

# Strukturuntersuchung mit Röntgenbeugungsmethoden an Lipopolysacchariden von *Salmonella minnesota* Mutanten S SF 1111 und R 595 SF 1167

Structural Investigations on Lipopolysaccharides of Mutants S SF 1111 and R 595 SF 1167 of *Salmonella minnesota*

H. Wawra,

Forschungszentrum Graz, Steyrergasse 17/5, A-8010 Graz

H. Buschmann,

Institut für medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Universität München

H. Formanek und S. Formanek

Botanisches Institut der Universität München

Z. Naturforsch. 34c, 171–178 (1979); eingegangen am 27. Dezember 1978

Small-Angle-X-Ray Scattering, Bacterial Cell Wall, Lipopolysaccharides

The lipopolysaccharides of two mutants of *Salmonella minnesota* with known chemical structure were investigated by X-ray methods. Both thickness of the lipopolysaccharide layer and arrangement of the molecular components could be estimated. Using these informations a space-filling model of the structure was built.

## Einleitung

Die Zellwände Gram-positiver Bakterien bestehen hauptsächlich aus einer etwa 15 bis 50 nm dicken Schicht von Peptidoglycan, Teichonsäuren, Teichuronsäuren und Polysacchariden [1], während die Zellwände Gram-negativer Bakterien aus einer dünnen Peptidglycanschicht, Lipoproteinen, Proteinen und Lipopolysacchariden aufgebaut sind [2–4]. Darin sind die Lipopolysaccharide biologisch aktive Bestandteile und verantwortlich für spezifische und unspezifische Immunreaktionen, septischen Schock und Pyrogenität [5]. Generell weisen Lipopolysaccharide von Wildtypen (S-Mutanten) drei Zonen mit unterschiedlichen chemischen und biologischen Eigenschaften auf:

Zone I besteht aus den O-spezifischen Polysacchariden, welche für die immunologische Spezifizierung maßgeblich sind. Diese Polysaccharide von Zone I sind wiederum an das sog. core-Polysaccharid gebunden, welches nun die Zone II bildet und für Gruppen von Bakterien chemisch identisch ist. Schließlich sind die core-Polysaccharide über 2-keto-3-deoxyoctonat Trisaccharide mit dem Lipidanteil,

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Wawra.

0341-0382 / 79 / 0300-0171 \$ 01.00/0

der Zone III verknüpft, die allgemein als Lipid A bezeichnet wird.

Die chemische Struktur konnte von Arbeitsgruppen des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie in Freiburg aufgeklärt werden [6, 7]. Danach besteht eine Polymerkette des Lipopolysaccharides aus  $\beta$ -1,6 gebundenen D-Glucosamin Disacchariden, welche durch Pyrophosphatbrücken in  $\beta$ -1,4-Bindung verknüpft sind (Abb. 1). Die Hydroxylgruppen der Glucosaminreste sind durch Lauryl-, Palmityl- und D-3-Myristoxymyristinsäurereste verestert, während die Aminogruppen durch D-3-Hydroxymyristinsäurereste substituiert sind. Diese Molekülstruktur ist das Lipid A. Das Lipopolysaccharid der R-Mutante 595 von *Salmonella minnesota* hat nun an der Hydroxylgruppe des C<sub>3</sub> eines Glucosaminrestes jeder Disacchariduntereinheit ein Trisaccharid gebunden, welches aus drei Resten von 2-keto-3-deoxyoctonat besteht. Dagegen setzen sich bei dem Lipopolysaccharid der S-Mutante von *Salm. minn.* diese KDO-Trisaccharidreste in einem Polysaccharidstrang weiter fort.

Allgemein besitzen R-Mutanten (raue Mutanten) von Lipopolysacchariden im Gegensatz zu den entsprechenden S-Mutanten nur unvollständig synthetisierte Polysaccharid-Seitenketten, d. h. es fehlen die



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

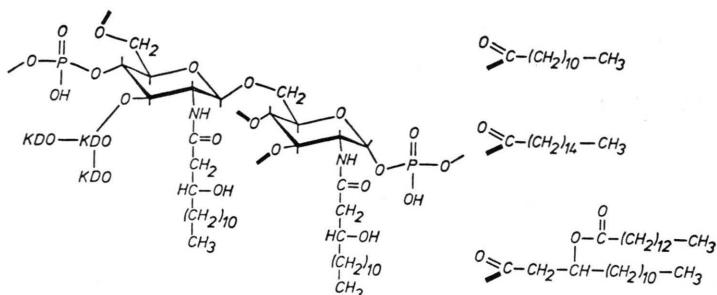


Abb. 1. Chemische Struktur einer Lipid A Einheit von *Salm. minn.* R 595 mit KDO-Trisaccharid. Die drei zusätzlich angegebenen Fettsäurereste sind mit nicht bekannter Verteilung an die OH-Gruppen der Glucosaminreste in den Positionen 3, 4 und 6' gebunden [6].

O-spezifischen Polysaccharide der S-Mutante oder sogar Teile des core. Fehlt schließlich das gesamte core, bestehen also die Moleküle nur mehr aus dem Lipid A-Anteil und den KDO-Gruppen, so wird von Glycolipiden gesprochen. Vorzugsweise an solchen Molekülen wurde die chemische Strukturbestimmung vorgenommen und um solche Moleküle handelt es sich bei der hier untersuchten R-Mutante 595 von *Salm. minn.*

Oberflächenaktive Stoffe bewirken eine Dissoziation der Lipopolysaccharidaggregate in kleinere Partikel, deren Molekulargewichte zum Teil unter 20 000 Dalton liegen [8]. Mit dieser Dissoziation ist auch ein Verlust der biologischen Aktivität verbunden. Nach Entfernen der Detergentien erfolgt neuerliche Aggregation dieser Lipopolysaccharidpartikel. Durch wiederholte Dissoziation und Assoziation können so aus einem Gemisch von Lipopolysacchariden verschiedener Bakterienarten Hybride hergestellt werden [9]. Deacylierte Lipopolysaccharide, denen der hydrophobe Anteil fehlt, sind untoxisch [5], während die Lipopolysaccharide von Mutanten, mit nur drei KDO-Resten an das Lipid A gebunden, eine endotoxische Aktivität wie die Wildtypen aufweisen [6].

### Herstellung von Lipopolysaccharid

Die Bakterienstämme *Salmonella minnesota* S SF 1111 und *Salm. minn.* R 595 SF 1167 erhielten wir von Herrn Dr. G. Schneider, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg.

Beide Bakterienstämme wurden jeweils 36 Stunden in Standard-Nährbouillon angezüchtet. Dann wurde 30 Minuten auf 80 °C erhitzt, abzentrifugiert, zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und eingefroren.

Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota* S wurde nach der Methode von Westphal et al. [10] hergestellt. Eine Suspension von etwa 10 g Bakterien

(bezogen auf Trockensubstanz) in 160 ml Wasser wurde mit 265 ml einer 75-prozentigen Phenol-Wasser-Mischung (200 g Phenol und 65 ml Wasser) versetzt und 10 Minuten bei 70 °C gerührt und nach dem Abkühlen im Eisbad bei 4 °C 30 Minuten lang zentrifugiert (4000 Umdrehungen pro Minute). Die oberste Schicht wurde abgehoben und aufgehoben; der Rest mit 50 ml Wasser versetzt, 10 Minuten bei 70 °C gerührt, im Eisbad gekühlt und bei 4 °C 30 Minuten lang zentrifugiert (4000 Umdr./min.). Die oberste Schicht wurde wieder abgehoben und mit der vorigen vereinigt. Diese Lösung mußte einen Tag gegen fließendes Wasser und einen Tag gegen 101 dest. Wasser dialysiert werden. Das Dialysat wurde im Rotationsverdampfer bei 30 °C auf 50 ml eingeengt und kurz bei 4000 Umdr./min. zentrifugiert, wobei sich eine geringe Menge von unlöslichem Material abschied. Der Überstand wurde in das sechsfache Volumen Äthanol eingegossen und zur Vervollständigung der Fällung noch mit 10 ml einer gesättigten alkoholischen Natriumacetatlösung versetzt. Nach etwa 12 Stunden Stehen wurde der weiße flockige Niederschlag abzentrifugiert (18 000 Umdr./min), der gallertige Niederschlag in wenig Wasser gelöst und dreimal gegen jeweils 2 l Wasser dialysiert. Diese Lösung wurde bei 100 000 × g 4 Stunden zentrifugiert und der gallertige Rückstand in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 225 mg Lipopolysaccharid.

Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota* R 595 wurde nach der Methode von Galanos et al. hergestellt [11]. Die hierfür nötige Extraktionsmischung besteht aus Wasser, Phenol, Chloroform, Petroläther im Verhältnis 0,25:2:5:8. Falls feuchtes Phenol verwendet wurde, ist die Mischung trüb; sie kann jedoch durch weiteren Phenolzusatz geklärt werden. 50 g getrocknete Bakterien wurden mit 200 ml dieser Extraktionsmischung versetzt, im Eisbad gekühlt, 2 Minuten mit einem Ultra-Turrax behandelt, 15 Minuten gerührt, dann 15 Minuten zentrifugiert

(5000 Umdr./min) und der Überstand durch ein Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert. Der Rückstand wurde nochmals wie oben mit 200 ml Extraktionsmischung behandelt, zentrifugiert und der filtrierte Überstand mit der ersten Extraktion vereinigt. Chloroform und Petroläther mußten hieraus bei 30 °C im Rotationsverdampfer entfernt werden. Falls Phenol auskristallisiert, kann es durch Zusatz von etwas Wasser wieder in Lösung gebracht werden. Aus dieser Lösung wurde durch tropfenweisen Zusatz von Wasser das Lipopolysaccharid gefällt. Die Fällung ist beendet, wenn sich das Lipopolysaccharid langsam abzusetzen beginnt. Das gefällte Lipopolysaccharid wurde 10 Minuten lang abzentrifugiert (4000 Umdr./min) und noch zweimal mit jeweils 5 ml 80-prozentiger Phenol-Wasser-Lösung durchgekürt und wiederum abzentrifugiert, wobei nach jedem Dekantieren die Zentrifugenbecher 2 Minuten lang umgekehrt auf Filterpapier gestellt wurden. Der verbleibende Rückstand wurde zur Entfernung von Phenol dreimal mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Lipopolysaccharid wurde bei 45 °C in Wasser gelöst, die Lösung im Vakuum entlüftet und bei 100 000 × g 4 Stunden zentrifugiert. Das transparente Sediment wurde wiederum in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 0,812 g Lipopolysaccharid.

### Röntgenbeugungsuntersuchung

Um Informationen über die räumliche Struktur der Moleküle zu gewinnen, konnten Röntgenbeugungsuntersuchungen sowohl im Kleinwinkel- als auch im Weitwinkelbereich angestellt werden, wobei für die meßtechnische Bewältigung der beachtlichen Intensitätsunterschiede sowie des außerordentlich steilen Verlaufes der Röntgenkleinwinkelbeugungskurven eine spezielle, mit Proportionalzählrohr ausgerüstete Röntgenkleinwinkelkamera verwendet wurde [12]. Diese neu entwickelte Kamera liefert stets unmittelbar die unverschmierte Röntgenkleinwinkelkurve eines Präparates, auch wenn die Messung am langen Focus einer Röntgenröhre erfolgt. Die Streukurvenregistrierung geschieht wie üblich punktweise, für die Monochromatisierung der Strahlung einer Röntgenröhre mit Cu-Anode sorgt eine Kombination von Proportionalzählrohr mit geeignet eingestelltem Impulseinkanaldiskriminator sowie ein in den Strahlengang gebrachtes Ni-Filter zur relativen Schwächung der Intensität der  $\beta$ -Linie. Für die

fotografisch durchgeführten Weitwinkeluntersuchungen stand eine evakuierbare Pinhole-Kamera für Filmkassetten mit einem Präparat-Film-Abstand von etwa 77 mm zur Verfügung. Auch hier wurde mit monochromatischer Röntgenstrahlung aufgenommen, die Monochromatisierung jedoch durch Reflexion des Primärstrahles an einem Graphitmonochromator erzielt.

Mit beiden Kamera-Arten wurde das Präparat der R-Mutante 595 als kristallines Pulver in dünnen Mark-Kapillaren aufgenommen, während von dem Präparat der S-Mutante aus wäßriger Lösung Plättchen hergestellt werden konnten, die für die Beugungsaufnahme in geeigneter Form in den Strahlengang gebracht wurden. Der Verlauf der Röntgenkleinwinkelbeugungskurve des Präparates der R-Mutante 595 ist in Abb. 2 angegeben. Die Aufnahme wurde durch punktweise Messung mit dem Proportionalzählrohr hergestellt, die so erhaltenen Resultate in der Abbildung ohne jede Korrektur wiedergegeben, lediglich auf die Darstellung der zahlreichen Meßpunkte mußte aus zeichentechnischen Gründen verzichtet werden, immerhin ist der Kurvenverlauf durch nahezu hundert Punkte festgelegt.

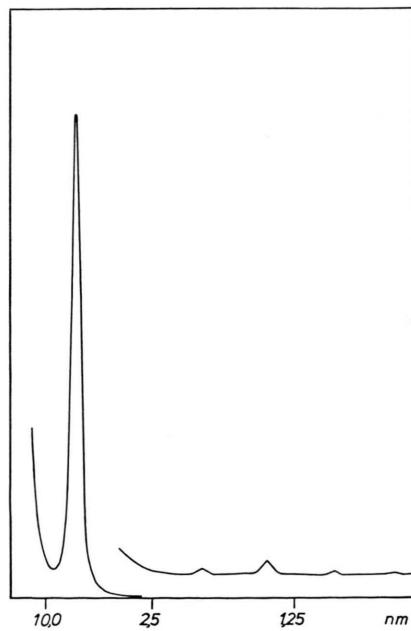


Abb. 2. Röntgenkleinwinkelbeugungskurve eines Lipopolysaccharidpräparates von *Salm. minn.* R 595. Kurvenaußen-  
teil auf das zwanzigfache angehoben. Abstand Präparat-Re-  
gistrierebene 200 mm.

### R-Mutante, Auswertung der Röntgenkleinwinkelauflaufnahme

Die Röntgenkleinwinkelbeugungskurve liefert für das pulverförmige Präparat Gitterinterferenzen bis zur sechsten Ordnung, wobei die Reflexe ohne Zweifel durch die Schichtdickenperiodizität des kristallinen Präparates hervorgerufen werden. Der aus den Reflexabständen zu ermittelnde Wert für die Gitterperiodizität in Richtung der Schichtdicke beträgt 5,4 nm, aus den Präparateigenschaften muß jedoch auf symmetrische Doppelschichten geschlossen werden. Die Moleküle bestehen chemisch aus hydrophilen und lipophilen Anteilen und wurden aus wäßriger Lösung gewonnen, d.h. die hydrophilen Bereiche, also die Anteile mit Glucosamin, Phosphat- und KDO-Gruppen werden die Oberflächen einer Doppelschicht bilden, während die hydrophoben Fettsäurereste in das Innere der Schicht weisen.

Jene der Schichtoberfläche zugekehrten Bereiche besitzen wegen der dort vorhandenen zahlreichen O-Atome des Moleküls und der P-Atome in den Phosphatgruppen im Mittel eine relativ hohe Elektronendichte, während die Bereiche geringerer Elektronendichte durch die in das Innere der Doppelschichten gerichteten Fettsäurereste gebildet werden müssen. Einen solchen Verlauf der Elektronendichte in Richtung der Schichtdicke erhält man, wenn mit den gemessenen sechs Röntgenbeugungsreflexen eine eindimensionale Fouriertransformation gerechnet wird. Die Struktur ist aus den oben angeführten Gründen als zentrosymmetrisch anzusehen, so daß es genügt, für die Reflexamplituden die richtigen Vorzeichen zu finden. Verwendet man in der Reihenfolge der Reflexordnung z.B. die Vorzeichenfolge  $- + - + +$ , dann liefert die Rechnung einen Elektronendichtevektor quer über eine Doppelschicht, wie er in Abb. 3 ohne Skalierung angegeben ist. Dieser Verlauf wird hier natürlich durch das

große Maximum erster Ordnung bestimmt, die Vorzeichenwahl für die Reflexamplituden höherer Ordnung hat nur mehr geringen Einfluß auf die Kurvenform. Der sehr flache Auslauf der Elektronendichte gegen die Mitte der Doppelschicht wird durch die beträchtlichen Längenunterschiede der in der Struktur vorkommenden Fettsäurereste verursacht und beruht auf der mit einer eindimensionalen Fouriertransformation verbundenen Mittelung über dazu normal stehende Ebenen durch die Molekülanoordnung.

### R-Mutante, Auswertung der Weitwinkelauflaufnahme

Neben den in der Bildmitte sichtbaren und von der Schichtdicke herrührenden Beugungsreflexen zeigt die Abb. 4 einen einzelnen intensiven Beugungsring,

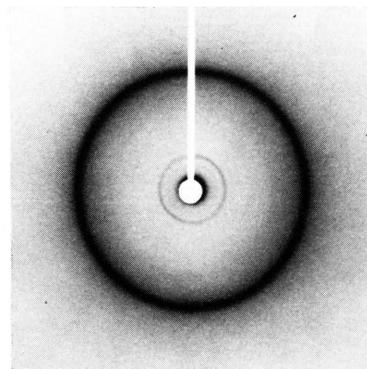


Abb. 4. Weitwinkelauflaufnahme des Lipopolysaccharidpräparates von *Salm. minn.* R 595. Dem Beugungsring entspricht eine Gitterperiodizität von 0,41 nm. Aufnahme mit monochromatischer Röntgenstrahlung ( $\text{Cu K}_\alpha$ ). Präparat-Film-Abstand 77 mm.

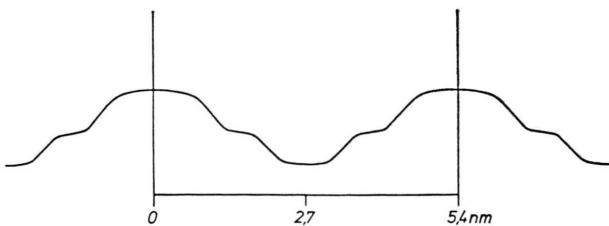


Abb. 3. Durch Fourier-Transformation ermittelte Elektronendichteverteilung in Richtung der Dicke einer Doppelschicht des Lipopolysaccharidpräparates von *Salm. minn.* R 595.

dem ein Braggscher Abstand von 0,41 nm entspricht. Dieser Reflex liegt in einem Winkelbereich, in welchem auch die von der dichten Packung der Fettsäurereste bei Triglyceridkristallen in Fetten verursachten Röntgenbeugungsreflexe aufscheinen. Sucht man nach der Ursache für das Auftreten dieses 0,41 nm-Reflexes bei Lipopolysaccharid-Präparaten, so bleibt kaum eine andere Erklärung als die Annahme, daß dieser Reflex ebenfalls durch eine geeignete parallele Anordnung der Fettsäurereste des Lipid A-Anteiles zustande kommt. Wie Modellversuche zeigen, ist eine solche Anordnung der Fettsäurereste trotz der einseitigen Bindung an Glucosamin möglich, wenn auch mit vereinzelten Lücken

zu rechnen ist. Tatsächlich zeigen lange aliphatische Kohlenwasserstoffe, also auch Triglyceride, bei Kristallisation in der  $\alpha$ -Form einen einzigen Beugungsring, der einer hexagonalen dichten Packung entspricht und eine Gitterkonstante von 0,414 nm angibt [13]. Wegen der guten Übereinstimmung von beiden Werten muß wohl auch die gegebene Deutung als zutreffend angesehen werden. Die vorliegenden Röntgenbeugungsaufnahmen überstreichen einen Winkelbereich, der Braggschen Abständen von 20,0 nm bis etwa 0,2 nm entspricht. Es fällt auf, daß außer einer von der Schichtdickenperiodizität herührenden Reflexgruppe und dem durch die parallel liegenden Fettsäurereste von Lipid A erzeugten Röntgenreflex kein weiterer Beugungseffekt auch nur andeutungsweise in diesem Bereich vorhanden ist. Einziges ordnendes Prinzip ist offenbar neben der Einhaltung der Schichtdicke nur die dichte Packung der Fettsäurereste von Lipid A.

### Beschreibung der Struktur

Akzeptiert man die Deutung des 0,41 nm Interferenzringes als Resultat einer Schicht möglichst dicht und parallel angeordneter Fettsäurereste des Lipid A-Anteiles, so ist wegen der bekannten chemischen Formel des Moleküls die räumliche Struktur eines Monomeren im wesentlichen bereits festgelegt. Die Fettsäurereste weisen dabei allesamt nach einer Richtung und sind durch Glucosaminreste miteinander verbunden. Die KDO-Trisaccharidgruppen sind dann so angeordnet, daß sie auf der den Fettsäureresten abgewandten Seite über den Glucosamin-Phosphatresten zu liegen kommen. Die Abb. 5 gibt einen kleinen Ausschnitt der Struktur als Einfachschicht im Modell wieder, wobei auch die Problematik augenscheinlich wird, die besteht, wenn aus dem röntgenografisch für die Doppelschicht gefundenen Dickenwert von 5,4 nm auf die Dicke einer Einzelschicht geschlossen wird. 2,7 nm können wegen der stark zerklüfteten Oberfläche und der möglichen Verzahnung nur als mittlerer Dickenwert für die Einzelschicht gewertet werden. Die Präparatkristalle bestehen nun aus gestapelten solchen Schichten. Sie wurden aus wäßriger Lösung gewonnen, es ist also zu erwarten, daß sich bereits vor der Stapelung in der Lösung Doppelschichten gebildet haben, in denen beide Oberflächen von den hydrophilen Anteilen der Lipopolysaccharidmoleküle eingenommen werden, nämlich den KDO-Gruppen und den Phosphatresten.

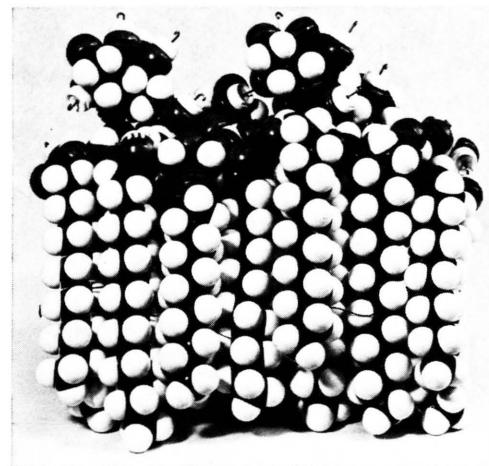


Abb. 5. Kalottenmodell der Struktur eines Teiles der Einfachschicht des Lipopolysaccharides von *Salm. minn.* R 595. Das Modell umfaßt zwei Disacchariduntereinheiten.

Würden den Glycolipidmolekülen auch noch die KDO-Gruppen fehlen, so ist der dann noch verbleibende reine Lipid A-Anteil nicht mehr wasserlöslich. Auf der Oberfläche einer Bakterienzelle werden die Lipopolysaccharide kaum Doppelschichten bilden, sondern das Material ist wohl so angeordnet, daß die parallel stehenden Fettsäurereste gegen den Zellkörper hin einen Sockel bilden, während die Glucosamin-Phosphat-Reste samt den KDO-Gruppen nach außen die Zelloberfläche darstellen. Allerdings sind derzeit noch gewisse Variationsmöglichkeiten für die Struktur vorhanden, da es bis jetzt noch nicht gelungen ist, alle in Abb. 1 angegebenen Fettsäurereste den verschiedenen Bindungsstellen eindeutig zuzuordnen. Mit Ausnahme der 3-Hydroxy-Myristinsäure, welche stets an die Aminogruppe von Glucosamin gebunden ist, bestehen zumindest theoretisch an den OH-Gruppen der Positionen 3, 4 und 6' unterschiedliche Besetzungsmöglichkeiten [6].

### S-Mutante

Der chemische Aufbau der Lipopolysaccharide von S-Mutanten ist in Abb. 6 dargestellt, mit geänderter Bezeichnung für die bereits angegebene Zonenunterteilung [14]. An die Hydroxylgruppe am C-Atom 3' der Disacchariduntereinheit ist das gruppenspezifische, also bei allen *Salmonella*-Arten gleiche Kernpolysaccharid gebunden. Es besteht aus einer Hauptkette, die an verschiedenen Stellen durch Mono-

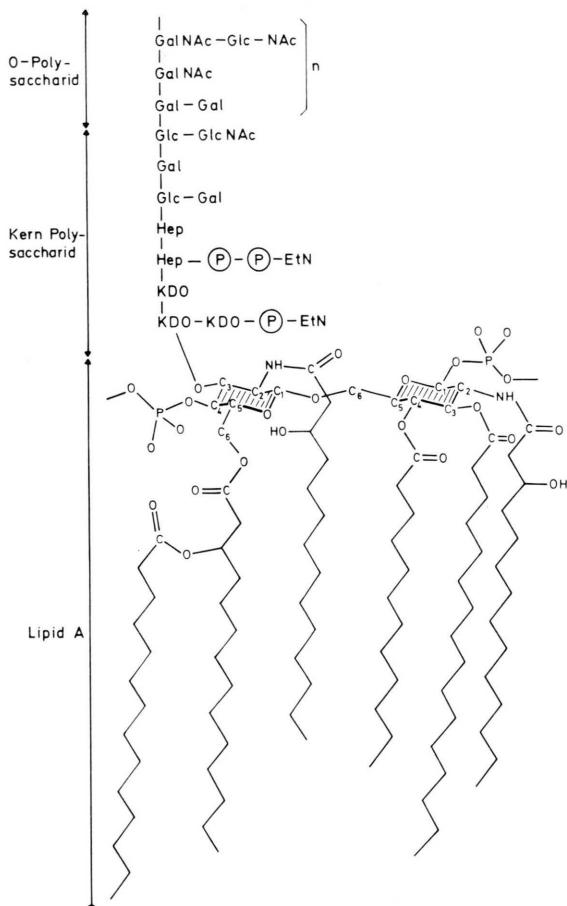


Abb. 6. Chemische Struktur des Lipopolysaccharides von *Salm. minn. S.* [14]. KDO, 2-Keto-3-deoxyoctonsäure (3-Deoxy-D-mannoctulosäure). Hep, L-Glycero-D-mannoheptose. (P)-EtN, Phosphoäthanolamin; (P)-(P)-EtN, Pyrophosphoäthanolamin.

saccharide, Phosphate, Phosphoäthanolamin und Pyrophosphoäthanolamin substituiert ist. Das Kernpolysaccharid enthält zwei markante Zucker, die nur in Bakterienzellwänden vorkommen: L-Glycero-D-mannoheptose und 2-Keto-3-deoxyoctonat [6, 7]. An dieses Kernpolysaccharid ist das artspezifische O-Polysaccharid gebunden. Es setzt sich aus mehreren sich wiederholenden Trisacchariduntereinheiten zusammen, an welche noch weitere Zucker als Seitenketten gebunden sein können [14].

Die Röntgenbeugungsaufnahmen der Präparate von *Salm. minn. S.* bieten gegenüber den Aufnahmen der R-Mutante etwas weniger Information. Immerhin liefert eine Weitwinkelbeugungsaufnahme (Abb. 7) wie für die R-Mutante ebenfalls einen Beugungsring entsprechend einem Braggschen Abstand

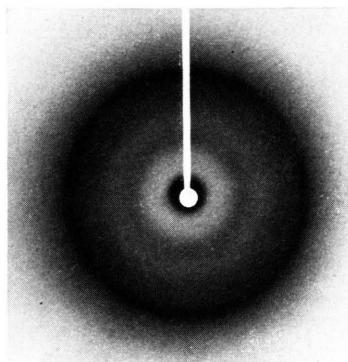


Abb. 7. Weitwinkelaufnahme eines Lipopolysaccharidpräparates der S-Mutante von *Salm. minn.* Dem Beugungsring entspricht eine Periodizität von 0,41 nm. Aufnahmebedingungen wie in Abb. 4.

von 0,41 nm, allerdings bei schon wesentlich stärkerer diffuser Untergrundstreuung. Man wird nicht fehlgehen, als Ursache für den Interferenzring auch hier die parallele Lage der Fettsäurereste des Lipid A-Anteiles zu betrachten und man wird annehmen können, daß die räumliche Struktur des Lipid A-Anteiles für beide untersuchten Mutanten dieselbe ist. Im Gegensatz zu den Weitwinkelbeugungen sind die Röntgenkleinwinkelbeugungskurven für beide Mutanten wesentlich verschieden. Um eine Deutung der Streukurvenform des orientierten Präparates in Abb. 8 zu erhalten, wurde eine Zerlegung in kristal-

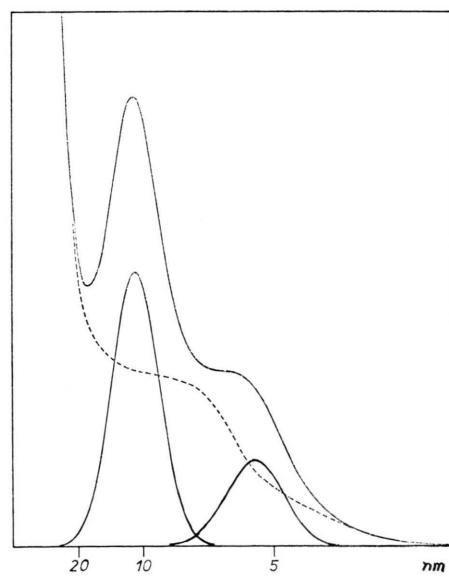


Abb. 8. Röntgenkleinwinkelkurve eines Lipopolysaccharidpräparates der S-Mutante von *Salm. minn.* Abtrennung der Gitterinterferenzen.

line Anteile und diffuse Streuung versucht. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, konnte die ursprüngliche Streukurve einerseits in zwei Interferenzen von 10,9 nm und den halben Wert zerlegt werden, sowie andererseits in eine mehr diffuse Streuung, wie sie die gestrichelte Kurve angibt. Es wird also auch für das Präparat der S-Mutante wenigstens teilweise die Bildung von Doppelschichten aus der wäßrigen Lösung erwartet werden können, wobei nun aber die Gitterkonstante mit 10,9 nm fast genau doppelt so groß ist als für die R-Mutante. Für die Abbildung wurde die Streukurve mit der größten Gitterkonstanten für das innen liegende Maximum verwendet, diese Kurve zeigt auch die deutlichste Schulter im Kurvenverlauf an der Stelle des Reflexes zweiter Ordnung. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Streukurvenmessungen von Präparaten der S-Mutante, bei welchen aus der Lage des Reflexes erster Ordnung kleinere Gitterkonstanten und damit Schichtdicken berechnet werden können, z.B. 10,0 nm in einer Aufnahme einer anderen Arbeit [12].

Mit den vorliegenden Röntgendiffraktionsdaten könnte nun die Einfachschicht des Lipopolysaccharides der S-Mutante von *Salm. minn.* folgendermaßen beschrieben werden: Die parallel nebeneinander stehenden und einen Sockel bildenden Fettsäurereste von Lipid A sind an darüberliegende Disaccharide aus Glucosaminresten gebunden. Zusammen mit den KDO-Trisacchariden bildet der Lipid A-Anteil etwa die innere Hälfte der Einzelschicht mit einer Schichtdicke von 2,7 nm. Nach außen, also zur Zelloberfläche hin, schließt eine Schicht von im Mittel 2,75 nm Dicke an, welche von den an KDO-Trisaccharide gebundenen Polysaccharidketten eingenommen wird. Über eine regelmäßige räumliche Anordnung dieser Polysaccharidketten sind allein aus den Röntgenbeugungsaufnahmen keine weiteren Angaben möglich, da in den vorliegenden Aufnahmen, welche ebenfalls einen Winkelbereich von 20,0 bis 0,2 nm erfassen, derartige Informationen nicht enthalten sind.

## Schluß

Die hier verwendeten Lipopolysaccharidpräparate sind frei von Ca-Ionen. Daß diese und andere divalente Kationen Lipopolysaccharidpartikel zusammenhalten, wurde daraus geschlossen, daß durch Dialyse gegen EDTA Partikel von einem Molekulargewicht von 134 000 Dalton erhalten werden konnten [15]. Die Kationen binden vermutlich an negativ geladene Phosphat- und Carboxylgruppen und bewirken dadurch neben den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureresten von Lipid A eine zusätzliche Quervernetzung in der polaren Region des Lipopolysaccharids. Bekannt ist die sehr leichte Ablösbarkeit der Lipopolysaccharidschicht von der Zelloberfläche durch Detergentien oder Phenol, was auf das Fehlen von Hauptvalenzbindungen zu der darunterliegenden unmittelbar benachbarten Schicht der Zellwand hinweist, ein Sachverhalt, der durch das hier angegebene Modell hinreichend erklärt wird.

Durch eine vor kurzem bekanntgewordene Untersuchung sind Zweifel an der Verknüpfung der Disacchariduntereinheiten von Lipid A über Pyrophosphat-Phosphodiester-Brücken zu Polymerketten aufgekommen [16]. Auch eine Verknüpfung über Phosphodiesterbindungen war nicht nachzuweisen. Das würde bedeuten, daß Lipopolysaccharid-Aggregate, abgesehen von den mehr oder weniger langen Saccharid-Seitenketten, nur aus den relativ kleinen Disacchariduntereinheiten mit zwei Phosphatgruppen samt den zugehörigen Fettsäureresten bestehen und durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Fettsäureresten zustande kommen, d. h. nicht aus Disaccharid-Pyrophosphatkettten aufgebaut sind. Auf einen derartigen Sachverhalt zumindest bei dem Präparat der R-Mutante weisen auch die hier wiedergegebenen Röntgenbeugungsaufnahmen hin, die wie schon erwähnt, nicht den geringsten Beugungseffekt zeigen, der von einer Periodizität in den Glucosamin-Pyrophosphatkettten von Abb. 1 herrühren könnte.

- [1] A. M. Glauert u. M. J. Thornley, Ann. Rev. Microbiol. **23**, 159 (1969).
- [2] S. De Petris, J. Ultrastruct. Res. **19**, 45 (1967).
- [3] H. Frank u. D. Dekegel, Folia Microbiologica **12**, 227 (1967).
- [4] H. P. Hofschneider u. H. H. Martin, J. Gen. Microbiol. **51**, 23 (1968).
- [5] O. Lüderitz, Angew. Chem. **82** 708 (1970).
- [6] O. Lüderitz, C. Galanos, V. Lehmann, M. Nurminen, E. T. Rietschel, G. Rosenfelder, M. Simon u. O. Westphal, J. Infectious Diseases **128**, Supplement S 17 (1973).
- [7] E. T. Rietschel u. O. Lüderitz, Z. Immun. Forsch. **149**, 201 (1975).
- [8] J. W. Shands, Microbial Toxins (G. Weinbaum, S. Kadis u. S. J. Ajl, Hrsg.), Acad. Press New York 1971.
- [9] J. A. Rudbach K. C. Milner u. E. Ribi, J. Exp. Med. **126**, 63 (1967).
- [10] O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforsch. **7b**, 148 (1952).
- [11] C. Galanos, O. Lüderitz u. O. Westphal, Eur. J. Biochem. **9**, 245 (1969).

- [12] H. Wawra, Z. Naturforsch. **31c**, 635 (1976).
- [13] H. P. Kaufmann, Analyse der Fette und Fettprodukte I. Springer, Berlin 1958.
- [14] O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub u. H. Mikaido, Microbial Toxins, (G. Weinbaum, S. Kadis u. S. J. Ajl, Hrsg.), **Vol. 5**, Acad. Press New York 1971.
- [15] A. L. Olins u. R. C. Warner, J. Biol. Chem. **242**, 4994 (1967).
- [16] P. F. Mühlradt, V. Wray u. V. Lehmann, Eur. J. Biochem. **81**, 193 (1977).