ist, zeichnet sich durch große Säurelabilität aus, und es konnte deshalb bislang nicht entschieden werden, ob auch T1-Ketten aus Repeating Units aufgebaut sind.

Die Mutation vom Wildtyp in die T1-Form vollzieht sich in zwei Schritten (Abb. 11, vgl. auch Abb. 8): Eine Mutation betrifft den O-Locus (Block der Synthese der O-spezifischen Ketten), die andere den T1-Locus, der die Synthese der T1-Kette determiniert [41].

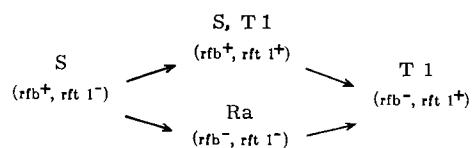


Abb. 11. Mutationsschritte, die vom Wildtyp zur T1-Mutante führen [41].

In jüngster Zeit sind *rft 1⁺*-Mutanten mit intaktem *rfb*-Locus isoliert worden. Wie erwartet, synthetisieren sie gleichzeitig O-spezifische und T1-spezifische Lipopolysaccharide [42].

[38] J. Schlosshardt, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. 177, 176 (1960).

[39] R. H. Wheat, M. Berst, E. Ruschmann, O. Lüderitz u. O. Westphal, J. Bacteriol. 94, 1366 (1967).

[40] M. Berst, C. G. Hellqvist, B. Lindberg, O. Lüderitz, S. Svensson u. O. Westphal, European J. Biochem. 11, 353 (1969).

[41] M. Sarvas u. P. H. Mäkelä, Acta pathol. microbiol. scand. 65, 654 (1965).

[42] M. Sarvas, O. Lüderitz u. O. Westphal, Ann. Med. exp. Biol. fenn. 45, 117 (1967).

Über die biologische Bedeutung von T1-Mutanten in der Natur (z.B. für die Pathogenität) ist nichts bekannt. Es ist unwahrscheinlich, daß *Salmonella*-Spezies ein Gen, *rft 1*, besitzen, das gar nicht oder nur ganz selten „angeschaltet“ wird.

6. Das Kernpolysaccharid (Region II)

6.1. Die S → R-Mutation

Während die Struktur der O-spezifischen Ketten an Lipopolysacchariden der *Salmonella*-Wildformen (S-Formen) sich aufklären ließ, waren Untersuchungen am Kernpolysaccharid (Region II) dadurch erschwert, daß dieses nur einen kleinen innenliegenden Bezirk der Makromoleküle ausmacht. Eine Lösung des Problems eröffnete sich, als Mutanten der Wildstämme, R-Formen, in die Untersuchungen einbezogen wurden. Diese Mutanten waren seit langem bekannt [1, 2]; nun erhielten sie entscheidende Bedeutung für biochemische und genetische Studien an Lipopolysacchariden, weil in ihnen Syntheseschritte der Lipopolysaccharid-Biosynthese blockiert sind.

R-Mutanten treten spontan auf und sind vor allem in älteren Kulturen zahlreich, aus denen sie aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften leicht isoliert werden können: Im Gegensatz zu den „glatt“ wachsenden Wildstämmen (smooth, daher S-Formen) bilden R-Mutanten „raue“ Kolonien (rough, daher R-Formen). Parallel mit den morphologischen Veränderungen vollziehen sich bei der Mutation drastische serologische Veränderungen: Die O-Spezifität des Elternstamms geht verloren und neue, R-Spezifitäten, manifestieren sich.

6.2. Die Klassifikation von R-Mutanten

Es ist leicht möglich, eine große Zahl von R-Mutanten aus einer einzigen *Salmonella*-Spezies zu gewinnen. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden im wesentlichen an *S. minnesota*-R-Mutanten durchgeführt, die *Schlosshardt* für uns isolierte [43]. Analoge Serien von R-Mutanten wurden u.a. aus *S. typhimurium* und *S. ruris* erhalten.

Auch R-Mutanten synthetisieren Lipopolysaccharide. Ihre Zuckerzusammensetzung unterscheidet sich jedoch charakteristisch von der der Wildtyp-Lipopolysaccharide: Alle O-spezifischen Zucker fehlen, und es treten lediglich alle oder einige der fünf basalen Zucker auf (s. Tabelle 2), die auch in den Wildformen, zusätzlich zu den spezifischen Zuckern, gefunden werden [18]. Am Aufbau von R-(Lipo)polysacchariden sind neben Aminoäthanol und Phosphat *N*-Acetyl-D-glucosamin, D-Glucose, D-Galaktose sowie zwei Zucker beteiligt, die bislang ausschließlich in bakteriellen Lipopolysacchariden gefunden wurden: L-Glycero-D-manno-heptose (in *Shigellen* entdeckt [44]) und 2-Oxo-3-desoxy-D-manno-octonsäure (KDO) (in *E. coli* identifiziert [45]). Kürzlich wurde ein weiterer Zucker in R-Lipopolysaccharid-Präparaten entdeckt und als

[43] O. Lüderitz, C. Galanos, H. J. Risse, E. Ruschmann, S. Schlecht, G. Schmidt, H. Schulte-Holthausen, R. Wheat, O. Westphal u. J. Schlosshardt, Ann. New York Acad. Sci. 133, 349 (1966).

[44] M. A. Jesaitis u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine 96, 409 (1952).

4-Amino-L-arabinose identifiziert^[45a]; seine Bindung im Molekül ist noch unbekannt, und es kann bislang nicht ausgeschlossen werden, daß er Bestandteil einer Begleitsubstanz ist.

Wie bei den Chemotypen der S-Formen (Tabelle 2) führte die vergleichende Analyse von *S.-minnesota*-R-Mutanten zu einer Klassifikation in R-Chemotypen (Ra, Rb, Rc etc.)^[43], die in gleicher Weise auf der unterschiedlichen Zuckerzusammensetzung der R-Lipopolysaccharide basiert (Tabelle 5, links). Ra-Mutanten enthalten alle fünf basalen Zucker, in Rb-Mutanten fehlt Glucosamin (im Polysaccharid-Teil; als Baustein von Lipoid-A ist Glucosamin in allen Lipopolysacchariden enthalten), Rc-Mutanten enthalten Glucose als einzige Hexose, Rd-Mutanten sind hexose-

schlossen, daß in Ra-Mutanten die Synthese der O-spezifischen Ketten (Region I) blockiert ist. Tatsächlich ergab die Analyse von Ra-Mutanten, daß jeder identifizierte Defekt ein Enzym betraf, das an der Biosynthese der Region I beteiligt ist. So hat z.B. eine Ra-Mutante von *S.minnesota* die Fähigkeit des Elternstammes verloren, N-Acetylgalaktosamin zu synthetisieren (UDP-GlcNac → UDP-GalNac). Desgleichen wurden *S.typhimurium*-Ra-Mutanten identifiziert, deren Defekte die Synthese von Rhamnose (TDP-Glc → TDP-Rha), Abequose (CDP-Glc → CDP-Abe) oder Mannose (Glc-6-P → Man-6-P) betrifft. Da der Block eines einzigen Schrittes der Biosynthese von Region I zur Unfähigkeit der Zelle führt, spezifische Ketten überhaupt aufzubauen (vgl. Abb. 7),

Tabelle 5. Chemische und serologische Klassifizierung von Lipopolysacchariden aus *S.-minnesota*-R-Mutanten [43].

		Zuckerzusammensetzung der Lipopolysaccharide (%)							Serologische Kreuzreaktionen [a]						
Chemotyp	<i>S.-minnesota</i> -Stamm	Lipoid-A	KDO	Hep	Glc	Gal	GlcN (PS) [b]	GalN	Antisera gegen die Stämme						
									S-Form	R60	R345	R5	R7	R3	R595
II	S-Form	25	5	3	4	13	10	17	+	+					
Ra	R60	45	5	7	6	8	6			+					
	R555	45	9	11	3	6	2			+					
	R708	47	10	11	4	6	2			+					
Rb	R345	50	5	10	4	9				+					
	R2	50	7	14	3	4				+					
Rc	R5	55	10	11	4					+	+				
	R8	55	8	6	5					+	+				+
Rd ₁	R7	58	9	13									+		
	R3	63	9	7									+		
	R4	65	8	7									+		
Re	R595	65	16												+
	R613	64	17												+

[a] Hämaggulutinations-Hemmungstest.

[b] (PS) = Bestimmt im Polysaccharid nach Abspaltung von Lipoid-A.

frei, und die letzte Gruppe, Re, ist hexose- und heptose-frei und enthält lediglich KDO, gebunden an Lipoid-A (Region III). Die R-Klassen unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer serologischen R-Spezifität^[43] (Tabelle 5, rechts), und schließlich ist jede R-Klasse durch ein individuelles Phagenmuster charakterisiert^[46]. Der Klassifizierung der R-Mutanten in R-Chemotypen entspricht daher eine Klassifizierung in R-Serotypen und R-Phagentypen.

6.3. Ra-Mutanten: Defekte und Genetik

Unter den R-Klassen Ra bis Re nehmen Ra-Mutanten eine Schlüsselstellung ein; ihre Untersuchung hat wesentlich zum Verständnis der Vorgänge beigetragen, die der S → R-Mutation zugrundeliegen [18, 27, 29].

Ra-Lipopolysaccharide enthalten die fünf basalen Zucker; alle O-spezifischen Zucker des Elternstammes fehlen. Aus diesen Befunden wurde frühzeitig ge-

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

[45a] W. A. Volk, C. Galanos u. O. Lüderitz, FEBS-Letters 8, 161 (1970).

[46] G. Schmidt u. O. Lüderitz, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. 210, 381 (1969).

stoppt die Lipopolysaccharid-Synthese in Ra-Mutanten dann, wenn normalerweise die spezifischen Ketten auf das Kernpolysaccharid-Lipoid-A transferiert werden. Ra-Mutanten synthetisieren daher ein Lipopolysaccharid, das lediglich aus den Bezirken II und III aufgebaut ist.

Genetische Untersuchungen von Stocker an Ra-Mutanten haben gezeigt, daß der zugrundeliegende Defekt den O-Locus (*rfb*-Ort) betrifft^[34], dessen Gene die Synthese der Enzyme determinieren, die für die Biosynthese der spezifischen Ketten benötigt werden. Ra-Mutanten können sich in ihrem Genotyp, d.h. hinsichtlich des genetischen Defekts ihres O-Locus, unterscheiden; phänotypisch sind sie jedoch identisch: Sie synthetisieren das intakte Kernpolysaccharid (Region II), gebunden an Lipoid-A (Region III).

6.4. Rb- bis Re-Mutanten: Defekte und Genetik

Während in Ra-Mutanten die Synthese der O-spezifischen Seitenketten blockiert ist, haben Rb- bis Re-Mutanten Defekte, die zu einer mehr oder weniger unvollständigen Kernstruktur führen. Dies zeigt sich in der unterschiedlichen Zuckerzusammensetzung der Lipopolysaccharide, die von Mutanten verschiedener

R-Klassen synthetisiert werden (vgl. Tabelle 5). Der Aufbau des Kernpolysaccharids vollzieht sich in diesen Mutanten normal bis zu dem Syntheseschritt, der infolge Mutation defekt ist, und erst hier bricht die Synthese ab. (Der Biosynthese der spezifischen Ketten liegt dagegen im allgemeinen ein Alles-oder-Nichts-Prinzip zugrunde (vgl. Abb. 7)). Defekte in Rb- bis Re-Mutanten können sowohl die Synthese von Zuckerausteinen als auch deren Transfer betreffen.

Genetische Untersuchungen von *Stocker*, *Mäkelä* und *Nikaido* haben zur Identifizierung des R-Locus geführt [27, 34a]. Dieser mit *rfa* bezeichnete Abschnitt des

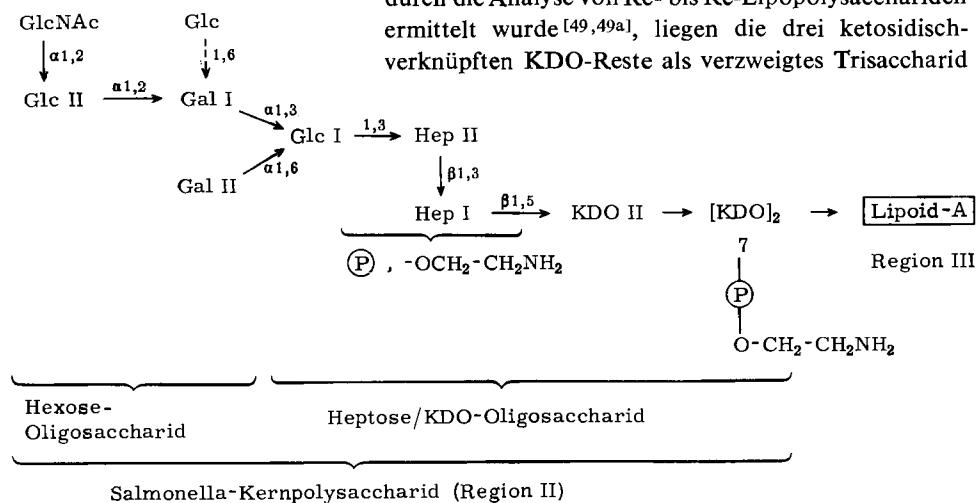


Abb. 12. Die Struktur von *Salmonella*-Ra-Lipopolysacchariden: Das Kernpolysaccharid (Region II) [18, 29].

Chromosoms determiniert viele Enzyme, die die Synthese des Kernpolysaccharids katalysieren. Er liegt weit entfernt vom O-Locus (Abb. 8).

Neben R-spezifischen Lipopolysacchariden synthetisieren die meisten Rb- bis Re-Mutanten ein Polysaccharid, welches die O-spezifischen Zuckerketten des Elternstammes enthält, jedoch frei ist von kern-spezifischen Zuckern (Heptose, KDO) und Lipoid-A [47]. Dieses „spezifische Hapten“ genannte Polysaccharid besteht aus freien, O-spezifischen Ketten (Region I). Dies ist plausibel: Da der *rbf*-Locus in *rfa*-defekten Mutanten intakt ist, kann die Synthese der spezifischen Ketten ungehindert auch nach der Mutation ablaufen. Wegen der hohen Akzeptorspezifität der Translocase (vgl. Abb. 7) werden sie jedoch nicht auf das inkomplette Kernpolysaccharid übertragen. Sie akkumulieren in der R-Zelle, und zwar am Antigen Carrier Lipid gebunden. Die sehr labile Pyrophosphatbrücke wird bei der Phenol/Wasser-Extraktion gespalten, und man findet das spezifische Hapten schließlich im Überstand der Ultrazentrifugation, während das R-Lipopolysaccharid sedimentiert.

6.5. Die chemische Struktur des Kernpolysaccharids

Abbildung 12 zeigt die Struktur des *S.-minnesota*-Kernpolysaccharids (Region II), die sich ergibt, wenn die Teilstukturen, wie sie in Ra- bis Re-Lipopoly-

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

sacchariden ermittelt wurden, zusammengefaßt werden. Das Kernpolysaccharid besteht aus zwei substituierten Oligosacchariden, die aus Hexosen oder Heptose und KDO aufgebaut sind.

Die Struktur des Hexose-Oligosaccharids resultierte aus der Analyse von Fragmenten, die durch Partialhydrolyse aus Ra- und Rb-Lipopolysacchariden erhalten worden waren [18, 29]. Nach neueren Untersuchungen von *Nikaido* [48] und *Hämmerling* et al. [56] sind im Wildtyp-Lipopolysaccharid die O-spezifischen Ketten an den Glucose-II-Rest geknüpft.

Im Heptose/KDO-Oligosaccharid, dessen Struktur durch die Analyse von Rc- bis Re-Lipopolysacchariden ermittelt wurde [49, 49a], liegen die drei ketosidisch-verknüpfsten KDO-Reste als verzweigtes Trisaccharid

vor, dessen reduzierendes Ende ketosidisch an Lipoid-A gebunden ist [54]. Im Kernpolysaccharid sind daher zwei KDO-Reste Teil der Hauptkette, während der dritte KDO-Rest als Verzweigung vorliegt. Dieser trägt in 7-Stellung eine Phosphoryloxyäthylamino-Gruppe [49a]. Einer der Heptosereste [49b], wahrscheinlich Heptose I [49c], trägt in 4-Stellung eine Pyrophosphoryloxyäthylamino-Gruppe.

Aus der in Abbildung 12 dargestellten Formel läßt sich für die Kernpolysaccharid-Kette ein Molekulargewicht von etwa 2000 berechnen. Von wesentlicher Bedeutung für die Gesamtarchitektur der Lipopolysaccharide ist jedoch die noch immer offene Frage, in welcher Bindungsform die nach Hydrolyse als Heptosephosphat gefundenen Phosphatgruppen im Molekülverband vorliegen. Es wird vermutet, daß sie teilweise Diester-Brücken zu Nachbarketten bilden. Dies würde zu einer erheblichen Vergrößerung des Moleküls führen. Es ergibt sich die weitere Frage, wieviel Kernenden in einem solchen S-Form-Lipopolysaccharid mit spezifischen Ketten besetzt sind: Alle oder einige Kernenden oder nur ein einziges Kernende.

Ra-Lipopolysaccharide, unabhängig davon, aus welcher *Salmonella*-Spezies sie erhalten wurden, sind

[48] H. Nikaido, J. biol. Chemistry 244, 2835 (1969).

[49] W. Dröge, O. Lüderitz u. O. Westphal, European J. Biochem. 4, 126 (1968).

[49a] W. Dröge, V. Lehmann, O. Lüderitz u. O. Westphal, European J. Biochem. 14, 175 (1970).

[49b] M. J. Osborn, Annu. Rev. Biochem. 38, 501 (1969).

[49c] V. Lehmann et al., noch unveröffentlicht.

chemisch und serologisch nicht unterscheidbar. Offensichtlich sind die Kernpolysaccharide aller *Salmonella*-Spezies strukturell identisch oder sehr ähnlich. Es gibt aber viele Hinweise dafür, daß die Lipopolysaccharide anderer Genera sehr verschiedene Kernstrukturen haben können. So hat *Simmons* aus Ra-Lipopolysacchariden von *Shigella flexneri* ein Pentasaccharid isoliert (Abb. 13) [50], welches zwar gewisse Ähnlichkeiten mit dem aus *Salmonella* isolierten Pentasaccharid aufweist (Glucosamin als nicht reduzierende

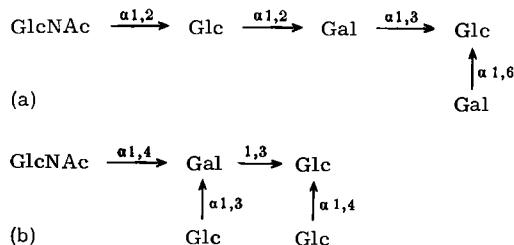


Abb. 13. Vergleich der Pentasaccharide in den Kernpolysacchariden von a) *Salmonella* [18] und b) *Shigella flexneri* [50].

und Glucose als reduzierende Endgruppen), jedoch hinsichtlich der Sequenz der Zucker und der Substituenten verschieden ist. Noch drastischere Unterschiede müssen nach *Volk* bei *Xanthomonas*-Spezies bestehen, deren Lipopolysaccharide KDO und Galakturonäure-phosphat, aber weder Heptose noch Galaktose enthalten [50a] (vgl. auch [50b, 50c]).

Die Kenntnis der Feinstruktur von Kernpolysacchariden möglichst vieler Bakteriengruppen ist für Fragen der Evolution und Taxonomie von großer Bedeutung.

6.6. Struktur von kern-defekten Lipopolysacchariden: Mögliche Biosynthese des Kernpolysaccharids

Die Gesamtstruktur des *Salmonella*-Kernpolysaccharids wurde aus den Teilstrukturen rekombiniert, wie sie in den kern-defekten Lipopolysacchariden der R-Klassen Rb bis Re vorliegen. Die an diesen Lipopolysacchariden ermittelten Strukturen sind in Tabelle 6 zusammengestellt [19].

Während die meisten der isolierten Mutanten einen Defekt der Zuckersynthese oder des Zuckertransfers aufweisen, wurden einige (P⁻) Mutanten erhalten, deren Defekt den Transfer von Phosphatgruppen an Heptose betrifft. In-vitro-Einbauversuche ergaben, daß ATP als Phosphat-Donor für den Phosphattransfer fungiert, und es konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit dieser Heptosephosphatgruppen die Voraussetzung für den späteren Einbau von Galaktose ist [51, 52].

[50] J. H. Johnston, R. J. Johnston u. D. A. R. Simmons, Biochem. J. 105, 79 (1967).

[50a] W. A. Volk, J. Bacteriol. 95, 980 (1968).

[50b] G. Schmidt, B. Jann u. K. Jann, European J. Biochem. 10, 501 (1969).

[50c] G. Schmidt, B. Jann u. K. Jann, European J. Biochem., im Druck.

[51] P. Mühlradt, H. J. Risse, O. Lüderitz u. O. Westphal, European J. Biochem. 4, 139 (1968).

[52] P. Mühlradt, European J. Biochem. 11, 241 (1969).

Tabelle 6. Struktur der Lipopolysaccharide kerndefekter Mutanten: Der Biosyntheseweg des *Salmonella*-Kernpolysaccharids [18]. Am KDO gebundene O-Phosphoryoxyäthylamino-Gruppen sind nicht eingezeichnet.

Chemotyp	Lipopolysaccharid
Re	(KDO) ₃ → Lipoid-A
Rd ₂	Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A
Rd ₁ P ⁻	Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A
Rd ₁ P ⁺	Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A ②, EtN
RcP ⁻	Glc → Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A
RcP ⁺	Glc → Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A ②, EtN
Rb	Glc → Gal → Glc → Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A Gal ②, EtN
Ra	GlcNAc → Glc → Gal → Glc → Hep → Hep → (KDO) ₃ → Lipoid-A Gal ②, EtN

Aufgrund der Konzeption, daß die Unvollständigkeit der Lipopolysaccharide kern-defekter Mutanten durch Ausfall bestimmter Syntheseschritte bedingt ist, können die in Tabelle 6 aufgeführten Strukturen als Zwischenprodukte der Lipopolysaccharid-Biosynthese angesehen werden.

Demnach werden auf das Re-Lipopolysaccharid (für das sich der Name Glykolipoid statt Lipo-„polysaccharid“ eingebürgert hat, da es sich vielmehr um ein Lipo-„oligosaccharid“ handelt) nacheinander zwei Heptosereste übertragen, die anschließend phosphoryliert werden. Auch der Einbau des Aminoäthanols geschieht auf dieser Stufe. In-vitro-Transferreaktionen von Heptose waren bislang nicht möglich, weil die aktivierte Vorstufe der Heptose (sowie ihrer Biosynthese) noch nicht bekannt ist. Dagegen gelang *Osborn* und *Rothfield* und ihren Mitarbeitern der In-vitro-Aufbau von Ra- aus RdP⁺-Lipopolysaccharid durch aufeinanderfolgende Inkorporation von Glucose, Galaktose, Glucose und schließlich *N*-Acetylglucosamin [28, 29]. Die Reihenfolge des Einbaus dieser Zucker ist durch die hohe Spezifität der Transferasen für Akzeptor und Nucleotidzucker festgelegt. Die Ergebnisse dieser biosynthetischen Arbeiten stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Strukturuntersuchungen am Hexose-Pentasaccharid. Sie zeigen auch, daß die Biosynthese von Kernpolysaccharid und O-spezifischen Ketten nach grundsätzlich verschiedenen Prinzipien verläuft.

6.7. Einige biologische Eigenschaften der R-Mutanten

Die Mutanten aller R-Klassen sind immunogen und induzieren die Bildung von Antikörpern. Die jeweiligen terminalen, nicht reduzierenden Zuckerreste der defekten Lipopolysaccharide fungieren als immundominante Strukturen, was in Präzipitations-Hemmungstests nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 5). So werden die entsprechenden homologen Systeme jeweils durch *N*-Acetylglucosamin, Glucose, Heptose und KDO gehemmt.

R-Lipopolsaccharide sind auch spezifische Rezeptoren für eine Reihe von Phagen. Der Phage Felix 01 reagiert nur mit solchen Lipopolysacchariden, welche das *N*-Acetylglucosamin des Kernpolysaccharids enthalten (aus S- und R-Stämmen), nicht jedoch mit Lipopolysacchariden der übrigen R-Klassen (z. B. aus Rb-Stämmen) (s. Abb. 3) [17].

Viele *Salmonella*-Spezies sind pathogen. Sie vermögen in den Organismus einzudringen und sich dort zu vermehren, was zu einer Überschüttung mit Endotoxin führt. *S. typhi*, *S. paratyphi* und *S. enteritidis* sind die bekanntesten Infektionserreger. R-Formen sind dagegen nicht pathogen, obwohl die von ihnen produzierten R-Lipopolsaccharide ebenso toxisch sind wie die der Wildformen. R-Mutanten werden nämlich durch die Fresszellen des Blutes rasch phagocytiert und unschädlich gemacht. Die S-Formen werden dagegen durch die langen, O-spezifischen Polysaccharid-Ketten an der Zelloberfläche vor diesem Schicksal geschützt. Sie verhindern die Kontaktbildung zwischen Bakterienzelle und Phagocytenzelle, die erst das Fressen ermöglicht. – Auch *in vitro* kann gezeigt werden, daß die hydrophilen O-spezifischen Ketten der S-Formen der Zelle einen Schutz gegenüber lytischen Enzymen, Antibiotika und Umwelteinflüssen (Hitze) vermitteln, der den R-Formen fehlt [53a].

7. Lipoid-A (Region III)

7.1. Die Struktur von Lipoid-A

Durch milde Säurehydrolyse von (S- und R-) Lipopolysacchariden werden die labilen Ketosid-Bindungen der KDO-Reste, die das Kernpolysaccharid mit Lipoid-A verknüpfen, gespalten, und Lipoid-A wird in Form eines wasserunlöslichen Präzipitats (neben wasserlöslichem, degradiertem Polysaccharid) freigesetzt. Lipoid-A ist ein Phospholipoid ungewöhnlicher Struktur. Anstelle von Glycerinphosphat (Lecithine, Kephaline) enthält es *D*-Glucosaminphosphate als hydrophile Polyhydroxy-Verbindung. Die Aminogruppen der Glucosamin-Reste sind durch *D*- β -Hydroxymyristinsäure besetzt, während die verfügbaren OH-Gruppen mit langkettigen Fettsäuren verestert sind, unter denen Laurin-, Myristin-, Palmitin- und β -Hydroxymyristinsäure den Hauptteil ausmachen [53].

Als Ausgangsmaterial für die Ermittlung der Glucosamin-Grundstruktur von Lipoid-A war das Glykolipoid aus *Salmonella*-Re-Mutanten besonders geeignet, welches nur aus KDO und Lipoid-A besteht. Nach Abspaltung der langkettigen Fettsäuren durch Hydrazinolyse und anschließender Partialhydrolyse konnten elektrophoretisch (neben freiem KDO) vier Hauptfraktionen identifiziert werden [54]. Ihre Isolierung und

[53] O. Westphal u. O. Lüderitz, Angew. Chem. 66, 407 (1954).
 [53a] S. Schlecht u. O. Westphal, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg. I. Abt., Orig. 213, 356 (1970).
 [54] J. Gmeiner, O. Lüderitz u. O. Westphal, European Biochem. 7, 370 (1969).

Analyse führte zu den in Abbildung 14 angegebenen Strukturen. Fraktion -5, Glucosaminyl- β -1,6-glucosamin, ist der Grundkörper, dessen Derivate einen Phosphatrest (Fraktionen -3 und -2) oder zwei Phosphatreste (Fraktion +2) in den Positionen 1 und

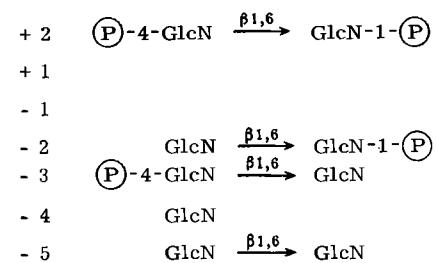


Abb. 14. Elektropherogramm des Partialhydrolysats eines Re-Glykolipoids nach Hydrazinolyse [54]. 40 V/cm, 150 mA, pH = 5.3.

(wahrscheinlich) 4' tragen. Wurde das Produkt der Hydrazinolyse direkt untersucht und in analoger Weise analysiert, so konnten entsprechende phosphorylierte Derivate eines KDO-enthaltenden Pentasaccharids erhalten werden, die durch Phosphatase-Behandlung in den Grundkörper $(\text{KDO})_3$ -Glucosaminyl- β -1,6-glucosamin oder durch Partialhydrolyse in das Disaccharid Glucosaminyl- β -1,6-glucosamin (und freies KDO) überführt werden konnten.

Lipoid-A besteht demnach aus phosphorylierten β -1,6-verknüpften Glucosamindisaccharid-Einheiten, deren Hydroxy- und Aminogruppen acyliert sind (Abb. 15). Ein KDO-Oligosaccharid ist an eine der Hydroxygruppen des nicht-reduzierenden Glucosaminrestes

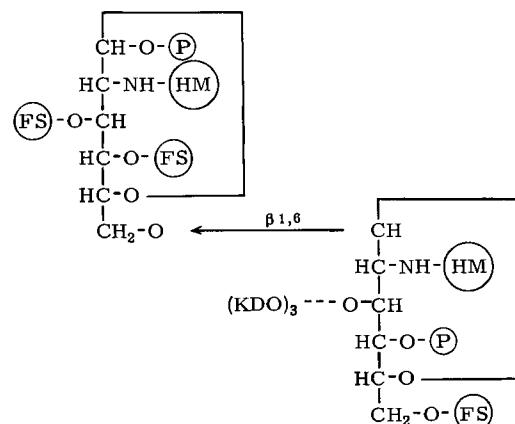


Abb. 15. Struktur einer Lipoid-A-Einheit mit KDO-Oligosaccharid [54]. FS = langkettige Fettsäuren; HM = β -Hydroxymyristinsäure.

gebunden und vermittelt die Verknüpfung von Kernpolysaccharid und Lipoid-A in S- und R-Lipopolsacchariden.

Es ist sehr wohl möglich, daß Glucosamindisaccharid-Einheiten im intakten Lipoid-A durch Phosphatbrücken (1-4') miteinander verbunden sind, was eine wesentliche Vergrößerung des Lipopolysaccharid-Moleküls zur Folge hätte und für die Gesamtarchitektur und die Organisation der Zellwand von Bedeutung sein könnte.

7.2. Der endotoxische Bezirk im Lipopolysaccharid-Molekül

Die Isolierung und Identifizierung einer Serie von R-Klassen und das Studium ihrer Lipopolysaccharide und Glykolipoide hat neue Möglichkeiten eröffnet, Bezirke im Lipopolysaccharid zu definieren, die für ihre Aktivität als Endotoxine wesentlich sind. Es konnte jetzt bewiesen werden, daß – wie seit langem postuliert – die O-spezifischen Ketten und die Hexosen und Heptosen des Kernpolysaccharids nicht zur Endotoxizität beitragen und entbehrlich sind. So erwiesen sich in mehreren Laboratorien die Glykolipoide von Re-Mutanten, die lediglich KDO und Lipoid-A enthalten, als ebenso aktive Endotoxine wie die Lipopolysaccharide der entsprechenden Wildtypen [13, 14]. Von Amöbenenzym spezifisch oder durch Alkali chemisch im Lipoid-Teil desacylierte Lipopolysaccharide sind untoxisch [55]. Diese und andere Ergebnisse zeigen, daß Lipoid-A für die endotoxischen Wirkungen der Lipopolysaccharide wesentlich ist.

8. Zusammenfassung und Diskussion

Abbildung 16 zeigt die Gesamtstruktur des Lipopolysaccharids aus *S. typhimurium* [18, 23, 48, 49, 49a, 54, 56]. Sie besteht aus den in Abbildung 4 gezeigten drei Regionen: der O-spezifischen Polysaccharidkette, dem Kernpolysaccharid und Lipoid-A.

stimmt. Diese Kombination führt in wäßriger Lösung zur Bildung geordneter, micellärer Strukturen von hohem Aggregationsgrad (vgl. Abb. 3). Es ist nicht möglich, das wahre Molekulargewicht von Lipopolysacchariden direkt zu bestimmen. Auch die Formel in Abbildung 16 gestattet keine Rückschlüsse auf die Molekülgröße, da wir bislang nicht wissen, ob die an Heptose gebundenen Phosphatgruppen sowie diejenigen im Lipoid-A als Brücken zu Nachbarketten fungieren, wodurch ein dreidimensionales Netzwerk entstünde. Der innere Bezirk des Kernpolysaccharids, das Heptose/KDO-Oligosaccharid, enthält eine eindrucksvolle Anhäufung polarer Gruppen (Carboxygruppen von KDO, Phosphatgruppen und freie Aminogruppen von Aminoäthanol), deren physiologische Bedeutung bislang unbekannt ist. Es ist denkbar, daß sie in der Zellwand der Bakterien an der Bindung zu anderen Bestandteilen beteiligt sind. Eine andere Funktion der ionischen Gruppen im Kernpolysaccharid könnte in Analogie zu den Teichonsäuren [56a] darin bestehen, daß sie als Ionenaustauscher die Zufuhr von Ionen in den Bereich der Zellmembran regulieren und dort für viele Enzyme notwendige Konzentration an zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) aufrechterhalten.

Biochemische und genetische Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß O-spezifische Ketten einerseits und das Kernpolysaccharid-Lipoid-A andererseits in der Zelle unabhängig und auf verschiedenen Wegen aufgebaut werden. Ihre Synthese wird im wesentlichen durch den (spezies-spezifischen) O-Locus

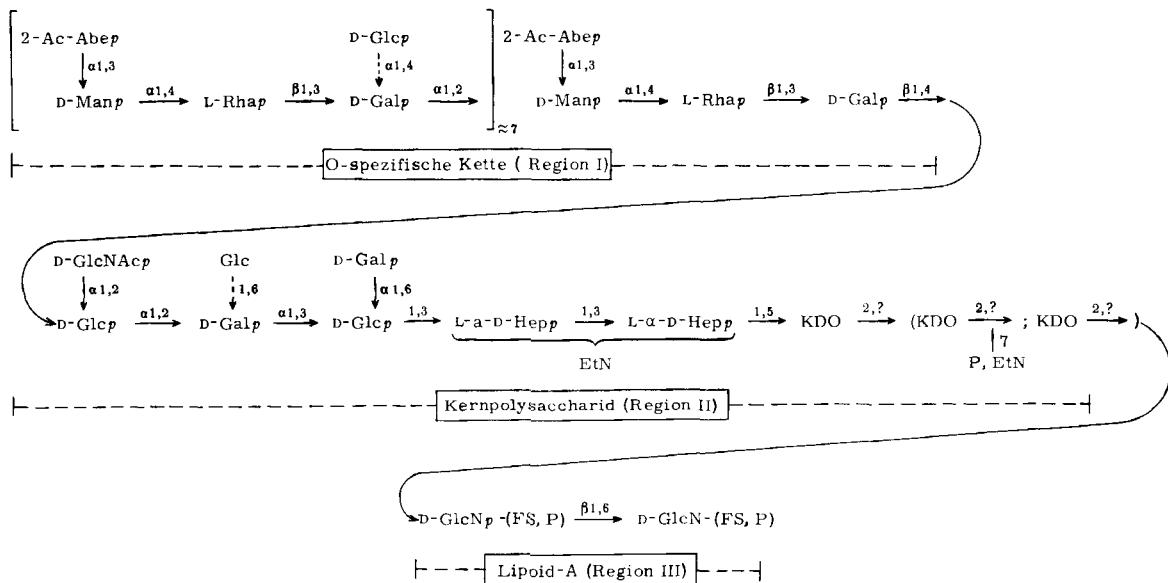


Abb. 16. Struktur des Lipopolysaccharids aus *S. typhimurium* [18, 23, 49a, 49b, 54, 56]. p = pyranoside Bindung; $L-\alpha-D-Hep$ ist identisch mit β -Hep der vorangehenden Abbildungen, FS = langkettige (Hydroxy-)Fettsäuren.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lipopolysaccharide werden durch die gleichzeitige Anwesenheit von hydrophilen, stark polaren polysaccharidischen Bezirken und dem hydrophoben Lipoid-A be-

[55] D. Malchow, O. Lüderitz, B. Kickhöfen, O. Westphal u. G. Gerisch, European J. Biochem. 7, 239 (1969).

[56] G. Hämerling, O. Lüderitz u. O. Westphal, European J. Biochem., im Druck.

bzw. den (allen Salmonellen gemeinsamen) R-Locus determiniert, die auf dem ringförmigen Salmonella-Chromosom weit voneinander entfernt liegen.

Im allgemeinen führt jeder Defekt der O-Kettensynthese, unabhängig vom betroffenen Syntheseschritt,

[56a] S. Heptinstall, A. R. Archibald u. J. Baddiley, Nature (London) 225, 519 (1970).

zur vollständigen Abwesenheit der O-Ketten im Lipopolysaccharid. O-Locus-defekte *Salmonella*-Mutanten bilden daher phänotypisch eine einheitliche Klasse, die Ra-Mutanten, deren Lipopolysaccharide das komplette Kernpolysaccharid enthalten.

Kern-defekte (R-locus-defekte) Mutanten verschiedenen Genotyps sind dagegen oft auch phänotypisch verschieden. Sie bauen das Kernpolysaccharid bis zur defekten Synthesestufe auf. Diese Mutanten der R-Klassen Rb bis Re synthetisieren O-spezifische Ketten, die jedoch nicht auf das inkomplette Kernpolysaccharid übertragen werden, sondern als O-spezifisches Hapten am Antigen Carrier Lipid gebunden bleiben.

Es ist offensichtlich, daß die Reihenfolge der Zuckerreste in der Polysaccharidkette nicht durch einen Template-Mechanismus bestimmt wird, sondern durch die Substrat-Spezifität vieler Enzyme, die an der Synthese beteiligt sind. Sie bestimmt die Reihenfolge der Syntheseschritte und damit die Polysaccharidstruktur. Es scheint, daß in manchen Lipopolysacchariden die spezifische Kette nicht aus „Repeating Units“ aufgebaut ist [25, 40].

Bisherige Untersuchungen sprechen dafür, daß in *Salmonella*-Spezies Kernpolysaccharid und Lipoid-A gleiche Strukturen besitzen. In anderen Bakteriengruppen dagegen kann die Kernstruktur verschieden sein [18, 20, 50, 50a–50c]. Es wurde gezeigt, daß gelegentlich verschiedene Kernstrukturen identische O-spezifische Ketten tragen können [50b]. Auch hinsichtlich der Lipoid-A-Komponente bestehen strukturelle Unterschiede in verschiedenen Genera sowohl bezüglich des Glucosamin-Disaccharids [58] als auch der Fettsäuren [59–62].

Bislang sind keine Mutanten beschrieben worden, deren Defekt KDO oder Lipoid-A betrifft. Es ist möglich, daß die üblichen Selektionsmethoden für ihre Isolierung nicht geeignet waren, oder daß derartige Mutanten unter den üblichen Kultivierungsbedingungen nicht lebensfähig sind. Von erheblichem theoretischem wie praktischem Interesse wäre das Auffinden von Substanzen, die den Biosyntheseweg der Lipo-

[57] W. R. Rank, Dissertation, Universität München 1969.

[58] G. A. Adams u. P. P. Singh, Biochim. biophysica Acta 202, 553 (1970).

[59] G. A. Adams, M. Kates, D. H. Shaw u. M. Yaguchi, Canad. J. Biochem. 46, 1175 (1968).

[60] G. B. Michaelis u. R. G. Eagon, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 1346 (1969).

[61] F. M. Berger, G. M. Fukui, B. J. Ludwig u. J. P. Rosselet, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131, 1376 (1969).

[62] A. H. Fenson u. G. W. Gray, Biochem. J. 114, 185 (1969).

polysaccharide in der Zelle auf einer frühen Stufe unterbrechen (wie manche Antibiotika die Biosynthese des Mureins). Solche Stoffe würden pathogene Wildformen in R-Formen umwandeln, die nicht pathogen sind, da diese im Organismus bekanntlich rasch der Phagocytose anheimfallen.

Obwohl der Biosyntheseweg der Lipopolysaccharide weitgehend aufgeklärt wurde, wissen wir wenig über ihren Abbau in der Natur. Es ist überraschend, daß bislang keine Enzyme beschrieben wurden, die Lipopolysaccharide spezifisch degradieren, obwohl dies für Strukturanalysen oder zur Identifizierung biologisch aktiver Regionen im Molekül äußerst nützlich wäre. Wir haben kürzlich gefunden, daß Amöben von *Dicytostelium discoideum* ein Enzymsystem enthalten, welches spezifisch die Lipoid-A-Komponente von Lipopolysacchariden degradiert [55]. Nach Phagocytose, Lyse und Verwertung der Futterbakterien scheiden diese Amöben degradiertes Lipopolysaccharid ins Kulturmedium aus, welches intakte O-spezifische Ketten und Kernpolysaccharid enthält, dessen Lipoid-A-Komponente jedoch quantitativ desacyliert ist. Sowohl die ester- als auch die amid-gebundenen Fettsäuren sind abgespalten, und das degradierte Lipopolysaccharid enthält nicht acyliertes Glucosamin-Disaccharid. Amöben-degradiertes Lipopolysaccharid ist *untoxisch*. Es ist möglich, daß die Inaktivierung (Detoxifizierung) von Lipopolysacchariden, die nach Inkubation mit Serum beobachtet wird, auf einer analogen Reaktion mit Acylasen des Serums beruht [13].

Immunchemische und serologische Untersuchungen an Lipopolysacchariden haben gezeigt, daß begrenzte Strukturen in den O-spezifischen Ketten die O-Spezifität bestimmen. Den O-Faktoren des Kauffmann-White-Schemas entsprechen determinante Gruppen, Di- bis Hexasaccharide, in denen jeweils ein Zucker immundominant wirkt. In R-Mutanten, denen die spezifische Kette fehlt, werden die terminalen Zucker der verschiedenen inkompletten Kernpolysaccharide zu Immundominanten: R-Mutanten entfalten R-Spezifitäten. Neueste Untersuchungen von Rank [57] sprechen dafür, daß unter bestimmten Bedingungen auch Antikörper gegen Lipoid-A gebildet werden, die, wie zu erwarten, Kreuzreaktionen zwischen nicht verwandten Lipopolysacchariden bewirken.

Alle Lipopolysaccharide, unabhängig von ihrer Herkunft aus S- oder R-Formen, sind hochaktive Endotoxine. Der für diese Wirkung verantwortliche Bezirk liegt im (KDO-) Lipoid-A-Teil des Moleküls; der Polysaccharid-Teil ist entbehrlich.

Eingegangen am 4. Februar 1970 [A 764]