5. Methylierung von Aloeemodinrhamnosid.

40 mg Glykosid wurden in 4 ml 10-proz. Natronlauge gelöst und mit 1 ml Dimethylsulfat 30 Min. bei Temperaturen zwischen 30–50° unter ständigem Schütteln zur Reaktion gebracht. Nach Zugabe von weiteren 1 ml Dimethylsulfat wurde erneut 30 Min. geschüttelt. Anschließend hydrolysierten wir 2 Stdn. nach Zugabe von Salzsäure bis zu einer Konzentration von 10% HCl. Der beim Abkühlen entstandene Niederschlag wurde gewaschen, in wenig Methanol gelöst und auf Kieselgelplatten im System Benzol–Methanol 9:1 chromatographiert (s. Abb. 4). Als Testsubstanzen*** standen 1.8-Dimethylaloeemodin (Schmp. 225°, Litera-

tur-Schmp.¹³ 221–223,5°, $R_f = 0,20$), ein Gemisch zweier Monomethylaloeemodine (Schmp. 211–214°, Literatur-Schmp.¹³ 217–218°, $R_f = 0,45–0,55$) und 1.3-Dimethylaloeemodin, Schmp. 160–170°, $R_f = 0,90$) zur Verfügung.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft sehr herzlich für Sachbeihilfen, Herrn Dr. HEROLD, H. Finzelbergs Nachf., Chemische Werke Andernach für die Überlassung der *Socotra-Aloe* und der Firma Karl Thomae GmbH, Biberach, Riß für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen an Aloinosid B.

Über den Einfluß von Dextransulfat auf die oralen Poliomyelitis-Impfstämme nach Sabin

Von HERBERT VOSS

Aus dem Bundesgesundheitsamt, Robert Koch-Institut, Berlin
(Direktor: Vizepräsident Prof. Dr. G. HENNEBERG)

(Z. Naturforsch. 19 b, 226–229 [1964]; eingegangen am 17. Oktober 1963)

Mucopolysaccharidsulfate, zu denen als natürliche Verbindungen des Warmblüterorganismus Heparin und Chondroitinsulfat und als synthetische Substanzen Polyglucosesulfat und Dextransulfat gehören, haben als Polyanionen die Fähigkeit, einige Viren mit geeigneten Ladungseigenschaften ihrer Proteinhülle zu hemmen. Diese Hemmung wird als elektrostatische Bindung des Virus an das Polyanion erklärt, wodurch eine Adsorption an die Wirtszelle verhindert oder eingeschränkt wird. Die vergleichende Prüfung der oralen Impfstoffviren nach Sabin vom Typ I, II und III und des Wildstammes H 24 Typ III in ihrer Reaktion gegenüber dem besonders wirksamen Dextransulfat ergab auffallende Unterschiede. Während der Typ I-Stamm LSc, 2ab stark gehemmt wurde, bestand bei den Impfstämmen Typ II und III und dem Wildstamm Typ III grundsätzlich der gleiche Reaktionstyp, nämlich eine von der Dextransulfat-Konzentration abhängige leichte Plaque-Vergrößerung. Die schwächere Ausbreitungstendenz der Impfviren war lediglich an einer geringeren Ausgangsplaquegröße zu erkennen. Einige Schlußfolgerungen für die Beurteilung von Impfstoffstämmen und die Bedeutung der Befunde für den Ablauf der Poliomyelitis-Infektion im Organismus werden gezogen.

Die Beobachtung von TAKEMOTO und LIEBHABER¹ über das Auftreten von Varianten mit kleinen Plaques beim Encephalomyocarditis-(EMC)-Virus führte zur Auffindung und chemischen Analyse hemmender saurer Mucopolysaccharide (MPS), die im Agar durch das Sterilisierverfahren vermehrt entstehen. Das bei der Hemmung wirksame Prinzip ist die Eigenschaft sulfatierter MPS, als Polyanion eine hohe Dichte der Oberflächenladung zu entwickeln, welche direkt von dem Gehalt an Estersulfat abhängig ist^{2,3}. Andere natürliche MPS-Sulfate wie Heparin und Chondroitinsulfat zeigen ein ähnliches Verhalten, während die sulfatfreie Hyaluronsäure nicht als Polyanion wirkt. Als weiteres natürliches Polyanion wurde Heferibonucleinsäure erkannt³. Syn-

thetische Makromoleküle mit negativen Ladungseigenschaften sind Polyglucosesulfat und Dextransulfat, von denen das letztere wegen seines hohen Schwefelgehaltes besonders wirksam und für Modellversuche gut geeignet ist. LIEBHABER und TAKEMOTO³ halten die Reaktion zwischen Agar-MPS oder Dextransulfat einerseits und einer hemmbaren EMC-Virusvariante andererseits für ein elektrostatisches Phänomen. Sie weisen bei ihren Versuchen über die Adsorption von EMC-Virus an L-Zellen in flüssigem Milieu auf die Abhängigkeit des Effektes von Ionenstärke und p_H -Wert des Mediums hin. Entscheidend ist daneben auch das Mengenverhältnis zwischen Virus und Polyanion. Für das Poliomyelitisvirus Typ I Sabin LSc, 2ab belegen die Ergeb-

¹ K. K. TAKEMOTO u. H. LIEBHABER, *Virology* **14**, 456 [1961].

² H. LIEBHABER u. K. K. TAKEMOTO, *Bacteriol. Proc.* **62**, 139 [1962].

³ H. LIEBHABER u. K. K. TAKEMOTO, *Virology* **20**, 559 [1963].

nisse der „Countercurrent distribution“ von BENGTSSON und PHILIPSON^{4,5} die Bildung eines ganz entsprechenden Komplexes, aus dem das Virus u. a. durch Fällung des Dextransulfats durch 1-m.-KCl-Lösung unverändert wiedergewonnen werden kann. Bei Zugabe eines Polykations wie DEAE-Dextran⁶ scheint die Reaktion mit dem Polyanion Vorrang zu haben, so daß neben dem Polyionenkomplex das Virus wieder in aktiver Form vorliegt. Eigene Erfahrungen⁷ bestätigen, daß bei einem unbehandelten und wie üblich autoklavierten Agar Plaques von Sabin I-Virus bei Zusatz von DEAE-Dextran gegenüber der Kontrolle an Größe zunehmen.

Ein weiterer Anhaltspunkt für den Mechanismus der Wirkung von sulfatiertem MPS auf einen amphoteren Eiweißkörper ergibt sich aus der Faserchemie. Chondroitinsulfat ist nach NÉMETH-CsÓKA⁸ in der Lage, in vitro gelöstes Kollagen in gerichteter Weise so anzulagern, daß stabile Fasern entstehen. Überträgt man diese Vorstellung auf die Reaktion des Virus mit Dextransulfat, dann findet das Kettenmolekül des letzteren geeignete Ladungspartner in der Proteinhülle des Virus und abhängig von der Kettenlänge werden u. U. mehrere Viruspartikel gleichzeitig gebunden. Ein durch Polyanion hemmbares Virus verhält sich unter den speziellen Bedingungen von Ionenstärke, p_H -Wert des Mediums und Mengenrelation zum Polyanion vereinfachend also wie ein Polykation. Für Plaque-Ansätze besagt diese Feststellung, daß ein vor der Übersichtung adsorbiertes Virus zunächst ungestört den ersten Vermehrungszyklus durchmacht. Das danach freigesetzte neugebildete Virus trifft im Agar auf Polyanion, wird durch dieses zum Teil elektrostatisch gebunden und an der weiteren Diffusion gehindert. Nur der Rest der Viruspartikel erreicht neue empfindliche Zellen und vermag diese zu infizieren. Über mehrere Vermehrungszyklen ergibt sich gegenüber der MPS-Sulfat-freien Kontrolle auf diese Weise eine Verringerung des erreichten Plaque-Durchmessers.

TAKEMOTO und LIEBHABER⁹ untersuchten eine Reihe von Viren im Dextransulfatsystem und stellten fest, daß außer EMC- auch ECHO-, Coxsackie A 9-, Influenza B- und Herpes-Viren in ihrer Pla-

que-Entwicklung eindeutig gehemmt werden. Sie zeigten weiter, daß der Poliovirus-Wildstamm Typ I, Mahoney, entgegen den Erwartungen unter Dextransulfat größere Plaques bildete, also gefördert wurde. Die Prüfung weiterer Stämme zeigte eine starke

Abb. 1. Plaque-Durchmesser der Poliomyelitis-Impfviren Typ I, II und III (oral attenuated strains Sabin) in Abhängigkeit von der Konzentration an Dextransulfat im Übersichtungsmedium.

Hemmung für das Sabin-Impfvirus Typ I und den abgeschwächten Typ II-Impfstamm Koprowskis, Wistar II. Schon bei dieser Gelegenheit wurde beobachtet, daß beide Impfstämme bei Plaque-Ansätzen gelegentlich größere Löcher aufweisen, aus denen Polyelektrolyt-resistente Linien zu züchten sind.

In den eigenen Versuchen prüften wir das Verhalten a) der drei oralen Poliomyelitis-Impfstämme von Sabin: Typ I LSc, 2ab, Typ II P 712 Ch 2ab und Typ III S III 12 b, b) eines dieser Stämme, S III 12 b im Vergleich zum Wildstamm H 24 des gleichen Typs gegenüber Dextransulfat. Während der Impfstamm Typ I Sabin aus der Berliner Impfung 1962 zur Verfügung stand, verdanken wir die Stämme Sabin II und III dem Paul Ehrlich-Institut (Prof. Dr. BONIN) und den Wildstamm H 24 dem Wistar-Institut Philadelphia (Dr. WECKER). Als Dextransulfatpräparat benutzten wir das lösliche Natrium-Dextransulfat 2000 der Firma Pharmacia Uppsala mit einem Mol.-Gew. von $2 \cdot 10^6$ und einem Schwefelgehalt von $17 \pm 0,5$ Prozent.

⁴ S. BENGTSSON u. L. PHILIPSON, Separation of polioviruses by countercurrent distribution. IX. Europ. Sympos. Poliomyelitis, Stockholm 1. — 4. Sept. 1963.

⁵ S. BENGTSSON u. L. PHILIPSON, Virology **20**, 176 [1963].

⁶ H. LIEBHABER u. K. K. TAKEMOTO, Virology **14**, 502 [1961].

⁷ H. VOSS, M. MÜNDLER u. G. PLÖTZE, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., I. O. **191/4** [1962], im Druck.

⁸ M. NÉMETH-CsÓKA, Acta histochem. [Jena] **9**, 282 [1960].

⁹ K. K. TAKEMOTO u. H. LIEBHABER, Virology **17**, 499 [1962].

Neben der bei TAKEMOTO und LIEBHABER⁹ als maximal wirksam angegebenen Konzentration von 100 γ Dextransulfat pro ml Übersichtung interessierte uns besonders die Abhängigkeit der Plaquegröße von der Konzentration an Polyanion. Für den Versuchsansatz ist wichtig, daß der Agar u. a. nach AGOL und CHUMAKOVA¹⁰ MPS-Sulfat-frei gemacht werden kann, indem man ihn zweimal jeweils über Nacht bei Zimmertemperatur mit 0,85% NaCl schüttelt, anschließend mit dest. Wasser bis zum Verschwinden der Leitfähigkeit wäscht und bis zum Gebrauch getrocknet aufbewahrt. Tatsächlich sind die Plaques von Sabin I-Virus unter derart gereinigtem Agar gegenüber der Kontrolle deutlich vergrößert. In den Diagrammen 1 und 2 ist der Plaque-Durchmesser unter gewaschenem Agar als Nullwert aufgetragen. Da uns nach erneutem Autoklavieren eine völlige Freiheit an sulfatiertem MPS nicht ohne Prüfung gewährleistet schien, wurde der Anfangsteil der Kurven gestrichelt wiedergegeben. Die verwendeten Dextransulfat-Konzentrationen sind aus den Diagrammen zu ersehen. Für die einzelnen Punkte wurden im Durchschnitt 60 gut meßbare Plaques ausgewertet. Die Kurvenpunkte für 200 γ Dextransulfat in Abb. 1 wurden der Übersichtlichkeit halber verkürzt wiedergegeben. Sie sind für die Motivierung des Kurvenverlaufs dennoch wichtig. Der Gesamtansatz umfaßte für Versuch 1 84 Einschichtkulturen von Rhesusaffennieren in Vierkantflaschen, für Versuch 2 48 Flaschen. Der Overlay enthielt folgende Endkonzentrationen: 1,5% Agar, modifizierte Earlesche Lösung mit 0,22% Bicarbonat und einem p_H -Wert von 7,6–7,8 sowie die Chemikalien des synthetischen Medium 752/1 nach Ch. W a y m o u t h. Ein Zusatz von 2% Kälberserum in Experiment 1 wurde im Rahmen einer Standardisierung der Plaque-Bedingungen in Ansatz 2 weggelassen, da sich herausstellte, daß der natürliche MPS-Gehalt dieses Serums bei Dextransulfat-Konzentrationen bis etwa 15 γ /ml den Kurvenverlauf verfälschte. Die Ergebnisse waren dann in mehreren Prüfungen gut reproduzierbar, trotzdem als Störfaktor eine gewisse Unregelmäßigkeit der Plaque-Größe, verursacht durch unebene Flaschenböden, blieb.

Die Kurvenverläufe möchten wir nun in folgender Weise deuten:

1. In Übereinstimmung mit TAKEMOTO und LIEBHABER⁹ finden wir unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine deutliche Hemmung des Impfvirus Sabin I, welche aber einen Nullpunkt nicht erreicht, sondern bei einem Plaque-Durchmesser von etwa 1 mm endet. Diese Feststellung muß ergänzt werden durch Befunde aus einem Vergleich der Dextransulfatwirkung mit dem d-Marker^{10, 3, 7} und aus der von LIEBHABER und TAKEMOTO³ für das EMC-Virus nachgewiesenen p_H -Abhängigkeit, die wir im wesentlichen für das Sabin I-Virus bestätigen können. Danach verringert sich die Polyanionwirkung auf hemmbares Virus in der Nähe des Neutralpunktes, um im sauren Bereich eindeutig stärker zu werden als z. B. für den bei unseren Kurven vorliegenden p_H -Wert 7,6–7,8.

2. Die Sabin-Stämme Typ II und III werden nicht gehemmt, sondern folgen dem von TAKEMOTO und LIEBHABER⁹ als „enhanced type“ bezeichneten Verhalten, wie es auch nach eigenen Erfahrungen⁷ als typisch für den Wildstamm Mahoney gefunden und in Abb. 2 für den Typ III-Wildstamm H 24 belegt wird. Impfstamm und Wildstamm unterscheiden sich hier nicht in ihrer Reaktion gegenüber Dextransulfat. Die geringere Ausbreitungstendenz des abgeschwächten Typ III-Virus ist allein durch den geringeren Ausgangs-Plaquesdurchmesser charakterisiert. Die Berücksichtigung dieser Befunde hat bedeutsame Konsequenzen insofern, als einmal der bisher noch in den internationalen Prüfungsbestimmungen für Poliomyelitis-Impfstoffe verwendete d-Marker auf einer anderen Grundlage beruht als ursprünglich angenommen wurde, und besser durch den quantita-

Abb. 2. Plaque-Durchmesser der Poliomyelitis-Stämme Typ III: oral attenuated strain Sabin 12 b und Wildstamm H 24 in Abhängigkeit von der Konzentration an Dextransulfat im Übersichtungsmedium.

¹⁰ V. I. AGOL u. M. CHUMAKOVA, Virology **17**, 221 [1962].

tiv exakt einstellbaren Dextransulfattest ersetzt würde, zum andern daß sowohl der d- wie der Elutionsmarker entgegen der bisherigen Ansicht für Stämme vom Typ der Sabin-Viren II und III unbrauchbar sind und keine echte Differenzierung gegenüber Wildstämmen ermöglichen.

3. Dextransulfat-resistente Rückmutanten des Sabin-Impfvirus Typ I traten auch im vorliegenden Experiment auf. Unter 100 γ Polyanion sahen wir u. a. ein einzelnes Loch mit 7 mm Durchmesser, während die übrigen Plaques höchstens 2,5 mm erreichten.

4. Die Tatsache der nachgewiesenen gleichartigen Wirkung von Heparin läßt vermuten, daß dieses und möglicherweise auch die Chondroitinschwefelsäuren im Organismus einen ganz entsprechenden Einfluß auf die Hemmung oder Ausbreitung von Viren haben könnten. Daran sind zwei Mechanismen beteiligt. Einmal bedingt die Hyaluronidase als bekannter „spreading“-Faktor durch Herabminderung der Viskosität der Hyaluronsäure eine Erhöhung der Diffusion bzw. Permeabilität, wie sie z. B. durch BEDNARA¹¹ für das Lyssa-Virus angegeben wird, welches zusammen mit Hyaluronidase als Virus fixe subcutan verimpft eine stärkere Ausbreitung im ZNS mit dem Wiederauftreten von Negri-Körperchen zeigt. Zum andern sind nach FREEDMAN¹², MALINSKY, SKLENOVSKY und PALKA¹³ sowie YOUNG und ABOOD¹⁴ saure Mucopolysaccharide im ZNS nachge-

wiesen und besonders bei Einsetzen entzündlicher Prozesse deutlich vermehrt, so daß sie dem eindringenden Virus eine Schranke setzen können. Hier könnte die Bedeutung der „enhanced type“-Reaktion der Wildviren liegen, wie sie auf Grund der vorgelegten Befunde in gemilderter Form noch bei den Sabin-Viren Typ II und III erkennbar scheint.

5. Die sich in den Kurvenverläufen abzeichnende überraschende Wirksamkeit sehr geringer Konzentrationen an sulfatiertem MPS, welche zudem noch in relativ weiten Grenzen durch geringe p_H -Änderungen beeinflussbar scheint, spricht nach unserer Ansicht doch sehr für die biologische Bedeutung der Polyelektrolyte im Infektionsgeschehen. Dabei ist das Sabin I-Virus durch die besondere Hemmbarkeit ausgezeichnet, die für die Typen II und III nicht zutrifft. Hier scheint im Gegenteil eine geringgradige Förderung der Plaque-Entwicklung möglich zu sein, die mit unseren Erfahrungen im d-Marker⁷ übereinstimmt, wo wir für den Wildstamm Mahoney gegenüber einer DEAE-Dextran-Kontrolle unter 100 γ Dextransulfat Plaque-Vergrößerungen um nahezu 50% fanden. Die Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint für die Entwicklung sicherer Stämme für Lebendimpfstoffe von Wert zu sein. Weitere Ausführungen zu den angeschnittenen Fragenkomplexen sollen in der Mitteilungsreihe: „Virus und Polyelektrolyt“ im Zentralblatt für Bakteriologie erscheinen.

¹¹ M. BENARA, Hyg. Z. Infektionskrankh. **138**, 467 [1954].

¹² B. FREEDMAN, Anatom. Rec. **115**, 265 [1953], Ref. C **1953**, 6507.

¹³ J. MALINSKY, A. SKLENOVSKY u. J. PALKA, Acta histochem. [Jena] **8**, 301 [1959].

¹⁴ I. J. YOUNG u. L. G. ABOOD, J. Neurochem. **6**, 89 [1960].