

etwa 100 mm Druck entstehen, wenn die Flüssigkeit nicht retiniert, und weniger, wenn die Flüssigkeit retiniert. Für 7 cm<sup>3</sup> der Kulturlösung, in der wir die Chlorella züchten und ihre Photosynthese messen, fanden wir bei Sättigung mit 5 Vol.-Proz. Kohlensäure, bei 20°, bei verschiedenem p<sub>H</sub>, pro mm Brodie CO<sub>2</sub>-Druck, die folgenden Retentionen.

p <sub>H</sub>	4,2	5,25	5,85	6,6
Retention R $\left[ \frac{\text{mm}^3 \text{CO}_2}{\text{mm Brodie}} \right]$	0	0,032	0,145	0,473

Bedenkt man, daß die k<sub>CO<sub>2</sub></sub>-Konstanten bei unseren Messungen der Photosynthese in Kulturlösung von der Größenordnung 1,5 bis 2,0 mm<sup>2</sup> sind, so sieht man aus den mitgeteilten Zahlen, daß zwischen p<sub>H</sub> 4 und 5 die Retention R gegen k<sub>CO<sub>2</sub></sub> zu vernachlässigen ist, d. h., daß die Retention der CO<sub>2</sub> zu gering ist, als daß sie berücksichtigt werden müßte. Sehr lange Versuche wird man, um das Auftreten einer merklichen Retention hinauszuschieben, mit 10 Vol.-Proz. CO<sub>2</sub> im Gasraum beginnen.

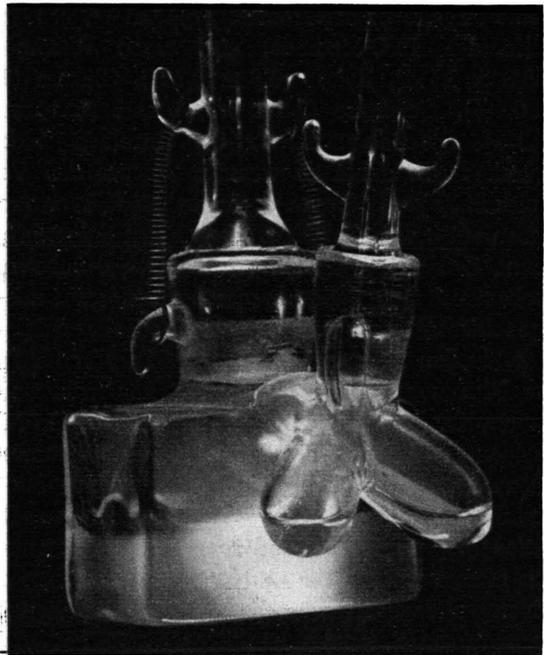


Abb. 1. Gefäß zur Retentionsbestimmung in Chlorella-Kulturlösung.

## Über bakterielle Reizstoffe

### V. Mitteilung: Identifizierung der Zuckerbausteine eines pyrogenen Lipopolysaccharids aus *E. coli* mittels Papierchromatographie und der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion nach Dische

VON INGE FROMME, OTTO LÜDERITZ UND OTTO WESTPHAL  
 Aus dem Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Säckingen (Baden)  
 (Z. Naturforsch. 9b, 303—307 [1954]; eingegangen am 8. Februar 1954)

Das Säure-Hydrolysat des pyrogenen Lipopolysaccharids aus Colibakterien (Stamm Kröger-O<sub>8</sub>) wurde hinsichtlich der Zuckerbausteine papierchromatographisch getrennt. Nach Elution der einzelnen Zucker erfolgte deren Analyse mit Hilfe der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion nach Dische. Hierbei wurden in Übereinstimmung mit früheren Analysen die folgenden Zuckerbausteine identifiziert: Galaktose, Glucose, Xylose und Rhamnose. Zwischen Galaktose und Glucose fanden sich zusätzlich geringe Mengen einer Heptose. Die quantitative Auswertung der auf Grund der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion gemessenen Extinktionswerte charakteristischer Absorptionsmaxima gestattete die Berechnung des prozentualen Anteils der Zuckerbausteine im Lipopolysaccharid. Die Werte stehen mit den nach der TTC-Methode früher erhaltenen Daten in guter Übereinstimmung.

In unserer I. Mitteilung über bakterielle Reizstoffe<sup>1</sup> haben wir die Reindarstellung und einige biologische Eigenschaften eines hochwirksamen Pyrogens aus Colibakterien (Stamm Kröger-O<sub>8</sub>) beschrieben.

<sup>1</sup> O. Westphal, O. Lüderitz, E. Eichenberger u. W. Keiderling, Z. Naturforsch. 7b, 536 [1952].

Das Pyrogen erwies sich als hochmolekulares Lipopolysaccharid, welches zu 74% aus einer phosphorylierten Polysaccharid-Komponente und zu etwa 26% aus einer lipoidalen Komponente aufgebaut ist<sup>1,2</sup>. Die qualitative und quantitative Bestimmung der Zuckerbau-

<sup>2</sup> G. Schramm, O. Westphal u. O. Lüderitz, Z. Naturforsch. 7b, 594 [1952].

steine erfolgte papierchromatographisch<sup>3,4</sup>, u. a. mit Hilfe der TTC-Methode, und ergab Rhamnose ( $38,6 \pm 3,1\%$ ), Xylose ( $9,8 \pm 0,7\%$ ), Glucose ( $9,6 \pm 0,2\%$ ), Galaktose ( $2,5 \pm 0,7\%$ ) und Hexosamin ( $5,3\%$ ). Die Identifizierung der einzelnen Zucker gründete sich dabei im wesentlichen auf den Vergleich ihrer papierchromatographischen  $R_f$ -Werte mit denen entsprechender Testzucker. Es ist indessen bekannt, daß gleichartiges Verhalten zweier Substanzen auf dem Papierchromatogramm zur eindeutigen Identifizierung eines Zuckers (oder irgendeiner individuellen Substanz) nicht ausreicht. Nur im Fall der Rhamnose wurde aus einem Papierchromatogramm der betreffende Streifen eluiert und die Methylpentose in Form des kristallisierten Rhamnosephenylosazons in Substanz nachgewiesen; ferner gestattet bekanntlich die *Elson-Morgan*-Reaktion die quantitative und spezifische Bestimmung von Hexosamin. Für die übrigen Zuckerbausteine erschien es dagegen wünschenswert, die bisherigen Befunde durch weitere unabhängige Methoden zu ergänzen.

*Dische*<sup>5,6</sup> hat vor einigen Jahren ein Nachweisverfahren angegeben, welches es gestattet, praktisch alle Monosaccharide voneinander zu unterscheiden und einzelne individuelle Zucker mit großer Sicherheit zu identifizieren. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, daß viele Zucker beim Erhitzen mit starker Schwefelsäure Umwandlungsprodukte bilden, die im Ultraviolett absorbieren<sup>7</sup>. Diese Substanzen reagieren mit Cystein unter Bildung von Verbindungen mit charakteristischen Absorptionsspektren.

Da die Reaktionsprodukte sich beim Stehen mit Schwefelsäure-Cystein in charakteristischer Weise langsam verändern, erfolgt die spektrophotometrische Auswertung zu drei verschiedenen Zeitpunkten: nach Zusatz von Schwefelsäure (Kurve I),  $1\frac{1}{2}$  und 48 Stdn. nach Zusatz von Cystein (Kurven II und III). Man erhält also drei Absorptionsspektren. *Mindestens eine* der erhaltenen Kurven ist für jedes individuelle Monosaccharid charakteristisch und gestattet des-

sen Identifizierung, auch im Gemisch mit anderen Zuckern. Im Zusammenhang mit der Analyse der von uns dargestellten bakteriellen Lipopolysaccharide<sup>1-4,8</sup> verfolgten wir die Reaktion bei reiner Galaktose, Glucose, Mannose, Xylose, Ribose, Arabinose, Rhamnose und Glucuronsäure sowie bei einigen Heptosen und konnten die Befunde von *Dische* u. a.<sup>5,6,9,10</sup> bestätigen.

Lediglich einige gegen Säuren sehr empfindliche Desoxyzucker, wie Digitoxose, sowie Tyvelose und Abequose<sup>11</sup>, verhalten sich relativ uncharakteristisch, und auch Glucosamin ist mit Hilfe der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion nicht sicher nachweisbar. Die üblichen Pentosen, Hexosen und Heptosen können jedoch eindeutig bestimmt werden. Bei den von uns vergleichsweise untersuchten Methylpentosen Rhamnose und Fucose ergab sich, daß deren Absorptionskurven so ähnlich sind, daß ihre Identifizierung nur unter gleichzeitiger Berücksichtigung des papierchromatographischen Verhaltens eindeutig ist.

Neuerdings haben *Jesaitis* und *Goebel*<sup>12</sup> mit Hilfe dieser Reaktion die Zuckerbausteine des Lipopolysaccharids aus dem somatischen Antigen von *Shigella sonnei* (Phase II) als Glucose, Galaktose und Galaheptose, neben Hexosamin, identifiziert. *Slein* und *Schnell*<sup>9</sup> isolierten eine phosphorylierte Aldoheptose aus *Shigella flexneri* und konnten die Heptose mittels der *Dische*-Reaktion<sup>10</sup> als Gala-mannoheptose identifizieren.

Wir haben uns derselben Reaktion bedient und die Zuckerbausteine des von uns bereits beschriebenen pyrogenen Lipopolysaccharids aus Colibakterien<sup>1,2,3</sup> nach papierchromatographischer Trennung des Hydrolysates der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion unterworfen.

### Beschreibung der Versuche

**Hydrolyse.** 50 mg durch Ultrazentrifugation hochgereinigtes Lipopolysaccharid-Pyrogen aus Colibakterien (Stamm *Kröger-O<sub>8</sub>*)<sup>1</sup>, Präparat Co<sub>677</sub>S, wurden mit 1-n. Schwefelsäure, wie bereits beschrieben<sup>4</sup>, während 5 Stdn. bei 95–100°C hydrolysiert. Die schwefelsaure Lösung wurde mit Baryt neutralisiert, das ausgeschiedene Bariumsulfat durch Zentrifugation entfernt und die klare Hydrolysenlösung auf ein Volumen von 0,5–1 ccm eingeeengt.

<sup>8</sup> O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforschg. **7b**, 148 [1952].

<sup>9</sup> M. W. Slein u. G. W. Schnell, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **82**, 734 [1953].

<sup>10</sup> Z. Dische, J. biol. Chemistry **204**, 983 [1953].

<sup>11</sup> Vgl. O. Westphal, O. Lüderitz, J. Fromme u. N. Joseph, Angew. Chem. **65**, 555 [1953].

<sup>12</sup> M. A. Jesaitis u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine **96**, 409 [1952].

<sup>3</sup> O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforschg. **7b**, 136 [1952].

<sup>4</sup> O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforschg. **7b**, 548 [1952].

<sup>5</sup> Z. Dische, L. B. Shettles u. M. Osnos, Arch. Biochem. Biophysics **22**, 169 [1949].

<sup>6</sup> Z. Dische, in Phosphorus Metabolism **1**, 171–199, Johns Hopkins Press, Baltimore 1951.

<sup>7</sup> M. Ikawa u. C. Niemann, J. biol. Chemistry **180**, 923 [1949].

Papierchromatographie. Auf einem Whatman-Nr. 1-Filterbogen wurden entlang der Startlinie mit einer Platinöse 10 Punkte nebeneinander aufgetragen und am linken und rechten Ende in einigem Abstand zusätzlich noch je eine Probe. Das Chromatogramm wurde im üblicher Weise mit Pyridin-Butanol-Wasser (2:3:1,5) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die beiden äußere

Elution. Die Streifen wurden in einer Glaskammer nach Art der absteigenden Chromatographie mit destilliertem Wasser eluiert. Die eluierten Zucker befanden sich in den ersten Tropfen des Eluats. Die abgetropfte Flüssigkeit wurde anschließend mit dest. Wasser auf 5,0 ccm aufgefüllt und zur Entfernung geringer Mengen von Zellulose-Fasermaterial durch eine Glasfritte filtriert.

Schwefelsäure-Cystein-Reaktion (qualitativ). 1. Zu 4,5 ccm eisgekühlter Schwefelsäure (87 ccm konz. Schwefelsäure,  $\rho = 1,84$ , plus 9 ccm Wasser) wurde unter Eiskühlung 1,0 ccm der passend verdünnten Zuckerklösung\* hinzugefügt. Nach 3—5 Min. Stehen bei Zimmertemperatur wurde in ein kochendes Wasserbad eingestellt und 3 Min. (Stoppuhr) bei etwa 100° gehalten, danach mit kaltem Wasser rasch auf Zimmertemperatur gekühlt. Anschließend haben wir die Absorption im Spektralphotometer (Zeiss Opton) gegen eine Blindprobe gemessen, die keinen Zucker enthielt, aber sonst in gleicher Weise bereitet war (Kurve I). 2. Zur Testlösung und Blindprobe\*\* wurde 0,1 ccm einer 3-proz. Cysteinhydrochlorid-Lösung unter Umschütteln hinzugefügt. Nach 1½ Stdn. photometrierten wir beide Proben gegeneinander (Kurve II). 3. Nach 48-stdg. Stehen wurde das Absorptionsspektrum erneut aufgenommen (Kurve III).

Vergleich der Zuckerbausteine aus dem Coli-Lipopolysaccharid mit entsprechenden Proben reiner Zucker. In unserer II. Mitteilung über bakterielle Reizstoffe haben wir über die Bestimmung der Zuckerbausteine des pyrogenen Lipopolysaccharids aus *E. coli* berichtet<sup>4</sup>. Es wurden neben einer Aminohexose gefunden: Galaktose (wenig), Glucose, Xylose und Rhamnose. In Abb. 1 sind die Absorptionsspektren der reinen Test-Zucker (Ansätze jeweils mit 100  $\mu\text{g}/\text{cm}$ ) den zugehörigen Proben aus den Streifen Nr. 7/8, 12, 17 und 22 des Chromatogramms gegenübergestellt. Diese Streifen enthielten auf Grund der beiden Leitchromatogramme jeweils die Hauptmengen der einzelnen Zuckerbausteine. Die gemessenen Absorptionskurven der Eluat-Zucker wurden so aufgetragen, daß sie den 100- $\mu\text{g}$ -Proben der Testzucker hinsichtlich der Extinktion des Hauptmaximums entsprachen (s. Abb. 1).

Das Eluat von Streifen Nr. 9 zeigte im 48-Stdn.-Spektrum (Kurve III) ein starkes Maximum bei 500  $\mu\mu$ , welches sowohl bei Galaktose wie bei Glucose fehlt und das nach D i s c h e<sup>10</sup> charakteristisch für Heptosen ist. Von dieser Heptose sind jedoch weniger als 1% in das Coli-Lipopolysaccharid eingebaut. In den übrigen Streifen fanden wir nur die

\*\* Man kann unmittelbar die Proben verwenden, welche zur Aufnahme von Kurve I gedient haben, oder entsprechend neue Proben mit Schwefelsäure-Cystein ansetzen.

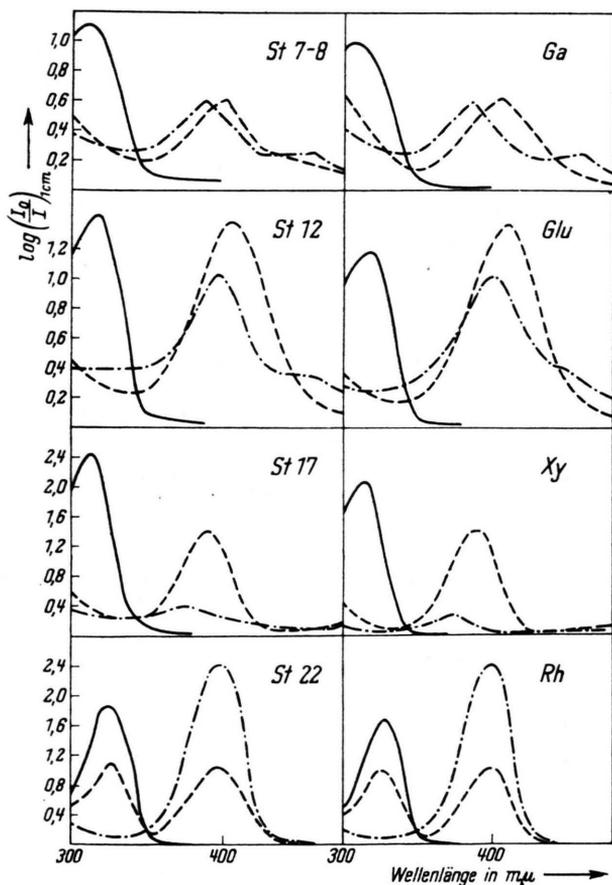


Abb. 1. Schwefelsäure-Cystein-Reaktion nach D i s c h e. Links: Kurven der Zucker aus dem Colipyrogen  $\text{Co}_{877}\text{S}$  nach Hydrolyse, Papierchromatographie und Elution der Streifen Nr. 7—8, 12, 17 und 22. Rechts: Kurven von je 100  $\mu\text{g}$  der Testzucker Galaktose (Ga), Glucose (Glu), Xylose (Xy) und Rhamnose (Rh). — Absorptionskurve nach Behandlung mit Schwefelsäure (I), - - - Absorptionskurve 1,5 Stdn. nach Cystein-Zugabe (II), - · - · - Absorptionskurve 48 Stdn. nach Cystein-Zugabe (III).

ren Leitchromatogramme abgeschnitten und mit Anilin/Phthalsäure angefärbt. Der breite Mittelstreifen mit den 10 Proben wurde an Hand der beiden Leitchromatogramme in insgesamt 25 Streifen derart zerlegt, daß die Hauptmenge jedes einzelnen Zuckers jeweils in einem Streifen enthalten war. Die Streifen waren 1—2 cm breit.

\* Die für die Messung günstigste Konzentration liegt zwischen 50 und 100  $\mu\text{g}$  Zucker/ccm.

Präparat	Methode	% Anhydrozucker					% Reduzierende Zucker (Hagedorn-Jensen)
		Galaktose	Glucose	Xylose	Rhamnose	Hexosamin (Elson-Morgan)	
Co <sub>677</sub> S	Dische-Reaktion	2,7	10,0	10,1	34,8	7,5	74
Co IV/F 77 S	TTC	2,5	9,6	9,8	38,6	5,8	76
Co <sub>621</sub> S	TTC	2,0	6,5	10,3	38,0	7,5	74

Tab. 1. Prozentuale Anteile der Zuckerbausteine im pyrogenen Lipopolysaccharid aus Colibakterien (Ergebnis von drei verschiedenen Aufarbeitungen).

zu erwartenden Monosaccharide, so daß damit die früheren qualitativen Analysen<sup>3,4</sup> bestätigt und gesichert wurden.

Quantitative Auswertung der Schwefelsäure-Cystein-Reaktion. Da das Lambert-Beersche Gesetz für die Reaktionsprodukte bei der Cystein-Schwefelsäure-Reaktion Gültigkeit hat<sup>10</sup>, kann man durch Vergleich der Extinktion der Versuchssproben mit den zugehörigen Lösungen der Test-Zucker unter Einrechnung der vorgenommenen Verdünnung die Menge der aus dem Papierstreifen eluierten Zucker quantitativ bestimmen. Der Berechnung wurde eines der charakteristischen Absorptionsmaxima des jeweils zugehörigen reinen Test-Zuckers zugrunde gelegt. Streifen, bei welchen eine Überschneidung benachbarter Zuckerflecke vor-

lag (z. B. Streifen 9, 14 und 18—20), enthielten von beiden Substanzen naturgemäß nur relativ geringe Mengen, deren Anteile nur angenähert bestimmt wurden. Der hierdurch entstehende Fehler ist gering.

Abb. 2 zeigt die mengenmäßige Verteilung von Galaktose, Glucose, Xylose und Rhamnose in dem beschriebenen Chromatogramm. Dieses entspricht den in unserer II. Mitteilung<sup>4</sup> dargestellten Abb. 1 und 2. Aus dem Flächeninhalt für jeden Zucker ergibt sich dessen Quantität im Chromatogramm.

Bei dem oben durchgeführten Versuch erhielten wir folgende Mengen an eluierten Zuckern:

Galaktose . . . . .	95 µg,
Glucose . . . . .	349 µg,
Xylose . . . . .	353 µg,
Rhamnose . . . . .	1215 µg.

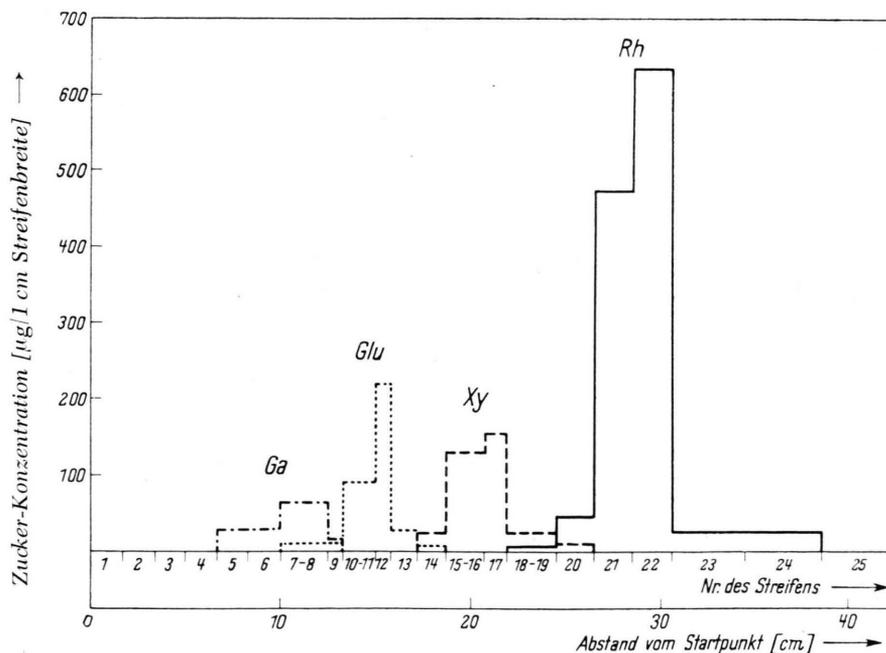


Abb. 2. Verteilung von Galaktose, Glucose, Xylose und Rhamnose auf dem Papierchromatogramm des Hydrolyсата von Colipyrogen Co<sub>677</sub>S, ermittelt durch Auswertung der Absorptionskurven nach Reaktion mit Schwefelsäure-Cystein.

Zur Berechnung der prozentualen Anteile der einzelnen Zuckerbausteine als Anhydrozucker im Coli-Lipopolysaccharid (Präparat Co<sub>677</sub>S) berücksichtigten wir die folgenden weiteren analytischen Daten: Hexosamin (E l s o n - M o r g a n) 8,3%; reduzierende Zucker nach Hydrolyse (H a g e d o r n - J e n s e n) 74%, ber. als Glucose. Die geringen Mengen an Heptose (< 1%) haben wir nicht berücksichtigt. Die weitere Berechnung wurde wie in unserer II. Mitteilung<sup>4</sup> durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in

Tab. 1 zusammengestellt. Zum Vergleich haben wir die nach der TTC-Methode erhaltenen Daten unserer II. Mitteilung (Präparat Co IV/F77 S) mit aufgeführt. Zusätzlich führen wir noch die Resultate der TTC-Analyse eines dritten Präparates (Co<sub>621</sub>S) auf.

Die drei Präparate sind Aufarbeitungen aus verschiedenen Kulturansätzen des gleichen Coli-Keims (K r ö g e r - O<sub>8</sub>), rein dargestellt nach dem gleichen Verfahren<sup>1</sup>. Die Übereinstimmung der Ergebnisse für die drei Präparate ist befriedigend.

## Über <sup>131</sup>J-signiertes Insulin III (Verteilung im Rattenorganismus)

VON EKKEHARD KALLEE\* und GERHARD SEYBOLD

Medizinische Universitätsklinik Tübingen (Dir.: Prof. Dr. H. Bennhold)

(Z. Naturforschg. 9b, 307—319 [1954]; eingegangen am 11. Januar 1954)

Am Beispiel eines Proteohormons wird eine neue Möglichkeit geschildert, wie die Verteilung von Spurenproteinen im Körper durch die Kombination von Isotopenmarkierung, Papierelektrophorese, Zellfraktionierung und Histologie untersucht werden kann. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Insulin wurde mit so hohen Radiojodmengen markiert, daß der physiologische Weg in die Organe verfolgt werden konnte und eine ausreichende Belichtung der Autoradiographien von Gewebsschnitten möglich war.

2. <sup>131</sup>J-Insulin verschwindet nach intravenöser Injektion etwas langsamer aus der Blutbahn als das <sup>131</sup>J-Ion, aber wesentlich rascher als <sup>131</sup>J-Serum.

3. Bei den <sup>131</sup>J-Insulinratten findet sich die stärkste Radioaktivität in Niere, Leber, Serum und Milz; die Radioaktivität in der Muskulatur ist wesentlich geringer. Die Radioaktivitäts-Anreicherung in Leber und Niere ist nach Injektion von <sup>131</sup>JNa, <sup>131</sup>J-Serum und <sup>131</sup>J-Insulin qualitativ und quantitativ verschieden.

4. In dialysierten Mitochondrien-Extrakten von Leber und Niere können auf Grund der papier-elektrophoretischen Beweglichkeit Spaltprodukte des <sup>131</sup>J-Insulins und unverändertes <sup>131</sup>J-Insulin nachgewiesen werden.

5. <sup>131</sup>J-Insulin wird auch in vitro von Lebermitochondrien absorbiert, allerdings wesentlich weniger als in vivo.

6. Histologisch findet sich die Radioaktivität in der Niere vorwiegend in den Tubuli contorti I. Ordnung, in der Leber in den Kupfferschen Sternzellen und in den Leberzellen selbst, in der Milz mehr über der roten als über der weißen Pulpa. Daneben finden sich in manchen Kapillaren von Leber, Milz und Lunge vereinzelt Stellen mit einer maximalen Anreicherung von Radioaktivität.

Proteohormone und andere Proteine mit hoher biologischer Wirksamkeit (Toxine, Allergene, Apofermente usw.) sind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in allen Körperflüssigkeiten und Organen so gering konzentriert, daß sie — außer in ihren Bildungsstätten und im Blut — bisher nirgends direkt nachgewiesen werden konnten. Selbst Markierungen mit radioaktiven Isotopen<sup>1, 2</sup> brachten

bislang nicht den erhofften Fortschritt: man kann zwar die Konzentration des radioaktiven Isotops in den untersuchten Geweben messen oder mit histo-

<sup>1</sup> L. Reiner u. E. H. Lang, J. biol. Chem. **139**, 641 [1941]; ders., A. S. Keston u. M. Green, Science [New York] **96**, 362 [1942]; ders., E. H. Lang, J. W. Irvine jr., W. Peacock u. R. D. Evans, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. **78**, 352 [1943]; H. F. Root, J. W. Irvine, R. D. Evans, L. Reiner u. T. M. Carpenter, J. Amer. med. Assoc. **124**, 84 [1944].

<sup>2</sup> J. W. Ferrebee, B. B. Johnson, J. C. Mithoeffer u. J. W. Gardella, Endocrinology **48**, 277 [1951].

\* Die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte diese Arbeit durch eine Sachbeihilfe, wofür wir bestens danken.