

# Typumwandlungen bei Pneumococcen

## Zur chemischen Erforschung von Mutationsvorgängen

Von Doz. Dr. O. WESTPHAL, Göttingen,  
Chemisches Institut, Biochem. Abteilung

Die Pneumococcen sind als Erreger der Lungenentzündung und anderer Infektionskrankheiten seit langem bekannt<sup>1)</sup>. Sie gehören zu den kapselbildenden Mikroorganismen. Virulente Pneumococcen, welche aus Infektionsherden isoliert werden und deren Virulenz unter geeigneten Bedingungen auch bei Züchtung in der Kultur erhalten bleibt, sind eingekapselt. Die Kapsel, eine schleimige Hülle, welche die zumeist paarweise aneinander gelagerten Bakterien (Diplococcen) umgibt, stellt eine Schutzmaßnahme der Mikroorganismen gegen die Abwehrkräfte des Tierkörpers dar. Nicht eingekapselte Pneumococcen (atypische Stämme) — die man erhält, wenn die Entwicklungsbedingungen ungünstig waren, besonders in älteren Kulturen, beim Menschen auch aus nicht mehr entzündlichen Herden — sind wenig oder gar nicht virulent, da sie im tierischen Organismus rasch der Phagozytose anheimfallen<sup>2)</sup>.

Es hat sich gezeigt, daß man unter den Pneumococcen mehrere Typen nach ihrem serologischen Verhalten, ihrer Morphologie und nach der durch sie ausgelösten Infektion scharf unterscheiden kann<sup>3)</sup>. Jeder Typ wird nur von dem homologen (d. h. entsprechenden) Antiserum spezifisch agglutiniert. Immunisiert man Tiere mit einem bestimmten Typ, so werden sie nur gegen die Infektion dieses einen Typs geschützt. Diese Tatsache ist nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die spezifische Immuntherapie von großer Bedeutung. Man hat die Pneumococcentypen mit den Indices I, II, III usw. gekennzeichnet. Durch eingehende serologische Differenzierung kennt man bis heute etwa 50 verschiedene Typen<sup>4)</sup>, von denen aber nur einige wenige klinisch erhöhtes Interesse besitzen, unter ihnen vor allem die Typen I, II und III.

Durch die Untersuchungen von Avery, Heidelberger und Goebel<sup>5)</sup> wurde nachgewiesen, daß die serologischen Unterschiede der Pneumococcentypen durch das jeweilige Kapselmateriale gegeben sind. Aus der Kapsel, und bei lebhaft wachsenden Kulturen auch aus der Kulturlösung, konnte ein für jeden Typ spezifisches Polysaccharid isoliert werden. Es sind hochmolekulare, in Wasser (z. T. kolloidal) lösliche, stickstoffhaltige oder -freie, deutlich von Typ zu Typ chemisch unterscheidbare Substanzen. Aus ihnen ist das jeweilige Kapselmateriale im wesentlichen aufgebaut (Tab. I). R. Brown<sup>6)</sup> hat die spezifischen Polysaccharide zahlreicher Pneumococcentypen dargestellt und analysiert.

	Hydrolysenprodukte	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	Säure- äquivalent
Typ I	Galacturonsäure, N-Acetyl-glucosamin, Essigsäure	+ 265—277°	650
Typ II	Glucuronsäure, Glucose	+ 54—58°	970
Typ III	Glucuronsäure, Glucose (1:1) (Cellobiuronsäure)	—36°	350

Tabelle 1. Die spezifischen Kapselpolysaccharide der Pneumococcentypen I, II und III.

Diese Kohlenhydrate sind für Mäuse<sup>6)</sup> und den Menschen<sup>6a)</sup> antigen und besitzen daher neuerdings erhebliches praktisches Interesse (M. Heidelberger u. a. <sup>6a)</sup>), während sie gegenüber Kaninchen nur Hapten-Charakter zeigen<sup>7)</sup>. Mit entsprechenden Immunsereen geben sie spezifische Präzipitation noch in Verdünnungen

von 1:5—8 Millionen<sup>8)</sup>. W. F. Goebel u. s. Mitarb.<sup>9)</sup> konnten das spezifische Kohlenhydrat des Typs III, welches aus Glucose und Glucuronsäure im molaren Verhältnis 1:1 besteht, vollständig aufklären. Es ist aus Cellobiuronsäure-Einheiten (4- $\beta$ -Glucuronosido-glucose) aufgebaut. Die Bindung der Cellobiuronsäure-Einheiten aneinander erfolgt  $\beta$ -glykosidisch über das C-Atom 3 der Glucuronsäure. Obwohl auch das Typ-II-Polysaccharid aus den nämlichen Bausteinen aufgebaut ist, sind die serologischen Eigenschaften von denen des Typ-III-Polysaccharids vollständig verschieden.

Jeder Pneumococcentyp ist demnach durch das Vermögen zur Synthese eines spezifischen Kapselpolysaccharids ausgezeichnet. Auch die morphologischen Unterschiede sind hierdurch weitgehend bedingt. So bildet Typ III eine starke, schleimige Kapsel, weshalb man ihn auch als *Pneumococcus mucosus* bezeichnet, während die Kapsel bei den Typen I und II weniger schleimig und ausgeprägt erscheint. Dieses Vermögen zur Bildung einer typenspezifischen Kapselsubstanz ist erblich konstant. Über zahlreiche Kultur- oder Tierpassagen tritt keinerlei Änderung des spezifischen Verhaltens ein.

F. Griffith<sup>10)</sup> konnte vollkommen ungekapselte, sog. „degradierte“ Pneumococcen durch Züchtung der Mikroorganismen in verdünntem homologem Immunsereum oder in gallehaltiger Bouillonkultur gewinnen. Während die virulenten, gekapselten Formen auf festen Nährböden in Kolonien von schleimig-glattem Aussehen wachsen (Glatt- oder S-Formen), erscheinen Kolonien degradierter, ungekapselter Coccen als feiner, rauher Belag (R-Formen)<sup>11)</sup>. Die R-Pneumococcen sind nicht virulent und nicht mehr typenspezifisch differenziert; sie besitzen zwei gemeinsame art-spezifische Antigene, ein Protein<sup>12)</sup> und ein Glycoprotein<sup>13)</sup>. Die Zurückverwandlung von degradierten (R)-Pneumococcen in die entsprechende S-Form vollzieht sich nach M. H. Dawson u. O. T. Avery<sup>14)</sup> und Dawson<sup>15)</sup> besonders leicht, wenn die Bakterien auf R-Pneumococcen-Antiserum (Anti-R-Serum) wachsen. Sie bilden dann rasch die virulente und eingekapselte S-Form zurück.

1928 zeigte Griffith<sup>16)</sup>, daß es gelingt, einen aus einem spezifischen S-Stamm gewonnenen, degradierten und ungekapselten R-Stamm in einen virulenten und gekapselten S-Stamm eines anderen spezifischen Typs umzuwandeln. Griffith injizierte Mäusen subcutan eine geringe Menge lebender R-Kultur von Pneumococcen Typ II gemeinsam mit einer großen Dosis hitzegetöteter virulenter S-Typ-I- oder S-Typ-III-Pneumococcen. Weder der lebende R-Stamm noch die hitzegetöteten S-Typ-I- oder -III-Pneumococcen allein töteten die Maus. Dagegen führte die Kombination zu einer schweren Infektion mit tödlicher Bakteriämie. Die aus dem Blute der Mäuse isolierten Mikroorganismen waren jedoch keine virulenten Typ-II-Pneumococcen, sondern — je nach der Verwendung hitzegetöteter S-Typ-I- oder -III-Coccen — virulente und eingekapselte Typ-I- bzw. -III-Pneumococcen. Mit größter Sorgfalt wurde geprüft und erwiesen, daß die hitzegetöteten Pneumococcen keinerlei lebende Organismen mehr enthielten. Es mußte also eine Umwandlung von R-Typ-II<sup>17)</sup> in S-Typ-I- bzw. -III-Pneumococcen stattgefunden haben. Die Beobachtung von Griffith wurde bald bestätigt<sup>18)</sup> und ihre Bedeutung erkannt.

<sup>1)</sup> Vgl. H. Schmidt, Grundlagen der spezifischen Therapie, Berlin 1940, S. 135 ff.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu auch die Untersuchungen von R. Dubos (Erg. Enzymforsch. 8, 136 [1940]) über den Abbau der Pneumococcenkapsel mittels spezifischer Fermente. Die zurückgebliebenen nackten Coccen wurden in vivo rasch phagozytiert. Die Fermente von Dubos sind daher auch therapeutisch von Interesse.

<sup>3)</sup> F. Kaufmann, E. Morch u. K. Schmith, J. Immunology 39, 397 [1940].

<sup>4)</sup> O. T. Avery, Naturwiss. 21, 777 [1933]; H. Rudy, Diese Ztschr. 50, 137 [1937]; O. Westphal, Diese Ztschr. 57, 57 [1944].

<sup>5)</sup> J. Immunology 57, 445 [1939].

<sup>6)</sup> M. Finnland u. Suthiff, J. exp. Medicine 54, 637, 653 [1931]; 55, 853, [1932].

<sup>6a)</sup> M. Finnland u. Suthiff, J. exp. Medicine 52, 445 [1945].

<sup>7)</sup> W. F. Goebel u. O. T. Avery, J. exp. Medicine 54, 431, 437 [1931].

<sup>8)</sup> W. F. Goebel, J. biol. Chemistry 89, 395 [1930].

<sup>9)</sup> J. biol. Chemistry 110, 391 [1935]; 121, 195 [1937]; 139, 511 [1941]; 140, 653 [1941]; J. exp. Medicine 68, 409 [1938]; 69, 353 [1939].

<sup>10)</sup> Rep. Public Health [London] 18, 1 [1923].

<sup>11)</sup> S von smooth, R von rough (nach Griffith<sup>10)</sup>).

<sup>12)</sup> O. T. Avery u. Mitarb., J. exp. Medicine 38, 81 [1923]; 42, 347 367 [1925].

<sup>13)</sup> W. S. Tillet, O. T. Avery u. W. F. Goebel, daselbst 52, 896 [1930]; vgl. M. G. Sevag, Science [New York] 87, 304 [1938]; H. B. Day, J. Hyg. 42, 532 [1942].

<sup>14)</sup> Proc. Soc. exp. Biol. Med. 24, 943 [1927].

<sup>15)</sup> J. exp. Medicine 51, 123 [1930].

<sup>16)</sup> J. Hyg. 27, 113 [1928].

<sup>17)</sup> Diese Bezeichnung soll andeuten, aus welchem spez. Pneumococcentyp der R-Stamm gewonnen wurde.

<sup>18)</sup> Vgl. H. Schmidt<sup>1)</sup>, S. 139 ff.

In der Folge gelang *M. H. Dawson* u. *R. H. P. Sia*<sup>19)</sup> die Umwandlung von *R*-Typ-II- in virulente *S*-Typ-III-Pneumococci in vitro. Sie züchteten *R*-Typ-II-Cocci in einem Kulturmedium, welches Anti-*R*-Serum enthielt, bei Gegenwart großer Mengen hitzegetöteter *S*-Typ-III-Pneumococci. Aus den Kulturen wurden virulente und eingekapselte *S*-Typ-III-Organismen isoliert. *J. L. Alloway*<sup>20)</sup> konnte dann die Typumwandlung durch Anwendung steriler, zellfreier Extrakte aus *S*-Pneumococci erzielen. In einer eingehenden Untersuchung<sup>21)</sup> gelang es *Alloway*, das umwandelnde Agens aus *S*-Pneumococci-Extrakten beträchtlich anzureichern. Die *S*-Zellen wurden in Natriumdesoxycholat zur Auflösung gebracht. Für Pneumococci ist es charakteristisch, daß sie durch dieses Mittel rasch und vollständig gelöst werden. Der wirksame Faktor wurde durch Alkohol gefällt, unwirksame Begleitstoffe konnten durch Adsorption an Kohle entfernt werden. An die Stelle der hitzegetöteten *S*-Cocci traten so wasserklare Lösungen, welche das umwandelnde Agens in hoher Wirksamkeit enthielten. Damit war zugleich bewiesen, daß die Umwandlung nicht durch überlebende *S*-Organismen vorgetäuscht, sondern daß hier ein extrahierbarer, wasserlöslicher Faktor wirksam war. Während sich die Umwandlung von *R*-Typ-II- in *S*-Typ-III-Pneumococci zumeist in einem Kulturgang erreichen ließ, vollzog sich die Überführung in *S* Typ I schwieriger und erforderte im allgemeinen mehrere Subkulturen. Interessant ist, daß *Harris*<sup>22)</sup> einen wenig mäusevirulenten Typ-XIV-Stamm in einen für Mäuse hochpathogenen *S*-Typ-II-Stamm umwandeln konnte.

Sehr wesentlich ist, daß die Umwandlung niemals bei Abwesenheit von Serum beobachtet werden konnte. *Alloway* zeigte, daß Serum vom Schaf, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferd oder Mensch gleichermaßen und unabhängig vom Gehalt an *R*-Pneumococci-Antikörpern verwendet werden kann. Es ist bisher unbekannt, welcher Bestandteil des Serums, verantwortlich zu machen ist. Die typenspezifischen Polysaccharide selbst üben auf die Typumwandlung keinerlei Wirkung aus. Die Umwandlung kann ferner nur während der aktiven Zellteilung ausgelöst werden. Die Zellen müssen sich also in einer reaktionsfähigen Phase befinden; ruhende Zellen reagieren nicht auf den umwandelnden Stimulus.

Die experimentelle Überführung von *R*-Pneumococci in einen heterologen *S*-Stamm bedeutet, daß der Mikroorganismus die Fähigkeit erlangt hat, das betreffende spezifische Kapselpolysaccharid zu bilden. Demnach findet sich in Extrakten von *S*-Typ-III-Pneumococci ein besonderer Faktor, dessen Wirkung auf *R*-Typ-II-Pneumococci darin besteht, daß sie das Synthesevermögen des Typ-III-Polysaccharids erlangen, d. h. daß sie die typischen Eigenschaften dieses *Pneumococcus* annehmen. Wenn die Mikroorganismen den typenspezifischen *S*-Charakter angenommen haben, so erhalten sie diesen konstant über serienweise Passagen. Die spontane Rückbildung des ursprünglichen Stammes ist niemals beobachtet worden. Bis heute ist eine größere Zahl derartiger *R* → *S*-Umwandlungen beschrieben worden.

Kürzlich haben nun *O. T. Avery*, *C. M. MacLeod* u. *M. McCarty*<sup>23)</sup> über die Isolierung und Identifizierung des aktiven umwandelnden Faktors aus Extrakten von *S*-Typ-III-Pneumococci berichtet<sup>24,25)</sup>. Als Test diente die Umwandlung von *R*-Typ-II- in *S*-Typ-III-Pneumococci. Die Aufklärung der Natur dieser Substanz erfolgte durch chemische, enzymatische und serologische Analyse, durch Elektrophorese, Ultrazentrifugation und Ultraviolett-Spektroskopie. Der Faktor enthält kein Protein, kein Lipoid und kein serologisch aktives Polysaccharid. Das Material besteht aus 34–35% C, 3,7–3,8% H, 14–15% N und 8,5–9,0% P. Diese Zahlen und die weiteren analytischen und physikalisch-chemischen Daten stimmen sehr gut mit den Werten

für Natriumdesoxyribonucleat überein. „Es ist wahrscheinlich kein bloßer Zufall, daß es dieser Typ von Nucleinsäure ist, welcher als Bestandteil der Zellkerne und Chromosomen aufgefunden wurde, und es ist jene Art von Nucleinsäure, die nach *Signer*, *Caspersson* u. *Hammersten*<sup>26)</sup> und nach *Astbury* u. *Bell*<sup>27)</sup> in hochpolymerem (Mol.-Gew. 500000 bis 1000000) und reaktionsfähigem Zustande vorkommen kann“ (*Morgan*<sup>24)</sup>).

Eine *R*-Pneumococcenzelle wird also unter der Wirkung einer Desoxyribonucleinsäure veranlaßt, das charakteristische Kapselpolysaccharid desjenigen heterologen *Pneumococcus* zu bilden, von dem die Nucleinsäure stammt. Wenn auch *Avery*, *MacLeod* u. *McCarty* bisher nur den Faktor von *S*-Typ-III-Pneumococci identifiziert haben, so darf man nach den beschriebenen früheren Beobachtungen anderer Forscher dennoch annehmen, daß es sich hier um ein allgemeines Prinzip handelt.

Es scheint, daß jeder *S*-Pneumococcentyp eine besondere Nucleinsäure bildet, welche ursächlich am Zustandekommen der Typenspezifität entscheidenden, determinierenden Anteil hat. Die Methoden der feineren Analyse von Nucleinsäuren sind bisher noch wenig entwickelt und ausgebaut. Über die immunologische Spezifität der Nucleinsäuren ist ebenfalls bisher wenig bekannt. Sowohl *d*-Ribo- als auch *d*-2-Desoxyribonucleinsäuren reagieren mit Pneumococci-Antisera<sup>28)</sup>; doch zeigen sie gegenseitiges starkes Übergreifen. Die spezifische Reaktionsfähigkeit einiger Antipneumococcenserum gegenüber Nucleinsäuren wird überdies nicht nur durch die zugehörigen, sondern auch durch nucleinsäure-fremde Purine, wie Theophyllin oder Coffein, spezifisch gehemmt. *Morgan*<sup>24)</sup> weist auf die Möglichkeit hin, daß bei den üblichen Isolierungs- und Reinigungsverfahren beträchtliche Veränderungen an den hochpolymeren und komplexen Nucleinsäuremolekeln stattfinden können (vgl. <sup>28)</sup>), so daß Fortschritte bei der Aufklärung des Zusammenhangs zwischen chemischer Konstitution und immunologischer Spezifität erst zu erwarten sind, wenn die Nucleinsäuren im nativen Zustande aus Geweben und Bakterienzellen gewonnen werden können.

Die Wirkungsweise der Nucleinsäure auf die *R*-Pneumococcenzelle ist zwar noch unbekannt. Doch scheint es sicher, daß eine abgestufte Folge enzymatischer Reaktionen ausgelöst wird, welche zur Bildung des spezifischen Polysaccharids führt. Ist der Prozeß einmal ausgelöst, so läuft er über unzählige Generationen fort, ohne daß das umwandelnde Agens weiter hinzugefügt wird. Die einmal von außen zugeführte Substanz wird demnach durch die Zelle selbst reproduziert. Die durch die Nucleinsäure experimentell induzierten Veränderungen sind mit der Ausbildung einer neuen, typischen morphologischen Struktur und neuen spezifisch-antigenen Eigenschaften verbunden. Die Veränderungen können vorausgesagt werden, sie sind typenspezifisch und erblich. Die auslösende Substanz ist von gen-artiger Natur und das Kapselpolysaccharid Produkt einer Gegenwirkung. Die Umwandlung von *R*-Typ-II- in *S*-Typ-III-Pneumococci stellt einen Vorgang dar, welcher durch eine wohldefinierte Substanz chemisch ausgelöst und spezifisch gesteuert wird. Und „es scheint, daß diese Umwandlung eine *Gen-Mutation* ist und daß der *R* → *S* Wandel tatsächlich ein authentisches Beispiel einer durch ein spezifisches chemisches Agens ausgelösten Mutation darstellt“. Diese Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten der experimentellen Gen-Forschung.

Diese Art der Typumwandlung steht nicht einzig da. Beispiele ähnlicher Umwandlungen an anderen biologischen Objekten, wie jene des *Shopeschen* Kaninchenfibrom-Virus in das Virus des *Sanarelli-Myxoms*<sup>29)</sup>, sind schon bekannt, und weitere werden vermutlich noch aufgefunden werden. Ob die beschriebenen Typumwandlungen bei Pneumococci-Infektionen im Tierkörper eine Rolle spielen, ist bisher nicht erwiesen<sup>30)</sup>. Es scheint jedoch nicht unbedenkbar, daß unter der Wirkung ähnlicher stofflicher Einflüsse im biologischen Geschehen neue Mikroorganismen Typen entstehen könnten.

Eingeg. am 4. März 1945. [A 18].

<sup>19)</sup> *J. exp. Medicine* 54, 681 [1932].

<sup>20)</sup> Dasselbst 55, 91 [1932].

<sup>21)</sup> Dasselbst 57, 265 [1933].

<sup>22)</sup> *J. Bacteriology (Proc.)* 36, 218 [1938] (cit. nach *H. Schmidt*<sup>1)</sup>).

<sup>23)</sup> *J. exp. Medicine* 79, 137 [1944].

<sup>24)</sup> Die Originalarbeit ist bisher nicht zugänglich. Von dem bekannten

englischen Immunchemiker *W. T. J. Morgan* findet sich ein ausführliches Referat in *Nature* [London] 153, 763 [1944].

<sup>25)</sup> Es wurde gefunden, daß (wahrscheinlich alle) Pneumococcentypen ein Ferment bilden, welches während der Autolyse in Lösung geht und das umwandelnde Agens zerstört. Um optimale Bedingungen für die Umwandlung zu erhalten, ist es daher notwendig, junge Kulturen zu verwenden. Bei besonders aktiver Zellteilung ist hier die Autolyse minimal. *O. T. Avery* u. a.<sup>19)</sup>

<sup>26)</sup> *Nature* [London] 141, 122 [1938].

<sup>27)</sup> Dasselbst 141, 747 [1938].

<sup>28)</sup> *D. Lackman*, *St. Mudd*, *M. G. Sevag*, *J. Smolens* u. *M. Wiener*, *J. Immunology* 40, 1 [1941]; vgl. auch *M. G. Sevag*, *J. Lackman* u. *J. Smolens*, *J. biol. Chemistry* 124, 425 [1938].

<sup>29)</sup> *G. P. Berry* u. *H. M. Dedrick*, *J. Bacteriology* 31, 50 [1936]; *G. P. Berry*, *Arch. Pathol.* 24, 533 [1937].

<sup>30)</sup> Vgl. *W. Baurhenn*, *Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Abt. I* 126, 68 [1932].