

## Neuere Ergebnisse der Immunchemie

Von Doz. Dr. OTTO WESTPHAL

Allgemeines Chemisches Universitäts-Labor., Biochem. Abteilung, Göttingen.

### I. Antigene.

Der nachstehende Bericht soll nicht eine vollständige Aufstellung der Literatur über die Ergebnisse der Immunchemie geben, vielmehr wird versucht, die wesentlichen Gesichtspunkte herauszustellen, welche sich durch die immunchemischen Untersuchungen in den letzten Jahren ergeben haben. Zusammenfassende Darstellungen s. 1-5).

Immunität im physiologischen Sinne ist verbunden mit zwei stofflichen Begriffen: den Antigenen und den Antikörpern. Antigene verursachen im tierischen Organismus nach parenteralem Eindringen — sei es im natürlichen Geschehen oder künstlich durch Injektion — die Bildung besonderer Stoffe, welche im Blut und in den Körperzellen auftreten und die man Antikörper nennt<sup>6)</sup>. Antigene wirken immunitätsauslösend, während die Antikörper Immunität verleihen und damit die eigentlichen Träger des Immunitätszustandes sind. Zu den Antigenen rechnet man nicht nur gewisse Bestandteile oder Ausscheidungen pathogener Erreger, sondern die Auslösung der Antikörperbildung kann ganz allgemein durch zahlreiche, auch an sich ungiftige, zellgebundene oder gelöste Stoffe erfolgen, und führt zur Immunität gegen diese. Zum Wesen der Immunität gehört es, daß die Antikörper spezifische Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Antigen besitzen. Die wichtigste Phase dieser Antigen-Antikörper-Reaktion ist die spezifische Bindung beider Reaktionspartner aneinander. Dieser Vorgang leitet i. allg. die Entfernung des Antigens aus dem Saftstrom ein. In diesem Sinne besitzen die Antikörper ihre große Bedeutung im Rahmen der Abwehrmechanismen des Tierkörpers gegen parenteral eindringende Fremdstoffe.

Antigene und Antikörper sind somit Relativbegriffe. Die antigene Eigenschaft einer Substanz ist durch ihre Antikörper-auslösende Fähigkeit definiert, und andererseits wird die Existenz eines Antikörpers durch dessen spezifische Reaktion mit dem Antigen erwiesen. Der Nachweis antigenen Stoffes kann nur durch das Tierexperiment erfolgen. Dagegen können Antikörper sowohl in vivo (Schutzteste, Neutralisation von Toxinen usw.) als auch in vitro erkannt werden. Einige typische Antigen-Antikörper-Reaktionen lassen sich in einfacher Weise im Reagensglas sichtbar machen.

Zum Nachweis von Antikörpern verwendet man für gewöhnlich das Serum des immunisierten Tiers (Antiserum). Gibt man hierzu verdünnte Lösungen des Antigens, so beobachtet man zu meist nach kurzer Zeit das Auftreten einer feinflockigen Fällung (Präzipitation). Das Reaktionsprodukt ist das Präzipitat, eine schwerlösliche Verbindung von Antigen und Antikörper. Liegt das Antigen zellgebunden vor (bakterielle Antigene u. a.), so tritt auf Zugabe des Antiserums Präzipitation an der Zelloberfläche ein, die Zellen werden verklumpt (Agglutination). Andererseits kann die Reaktion des Antikörpers mit zellgebundenem Antigen auch die Auflösung der Zelle zur Folge haben (Lyse; Bakteriolyse, Hämolyse, Cytolyse).

Zu den oft angewendeten Immunitätsreaktionen am lebenden Objekt gehört die Auslösung des anaphylaktischen Schocks beim Meerschweinchen. Durch die Erstinjektion eines Antigens wird der Organismus „sensibilisiert“. Die Zweitinjektion des gleichen Antigens nach bestimmter Zeit führt zu den charakteristischen Symptomen des anaphylaktischen Schocks. Es handelt sich um die Reaktion des Antigens mit zellgebundenem Antikörper, die man auch an der Kontraktion isolierter Organe, wie Darm und Uterus, demonstrieren kann (Schultz, Dale).

Charakteristisch für alle Immunitätsreaktionen ist die Spezifität, mit der Antigene und die durch sie hervor-

gerufenen Antikörper aufeinander eingestellt sind. Diese hohe Spezifität ist für den Immunchemiker Ausgangspunkt seiner Untersuchungen gewesen. Alle derartigen Spezifitätsbetrachtungen gingen zunächst von den Antigenen aus. Denn sie sind es, die im Experiment beliebig gewählt und abgewandelt werden können, während man die durch ihre Injektion ausgelösten Antikörper so hinnehmen muß, wie der Organismus sie bildet.

### 1. Die Struktur der Antigene.

Antigene sind hochmolekulare Stoffe. Seit langem weiß man, daß nahezu alle Eiweißkörper des Tier- und Pflanzenreiches antigene Eigenschaften besitzen, insbes. da sie bei den serologischen Reaktionen als die Träger der chemischen Artverwandtschaft bzw. Artfremdheit erschienen. Es entstand daher frühzeitig die Frage, ob die antigene Spezifität von der großen Antigenmolekel als Ganzem ausgeht oder ob hierfür besondere Bezirke verantwortlich gemacht werden könnten. Es hat sich gezeigt, daß die Spezifität von ganz bestimmten, niedermolekularen Wirkgruppen in der großen Molekel ausgeht. Dies konnte mit Hilfe künstlicher Antigene bewiesen werden. Wenn man in natürliche Eiweißantigene mit chemischen Mitteln bestimmte Gruppen einführt, so kann hierdurch das antigene Verhalten des Proteins vollständig verändert werden. Mit dem chemisch abgewandelten Antigen erhält man neue und andere Antikörper, die nun spezifisch auf die eingeführten Gruppen abgestimmt sind; zu den Antigeneigenschaften des ursprünglichen Antigens treten neue hinzu, die jene u. U. vollständig überdecken können, obwohl die chemische Veränderung nur einen sehr kleinen Teil der Molekel ausmacht.

Von K. Landsteiner<sup>7,8)</sup> stammt die klassische Methode, derartige künstliche Antigene aufzubauen. Sie beruht auf der Fähigkeit diazotierter aromatischer Amino-Verbindungen, in schwach alkalischer Lösung mit Proteinen zu kuppeln, wobei sog. Azoproteine,  $R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{Protein}$ , entstehen. Die Methode ermöglicht es, praktisch beliebige Radikale R über die Phenylazo-Gruppe an Proteine zu binden. Voraussetzung ist lediglich, daß in dem verwendeten Eiweiß kupplungsfähige Stellen vorhanden sind (Tyrosin, Histidin usw.<sup>9)</sup>). Experimentell hat man es in der Hand, die Zahl der eingeführten Radikale R je Eiweißmolekel beliebig zu variieren<sup>14)</sup>.

Im Anschluß an Landsteiner ist noch eine Reihe weiterer Verfahren entwickelt worden, welche die Einführung chemisch wohldefinierter Radikale in Proteine ermöglichen. So beruht die Methode von S. J. Hopkins u. A. Wormall<sup>10)</sup> auf der Reaktionsfähigkeit von Isocyanaten mit freien Amino- oder Hydroxyl-Gruppen der Proteine. Harington u. Mitarb.<sup>11)</sup> haben die Curtiusche Azid-Methode erfolgreich zur Darstellung künstlicher Antigene ausgenutzt. Lettré<sup>12)</sup> verwendete hierfür geeignet substituierte Oxazolone, welche unter Ringöffnung mit  $\text{NH}_2$ - (OH-, SH-) Gruppen der Proteine reagieren. Diese und die Isocyanat-Methode erwiesen sich zur Einführung vielkerniger aromatischer Ringsysteme in Proteine geeignet<sup>13)</sup>. Die Verwendung von Säurechloriden, Ketenen u. a. hat gegenüber den genannten Verfahren nur wenig Bedeutung erlangt.

Die serologische Prüfung solcher substituierten Proteine ergab, daß die Gruppe R für den antigenen Charakter eines

<sup>1)</sup> H. Rudy, diese Ztschr. 50, 137 [1937].

<sup>2)</sup> M. Heidelberger, Annu. Rev. Biochem. 1, 655 [1932]; 2, 503 [1933]; 4, 569 [1935]; K. Landsteiner u. M. W. Chase, ebenda 6, 621 [1937]; 8, 579 [1939]; J. R. Marrack, ebenda 11, 629 [1942].

<sup>3)</sup> F. Haurowitz, Med. Klin. 26, 873 [1938].

<sup>4)</sup> J. R. Marrack: The chemistry of antigens and antibodies, London 1938 (große Übersicht).

<sup>5)</sup> O. Westphal, in Weidenhagen-Nord: Handb. d. Enzymologie, Leipzig 1940, Bd. II, 1138 ff.

<sup>6)</sup> H. G. Wells: Die chemischen Anschauungen über Immunitätsvorgänge, II. Aufl., Jena 1924; A. Klopstock, Immunität, aus Med. Kolloidlehre von Lichtwitz, Liesegang u. Spiro, Dresden 1933, 139 ff.

<sup>7)</sup> K. Landsteiner u. H. Lampl, Biochem. Z. 86, 343 [1918]; 93, 106 [1919].

<sup>8)</sup> K. Landsteiner: Die Spezifität der serologischen Reaktionen. I. Aufl. Springer-Verlag, Berlin 1933; II. Aufl. (amerikanisch), Springfield, Ill., 1936.

<sup>9)</sup> H. Pauli, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 42, 512 [1904]; 44, 159 [1905]; H. Eagle u. P. Vickers, J. biol. Chemistry 114, 193 [1936].







<sup>10)</sup> Biochemic. J. 27, 740, 1704 [1933].

<sup>11)</sup> R. F. Clutton, C. R. Harington u. T. H. Mead, ebenda 31, 764 [1937]; R. F. Clutton, C. R. Harington u. M. E. Yuill, ebenda 32, 1111 [1938].


<sup>12)</sup> H. Lettré u. R. Haas, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 268, 31 [1940]; H. Lettré u. M. E. Fernholz, ebenda 268, 37 [1940].

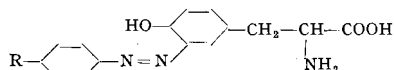
<sup>13)</sup> H. Lettré, K. Buchholz u. M. E. Fernholz, ebenda 267, 108 [1940]; H. J. Creech u. R. N. Jones, J. Amer. chem. Soc. 63, 1661, 1670 [1941].



<sup>14)</sup> F. Haurowitz u. F. Breint, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 205, 259 [1932], haben festgestellt, wie viele Reste R mindestens in eine Eiweißmolekel eingeführt werden müssen, um eine bezüglich R spezifische antigene Wirkung zu erzielen.

Proteins von entscheidendem Einfluß sein kann<sup>7,8)</sup>, dem gegenüber das Protein von untergeordneter Bedeutung wird. Der Beweis dieses spezifitätsbestimmenden Einflusses wurde von *Landsteiner* durch die folgende Beobachtung erbracht: In dem Azoantigen Protein—N=N——R kann das Protein durch beliebige andere Eiweißkörper ersetzt werden; die mit den verschiedenen Antigenen gewonnenen Antiseren reagieren mit allen Eiweißantigenen, welche die Gruppe —N=N——R enthalten. Immunisiert man also mit Protein I—N=N——R, so reagiert das homologe Antiserum nicht nur mit Protein I—N=N——R, sondern auch mit Protein II—N=N——R und umgekehrt. Auf diese Weise kann der alleinige Einfluß der Gruppe —N=N——R demonstriert werden<sup>14)</sup>, d. h. praktisch die serologische Spezifität des Restes —R. Man bezeichnet diese Erscheinung als serologische **Kreuzreaktion**.

In umfassenden Untersuchungen (*Landsteiner, Avery, Goebel, Haurowitz* u. a.) wurde der spezifitätsbestimmende Einfluß verschiedenster Radikale —R ermittelt. Danach verursachen alle Radikale mit lyophilen Gruppen, wie —OH, —NH<sub>2</sub> usw., besonders mit stark polaren Gruppen, wie —COOH, —SO<sub>3</sub>H, —PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, markante Spezifität. Lyophobe Gruppen scheinen von weit geringerem Einfluß. (Einzelheiten s. <sup>1,4,8)</sup>.) Die Spezifität natürlicher Antigene dürfte danach vor allem durch Carboxyl- und Hydroxyl-tragende Gruppen bestimmt sein.

Man kann bei (künstlichen) Antigenen zeigen, daß R die eigentliche mit dem Antikörper reagierende Gruppe ist. Kuppelt man nämlich das Diazoniumsalz R——N<sup>+</sup>≡NX<sup>-</sup> nicht an Eiweiß, sondern an einen niedermolekularen Eiweißbaustein, z. B. Tyrosin, so erhält man die Tyrosylazo-Verbindung



Eine derartige niedermolekulare Verbindung ist nicht mehr antigen im Sinne der Stimulierung von Antikörpern. Wohl aber reagiert diese Azo-Verbindung noch mit dem durch das Antigen Protein—N=N——R erzeugten Antiserum. Denn das Serum verliert nach Zusatz der Tyrosyl-Verbindung seine serologische Reaktionsfähigkeit gegenüber allen Antigenen Protein X—N=N——R, weil die entsprechenden Antikörper bereits mit der Tyrosyl-Verbindung reagiert haben. Daher findet mit dem ursprünglichen Antigen keine Präzipitation mehr statt. Diese **Präzipitationshemmung** ist eine spezifische Immunreaktion, typisch für Abbauprodukte der großen Antigenmolekeln. Von Interesse ist, daß die Tyrosyl-Verbindung das Eintreten des anaphylaktischen Schocks durch das entsprechende Azoprotein ebenfalls spezifisch hemmen kann.

Daß hierbei spezifische Bindung an den Antikörper stattfindet, konnten *J. R. Marrack* u. *F. C. Smith* dadurch nachweisen<sup>16)</sup>, daß die einfache Azo-Verbindung aus dem entsprechenden Antiserum nicht hinausdialysiert. Befindet sich ein intensiv gefärbter R-Phenylazo-Körper außerhalb der Dialysiermembran, so kann man zeigen, daß der Farbstoff, dem Konzentrationsgefälle scheinbar entgegen, vollständig in das Antiserum einwandert.

Der Rest R ist, obwohl spezifitätsbestimmend, für sich allein serologisch nicht mehr reaktionsfähig.

Baut man natürliche Antigene stufenweise ab, so schwindet ebenfalls bald die antikörper-auslösende Fähigkeit. Mit relativ großen Bruchstücken beobachtet man jedoch noch Präzipitation, mit relativ kleinen Abbauprodukten noch Präzipitationshemmung. Abbauprodukte von bakteriellen Antigenen ergeben entsprechend spezifische Hemmung der bakteriellen Agglutination. Derartige Hemmungsteste haben für die chemische Strukturaufklärung von Bakterien-Antigenen besondere Bedeutung.

Man kommt so zu einer Einteilung antigener Wirkstoffe, die auf *K. Landsteiner*<sup>16)</sup>, *H. Sachs*<sup>17)</sup> und *J. R. Marrack*<sup>18)</sup> zurückgeht.

## Einteilung antigener Wirkstoffe.

- |  |   |
|--|---|
| 1. Vollantigen                             | Die Injektion löst die Bildung von Antikörpern aus (Antiserum) und verleiht dadurch Immunität.            |
| 2. Halb-Antigen oder Hapten <sup>16)</sup> | Reagiert spezifisch mit Antiserum: Präzipitation usw. Injektion führt jedoch nicht zur Antikörperbildung. |
| 3. Halb-Hapten <sup>17)</sup>              | Wird vom Antikörper gebunden ohne sichtbare Reaktion. Nachweis durch Hemmungsteste.                       |
| 4. Determinante Gruppe <sup>18)</sup>      | Für sich allein serologisch unwirksam, erteilt Proteinen antigene Spezifität.                             |

Demnach sind die Antigene grundsätzlich aus zwei Teilen mit verschiedener Funktion aufgebaut: der für die Immunisierung notwendigen, an sich unspezifischen, *hochmolekularen* (Protein-) *Komponente*<sup>19)</sup> und der spezifitätsbestimmenden *determinanten Gruppe*. Wenn auch der Übergang vom Hapten zum Halbhapten und von diesem zur determinanten Gruppe kein scharfer ist, so haben sich diese Begriffe doch bei immun-chemischen Arbeiten bewährt.

In ähnlicher Weise müssen wir uns auch die **natürlichen Antigene** aufgebaut denken: wir haben eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene determinante Gruppen in Verbindung mit einer großen Trägermolekel. Für den Immunchemiker gilt es, diese Gruppen herauszuarbeiten, aufzuklären und mit Hilfe chemischer Mittel ihre Kupplung an Proteine durchzuführen, um gegebenenfalls künstliche Antigene zu erhalten, welche dem natürlichen Vorbild immunologisch gleichwertig sind.

Auf die an anderer Stelle<sup>20)</sup> betonte formale Analogie mit der Struktur der Fermente sei hier nur hingewiesen. Es scheint, daß spezifische biologische Wirkungen hochmolekularer Stoffe (von Fermenten, Toxinen, Antigenen, Genen u. a.) letzten Endes immer auf das Prinzip des Trägers und der prosthetischen Gruppe — nur mit wechselnder Schärfe — zurückgeführt werden können<sup>21)</sup>.

In Toxinen liegen oft die für die spezifisch toxische Wirkung verantwortlichen Strukturen von den determinanten Gruppen getrennt. Es gelingt daher vielfach, durch chemische Abwandlung (Einwirkung von Formaldehyd, Keten u. a.) Toxine in die ungiftigen Toxine überzuführen, jedoch unter Erhaltung der spezifischen antigenen Wirksamkeit. Die gegen das Toxin gerichteten Antikörper reagieren auch mit dem Toxin. In der Praxis wird von dieser Möglichkeit umfangreich Gebrauch gemacht.

Für die Strukturaufklärung natürlicher Antigene ist es von Bedeutung, daß man über die **Wirkungsspezifität** der determinanten Gruppe (R) einerseits, ihre räumlichen Ausmaße andererseits, durch Versuche mit künstlichen Antigenen weitgehend Klarheit besitzt. Bekanntlich gelingt es, stereoisomere Verbindungen serologisch scharf zu unterscheiden. Dies wurde erstmals an d-, l- und meso-Weinsäure-Antigenen in Form der an Protein gekuppelten Aminotartronsäuren gezeigt<sup>22)</sup>. Der Nachweis der serologischen Spezifität optischer Isomere führte zu der Untersuchung von Kohlenhydraten, besonders da Polysaccharid-Antigene als Träger der spezifischen serologischen Reaktionen vieler Mikroorganismen erkannt worden waren<sup>23)</sup>.

Es wurden die p-Amino-phenolglykoside von einfachen Hexosen<sup>24)</sup>, von α- und β-Glucose<sup>25)</sup>, von N-Acetyl-glucosamin<sup>26)</sup> verschiedenen Disacchariden<sup>27)</sup> und schließlich die p-Amino-benzylglykoside von d-Glucuron- und d-Galakturonsäure<sup>28)</sup> hergestellt. Nach der Diazotierung wurde mit Eiweiß gekuppelt und die Immunsera vom Kaninchen gewonnen.

Die serologische Prüfung ergab, daß einzelne Aldohexosen, z. B. Glucose und Galaktose, scharf unterscheidbare Antiseren liefern. Die Aminophenolglykoside wirken als Halbhaptene spezifisch präzipitationshemmend nur bei dem homologen Antiserum. Mit den Zucker-Azoproteinen kann man beim Meerschweinchen spezifischen anaphylaktischen Schock aus-

<sup>16)</sup> Brit. J. exp. Pathol. **13**, 394 [1932]; *F. Haurowitz* u. *F. Breinl*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **214**, 111 [1933].

<sup>17)</sup> Biochem. Z. **119**, 294 [1921]; J. exp. Medicine **33**, 127 [1923].

<sup>18)</sup> *H. Sachs* u. *G. Bock*, Arb. Staatsinst. exp. Therap. Georg Speyer-Haus Frankfurt a. M. **1928**, H. 21, 159.

<sup>19)</sup> l. c. Note 4.

<sup>20)</sup> Über Versuche zum Ersatz des Proteins durch andere kolloide Träger s. <sup>20)</sup>.

<sup>21)</sup> *J. R. Marrack*, Ergebn. Enzymforsch. **7**, 281 [1937]; *H. Rudy*, S.-B. phys.-med. Soc. Erlangen **67**, 395 [1936]; *O. Westphal*, l. c. Note 5.

<sup>22)</sup> Vgl. *J. H. Northrop*, J. gen. Physiol. **13**, 739, 767 [1930]; **14**, 713 [1931]; **16**, 267, 615 [1932]; **17**, 165 [1933]; *K. Myrbäck*, Svensk farmac. Tidskr. **41**, 241, 253, 309, 369 [1937]; *H. Albers*, diese Ztschr. **49**, 448 [1936].

<sup>23)</sup> *K. Landsteiner* u. *J. v. d. Scheer*, J. exp. Medicine **48**, 315 [1928]; **50**, 407 [1929].

<sup>24)</sup> Zusammenfassung bis 1935: *R. Mikulaszek*, Weichards Erg. Hyg. Bakt. Immunf. exp. Therap. **17**, 415 [1935].

<sup>25)</sup> *W. F. Goebel* u. *O. T. Avery*, J. exp. Medicine **50**, 521, 533 [1929].

<sup>26)</sup> *W. F. Goebel*, O. T. Avery u. *H. Babers*, ebenda **55**, 761, 769 [1932].

<sup>27)</sup> *O. Westphal* u. *E. Warnebold*, a. a. O. im Druck.

<sup>28)</sup> *W. F. Goebel*, O. T. Avery u. *H. Babers*, J. exp. Medicine **60**, 599 [1934].

<sup>29)</sup> *W. F. Goebel*, ebenda **64**, 29 [1936]; *W. F. Goebel* u. *R. D. Hotchkiss*, ebenda **66**, 191 [1937].

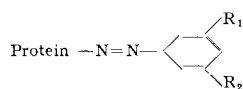
lösen, welcher (nur) durch das homologe Halbhapten gehemmt wird<sup>29</sup>).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucose sind unterscheidbar<sup>25,27</sup>). Für den Spezifitätscharakter von Disacchariden ist die endständige Hexose-Molekel ausschlaggebend, doch wirkt die gesamte Molekel determinant. Inwieweit dritte oder vierte Hexose-Einheiten von Einfluß sind, wurde bisher nicht untersucht. Die Oxydation am C-Atom 6 einer Hexose zum Carboxyl (Uronsäure) führt zu einer markanten Spezifitätsänderung. So ist d-Glucuronsäure gegenüber d-Glucose serologisch vollkommen verschieden.

Im Hinblick auf die Antigenität von Eiweißkörpern wurden Peptid-Azoproteine untersucht. Die Kupplung erfolgte i. allg. über die p-Amino-benzoyl-Verbindungen der Aminosäuren  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$  bzw. der Peptide. Bei der Untersuchung der 4 möglichen Dipeptid-Kombinationen aus Glycin und Leucin<sup>30</sup>) zeigte sich, daß die Spezifität hauptsächlich durch die endständige Aminosäure bestimmt ist. Hochspezifisch sind die serologischen Hemmungsreaktionen mit den p-Nitro-benzoyl-Verbindungen der Peptide als Halbhaptene, mit deren Hilfe sämtliche 4 Dipeptide scharf unterschieden werden können. Die Prüfungen wurden dann auf zahlreiche Tri- und Tetrapeptide mit analogen Ergebnissen ausgedehnt<sup>31</sup>). Schließlich wurde der determinierende Einfluß längerer Peptid-Ketten an den folgenden Pentapeptiden untersucht: Tetraglycyl-glycin, Tetraglycyl-leucin, Diglycyl-leucyl-glycyl-glycin und Trileucyl-glycyl-glycin<sup>32</sup>). Die Kupplung an Proteine erfolgte in üblicher Weise. Die Antisera enthielten verschiedene Fraktionen von Antikörpern, darunter solche, die spezifisch auf das Pentapeptid als Ganzes eingestellt waren<sup>33,34</sup>). Demnach lassen sich feine Strukturunterschiede in längeren Peptid-Ketten serologisch nachweisen, doch schwindet der determinierende Einfluß mit der Entfernung vom freien Carboxyl.

Landsteiner<sup>35</sup>) hat gezeigt, daß die serologische Spezifität bei Eiweißkörpern vom Typ der Faser-Proteine auf Peptid-Bausteine von 6—12 Aminosäuren zurückgeführt werden kann. Durch besondere Vorbehandlung stellte er kolloidale, wäßrige Lösungen des Seidenfibroins her. Die Injektion solcher Lösungen ergab bei Kaninchen spezifisch präzipitierende Antisera. Das verhältnismäßig einfach aufgebaute Seidenfibroin<sup>36</sup>) ist demnach ein Antigen. Es wurde dann untersucht, welche Abbauprodukte des Seidenfibroins seine Präzipitation mit dem Antiserum hemmen. Zu diesem Zwecke fraktionierte Landsteiner Hydrolysenansätze großer Mengen Seidenfibroins und isolierte ein (jeweils nahezu einheitliches) kristallines Hexa-, Okta- und Dodekapeptid. Es zeigte sich, daß Hexa- und Oktapeptid bereits deutliche, spezifische Präzipitationshemmung verursachten. Diese war am stärksten mit dem Dodekapeptid, welches genau analysiert wurde. Es war aufgebaut aus 6 Glycin-, 3 Alanin-, 2 Serin-Einheiten und 1 Tyrosin-Einheit. Da diese Zusammensetzung derjenigen des Seidenfibroins<sup>36</sup>) sehr nahe kommt, dürfte die serologische Spezifität dieses Proteins durch derartige periodisch wiederkehrende Dodekapeptide, oder noch kleinere Peptid-Bausteine vollständig gegeben sein.

Bei den Sphäroproteinen mit stark geknäuelten Peptid-Ketten sind die Spezifitätsverhältnisse indessen sicher wesentlich komplizierter (vgl. <sup>37</sup>).

Es muß angenommen werden, daß in der Mehrzahl der (natürlichen) Antigene nicht nur eine und dieselbe, sondern mehrere, strukturell verschiedene determinante Gruppen wirksam sind. Es war daher von Interesse, künstliche Antigene mit 2 determinanten Gruppen serologisch zu prüfen. Hierzu wurden Azoproteine der folgenden Struktur aufgebaut<sup>37</sup>):



<sup>29</sup>) W. S. Tillett, W. F. Goebel u. O. T. Avery, ebenda **50**, 551 [1929].

<sup>30</sup>) K. Landsteiner u. J. v. d. Scheer, ebenda **55**, 781 [1932]; vgl. auch E. Berger, Biochem. Z. **143**, 267 [1933].

<sup>31</sup>) K. Landsteiner u. J. v. d. Scheer, J. exp. Medicine **59**, 769 [1934].

<sup>32</sup>) Dieselben, ebenda **69**, 705 [1939].

<sup>33</sup>) "...the antibodies appeared to be specific for an entire penta-peptide even though the sera contained qualitatively different fractions", l. c. Note 31.

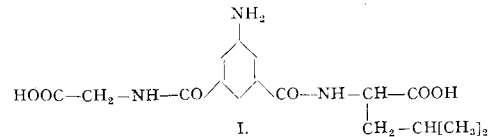
<sup>34</sup>) Eine vollkommene Veränderung der Spezifität wird erzielt, wenn man die freie Carboxyl-Gruppe durch die Säureamid-Gruppe ersetzt, l. c. Note 32.

<sup>35</sup>) J. exp. Medicine **75**, 269 [1942].

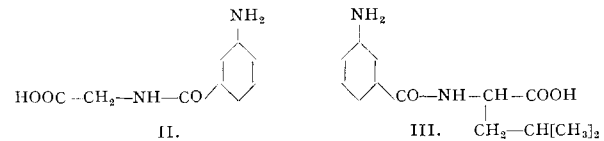
<sup>36</sup>) M. Bergmann u. Mitarb., J. biol. Chemistry **122**, 577 [1938]; **139**, 481 [1941].

<sup>37</sup>) K. Landsteiner u. J. v. d. Scheer, J. exp. Medicine **67**, 709 [1938]; vgl. a. K. Landsteiner u. M. W. Chase, ebenda **66**, 339 [1937].

Zur Gewinnung eines solchen Antigens diene z. B. das sym. Amino-isophthalyl-glycin-leucin (I)



Das hiermit gewonnene Antiserum wurde mit den „Teilantigenen“ aus II und III geprüft



Es zeigte sich, daß das Anti-I-Serum zwei verschiedene Antikörperfraktionen enthielt, die durch Absorption mit den Teilantigenen aus II und III quantitativ voneinander getrennt werden konnten. Ein Teil der Antikörper war spezifisch auf II, ein anderer auf III eingestellt. Anti-I-Serum, welches erschöpfend mit II und III absorbiert wurde, enthielt keine Antikörper gegen I mehr. Jede determinante Gruppe wirkt demnach für sich allein antikörper-auslösend.

Die Tatsache, daß man nach dieser Absorptionsmethode Antisera fraktionieren kann, indem man mit Teilantigenen oder -haptene gewisse Antikörperfraktionen wegbindet, ist von großem theoretischen und praktischen Interesse. Für solche Absorptionen verwendet man am besten Teilantigene, welche an gröbere, zentrifugierbare Partikeln gebunden sind<sup>38</sup>).

Bei den genannten Versuchen war in manchen Fällen eine der beiden Gruppen „dominant“, z. B. die Bernsteinsäure-Gruppe ( $\text{R}_1$ ) gegenüber  $-\text{COOH}$  oder  $-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$  ( $\text{R}_2$ ), indem Antikörper nur gegen diese eine ( $\text{R}_1$ ) gefunden wurden. Bis zu einem gewissen Grade kann demnach eine (vermutlich räumlich bedingte) Beeinflussung determinanter Gruppen durch andere stattfinden.

Bei der Einführung niedermolekularer Gruppen in antigene Proteine ist die Spezifitätsänderung nicht immer durch die eingeführten Reste allein gegeben. Heidelberger u. s. Mitarb.<sup>39</sup>) kuppelten R-Salz-azo-biphenyl-diazoniumchlorid an kristallisiertes Eialbumin. Das Farbstoff-Protein wurde derart aufgearbeitet, daß eine bestimmte Fraktion nicht mehr mit Eialbumin-Antiserum reagierte. Das mit diesem Farbstoff-Protein-Antigen erzeugte Antiserum zeigte gegenüber steigenden Mengen des Farbstoff-Proteins das typische Bild homologer Antigen-Antikörper-Reaktionen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß einfache R-Salz-azo-biphenyl-azo-Verbindungen keine spezifische Hemmungswirkung auf diese Reaktion ausüben, daß demnach die R-Salz-azo-biphenyl-Gruppe zwar eine markante Spezifitätsänderung hervorruft, aber nicht allein die neue Spezifität bestimmt. Das gleiche Diazonium-Salz wurde dann an Pferdeserumalbumin gekuppelt<sup>40</sup>). Hier war die Spezifitätsänderung, im Gegensatz zu Eialbumin, nur unbedeutend gering. Es war nicht möglich, das Farbstoffalbumin so zu fraktionieren, daß eine Fraktion nicht mehr mit Pferdeserumalbumin-Antikörpern reagierte, Serumalbumin-Antikörper reagierten in identischer Weise mit dem Farbstoff-Protein wie mit dem homologen Serumalbumin; im einen Fall erhielt man rote, im anderen farblose Präcipitate.

Während also die Einführung einer gewissen Zahl von Azo-Gruppen in ein Protein eine tiefgreifende Spezifitätsänderung hervorrufen kann, ergibt die Einführung der gleichen Gruppen in ein anderes Protein so geringfügige Spezifitätsänderungen, daß sie selbst mit empfindlichen, quantitativen serologischen Methoden nicht nachweisbar sind. Vermutlich sind die Tyrosin- und anderen aromatischen Gruppen im Hühnereialbumin und Pferdeserumalbumin, welche mit den Diazonium-Salzen kuppeln, in verschiedener Weise am Zustandekommen der immunologischen Spezifität beteiligt. Sterische Anordnung und die Art der Wiederkehr dieser Gruppen scheinen daher von wesentlich größerer Bedeutung für die spezifitätsbestimmende Funktion dieser Gruppen im Protein zu sein, als ihre bloße Anwesenheit in der Molekel<sup>41</sup>).

<sup>38</sup>) Z. B. Azostromata-Methode, K. Landsteiner, l. c. Note 8; Colloidum-Adsorbate: P. R. Cannon u. C. F. Marshall, J. Immunology **38**, 365 [1940].

<sup>39</sup>) M. Heidelberger u. F. E. Kendall, J. exp. Medicine **59**, 519 [1934]; **62**, 467, 697 [1935].

<sup>40</sup>) E. A. Kabat u. M. Heidelberger, ebenda **66**, 229 [1937].

Ferner wurde gefunden, daß das Farbstoffeialbumin und das Farbstoffserumalbumin, entgegen den Erwartungen, mit den jeweils heterologen Antiseren keine Kreuzaktion zeigten, obwohl in beiden Antigenen die gleiche Farbstoffkomponente vorlag. „Wenn es möglich ist, die Erscheinungen der serologischen Spezifität auf der Basis reaktionsfähiger determinanter Gruppen zu erklären<sup>41)</sup>, so will es hier scheinen, daß die charakteristischen oder dominanten Spezifitäten nicht nur von den eingeführten Gruppen sowie von den Tyrosin- und anderen cyclischen Gruppen ausgehen, an welche diese gebunden sind, sondern auch von den chemisch charakteristischen Teilen eines jeden Proteins, welche an diese Gruppen angrenzen“ (M. Heidelberg<sup>41)</sup>).

Die Abgrenzung von determinanter Gruppe und unspezifischem Trägerprotein ist demnach keineswegs scharf zu ziehen. Die räumlichen und strukturellen Verhältnisse spielen von Protein zu Protein eine mehr oder minder entscheidende Rolle. Auf diesen Umstand hat neuerdings F. Haurowitz<sup>42)</sup> mit Nachdruck hingewiesen. Proteine, welche durch Einführung von nur einer Art determinanter Gruppe in künstliche Antigene umgewandelt wurden, ergaben Immunsere mit verschiedenen Antikörper-Fractionen, die sich durch den Grad der Anpassung an diese determinante Gruppe und ihre Umgebung unterschieden. Haurowitz hat daher den Begriff der „determinanten Faktoren“ innerhalb der determinanten Gruppe eingeführt, denen im Immunsere „multiple Antikörper“ gegenüberstehen. Jedes Antiserum enthält multiple Antikörper, auch wenn zu seiner Gewinnung ein vollkommen einheitliches Antigen verwendet wurde. „The multiplicity of antibodies after immunization with one uniform antigen, can best be explained by the assumption that the specific groups of antibodies are adjusted more or less completely to particular portions of the determinant group. Consequently we must consider the determinant group of the antigen-molecule as a complex, formed by the combination of several determinant factors (i. e. sub-groups or spatial arrangements)“ (F. Haurowitz).

In künstlichen Antigenen ließen sich die determinanten Faktoren herausarbeiten. Das künstliche Antigen Sulfanil-azo-Schafserumglobulin ergab z. B. die folgenden determinanten Faktoren (in der unteren Reihe symbolisiert):

para Sulfanilsäure Phenylazo Schaf Serumglobulin  
p S Az Sch Gl

Die Unterscheidung einzelner Antikörper des Antisera ist nach Haurowitz gegeben durch die determinanten Faktoren des Antigens, welche zu ihrer spezifischen Präzipitation erforderlich sind. Z. B. bezeichnet man die Antikörper in einem Immunsere gegen Sulfanil-azo-Schafserumglobulin (Faktoren: p-S-Az-Sch-Gl), welche nur durch das homologe Antigen präzipitiert werden, als Anti-p-S-Az-Sch-Gl; jene Antikörper, die durch Sulfanil-azo-Eialbumin gefällt werden, als

Tabelle 1. Antikörper eines Kaninchen-Immunsers gegen Sulfanil-azo-Schafserumglobulin.

Test-Antigen	Antikörper	mg Antikörper in 10 ccm Immunsere
Schafserumglobulin.....	Anti-Sch-Gl	2
Metanil-azo-Katzenserumglobulin.....	Anti-S-Az-Gl	2
Arsanil-azo-Katzenserumglobulin.....	Anti-p-Az-Gl	2,4
Sulfanil-azo-Katzenserumglobulin.....	Anti-p-S-Az-Gl 7,7 — (2,4 + 2,0)	3,3
Sulfanil-azo-Schafserumglobulin.....	Anti-p-S-Az-Sch-Gl 25 — (7,7 + 2,0)	15,3
	Total.....	25

Tabelle 2. Antikörper eines Kaninchen-Immunsers gegen Arsanil-azo-Schafserumglobulin.

Test-Antigen	Antikörper	mg Antikörper in 10 ccm Immunsere
Schafserumglobulin.....	Anti-Sch-Gl	26
Arsanil-azo-Eialbumin...	Anti-p-As-Az	12
Sulfanil-azo-Katzenserumglobulin.....	Anti-p-Az-Gl	
Arsanil-azo-Katzenserumglobulin/.....	Anti-p-As-Az-Gl 14,6 — (12 + 1)	1,6
Arsanil-azo-Schafserumglobulin/.....	Anti-p-As-Az-Sch-Gl	17—18
	Total.....	57—59

<sup>41)</sup> M. Heidelberg, Cold Spring Harbour Sympos. quantitat. Biol. 6, 369 [1938].

<sup>42)</sup> J. Immunology 43, 331 [1942].

Anti-p-S-Az. Die vorstehenden Tab. 1 und 2 geben zwei quantitative Versuche wieder, aus denen die Bildung multipler Antikörper unter dem wechselnden Einfluß determinanter Faktoren ersichtlich ist<sup>43)</sup>.

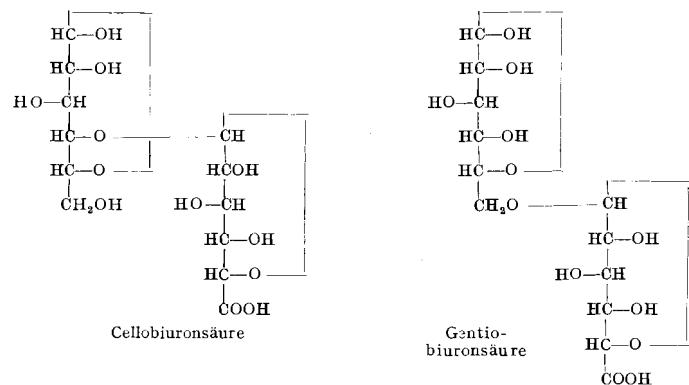
Die Zurückführung der antigenen Spezifität auf den Begriff der determinanten Gruppe hat sich bei der Aufklärung der **Antigene pathogener Mikroorganismen** glänzend bewährt. Am besten untersucht sind die spezifischen Kapselantigene der Pneumococcen<sup>44)</sup>.

Die Pneumococcen gehören zu den kapselbildenden Bakterien. Die Kapsel, eine schleimige Hülle, welche den Bakterienleib umgibt, stellt eine Schutzmaßnahme des Mikroorganismus gegen die Abwehrkräfte des Tierkörpers (bei der Infektion) oder gegen ungünstige Bedingungen der Kultur dar. Virulente Stämme verfügen über die Kapsel, ungekapselte Cocci sind avirulent. Es hat sich gezeigt, daß man unter den Pneumococcen mehrere Typen nach ihrem serologischen Verhalten unterscheiden kann (bis heute kennt man bis zu 50 Typen<sup>45)</sup>). Jeder Typ wird nur von dem homologen Antiserum agglutiniert; Tiere, welche mit einem bestimmten Typ immunisiert sind, werden nur gegen die Infektion dieses einen Typs geschützt (Neufeld, Cole; s. Note 45).

Durch die Arbeiten von Avery, Heidelberg und Goebel wurde nachgewiesen, daß die serologischen Unterschiede der Pneumococcentypen auf eine Substanz der Kapsel zurückzuführen sind. Aus der Kapsel und bei lebhaft wachsenden Kulturen auch aus der Kulturlösung, konnte ein für jeden Typ spezifisches Kohlenhydrat isoliert werden, welches dem Pneumococcus seine serologische Typenspezifität verleiht<sup>46)</sup>. Es sind hochmolekulare, in Wasser (z. T. kolloidal) lösliche, stickstoffhaltige oder -freie, deutlich von Typ zu Typ chemisch unterscheidbare Körper<sup>46)</sup>. Die Molekulargewichte liegen, je nach der Methode der Aufarbeitung schwankend, in der Größenordnung 5000—10 000<sup>47)</sup> (vgl. aber auch Noten 48, 58).

Diese Polysaccharide sind Haptene, sie geben spezifische Präzipitation mit homologem Antiserum noch in Verdünnungen von 1:5—8·10<sup>6</sup>. Durch Kupplung an Eiweiß zum Vollantigen aufgebaut<sup>48)</sup>, verleihen sie Tieren nach der Injektion aktive Immunität gegen tödliche Dosen des homologen Typs.

Ist es hier nun möglich, determinante Gruppen herauszuarbeiten? Besonders eingehend analysiert wurde das spezifische Kohlenhydrat des Pneumococcus Typ III. Es besteht aus Glucose und Glucuronsäure im Verhältnis 1:1. Mit fortschreitendem, hydrolytischem Abbau der großen Molekel zu kleineren Bruchstücken schwindet die Präzipitationsfähigkeit. Bruchstücke vom Molekulargewicht 550 (Trisaccharid-Stufe) wirken noch präzipitationshemmend, solche vom Molekulargewicht 350 (Disaccharid-Stufe) sind serologisch unwirksam<sup>49)</sup>. Die determinante Gruppe mußte also in diesen Größenordnungen gesucht werden. Künstliche Antigene mit Glucose und mit Glucuronsäure ergaben, daß das Glucuronsäure-Antigen Reaktionsfähigkeit gegenüber Typ III-Antiserum besaß. Glucuronsäure-Antikörper wirkten aber nicht immunisierend gegen Pneumococcen<sup>50)</sup>. Bei der vorsichtigen Hydrolyse des Typ III-Polysaccharids konnten Goebel u. Mitarb.<sup>52)</sup> eine Aldobionsäure isolieren und ihre Struktur als die der Cellobiose entsprechende Cellobiuronsäure (Glucose-4-β-glucuronid) aufklären und durch Synthese sichern.



<sup>43)</sup> O. T. Avery, Naturwiss. 21, 777 [1933]; H. Rudy, l. c. Noten 1 u. 20; O. Westphal, l. c. Note 5.

<sup>44)</sup> F. Kaufmann, E. Morch u. K. Schmith, J. Immunology 40, 279 [1941]. Nur wenige Typen sind allerdings für die menschliche Pathologie von Interesse. Die Typen werden mit den Indices I, II, III usw. bezeichnet.

<sup>45)</sup> M. Gundel, Die Typenlehre in der Mikrobiologie, Jena 1934.

<sup>46)</sup> R. Brown, J. Immunology 37, 445 [1939]; l. c. Note 43.

<sup>47)</sup> M. Heidelberg u. F. E. Kendall, J. biol. Chemistry 96, 541 [1932].

<sup>48)</sup> F. H. Babers u. W. F. Goebel, ebenda 89, 387 [1930].

<sup>49)</sup> W. F. Goebel u. O. T. Avery, J. exp. Medicine 54, 431 [1931].

<sup>50)</sup> M. Heidelberg u. F. E. Kendall, ebenda 57, 733 [1933].

<sup>51)</sup> W. F. Goebel, ebenda 64, 29 [1936]; vgl. a. 66, 191 [1937].

<sup>52)</sup> W. F. Goebel u. M. Heidelberg, J. biol. Chemistry 74, 613 [1927]; W. F. Goebel u. R. D. Hotchkiss, ebenda 121, 195 [1937]; 110, 391 [1935].

Es lag nahe, auch dieses Spaltstück zum künstlichen Vollantigen aufzubauen. Der Aufbau erfolgte über das p-Aminobenzylglykosid und dessen Kupplung an Eiweiß nach der Azo-Methode<sup>53</sup>). Die gewonnenen Antiseren besaßen hohe Agglutinationskraft gegenüber Typ III-Pneumococcen<sup>53,54</sup>). Tiere wurden durch die Vorbehandlung mit diesem, sozusagen synthetischen, Antigen immun gegen hundertfach tödliche Dosen von Typ III-Pneumococcen! Das künstliche Antigen leistet immunisatorisch praktisch das gleiche wie die intakten Coccen. Wenn auch dieser Befund vielleicht keine erhöhte praktische Bedeutung beansprucht, da wir gute Chemotherapeutika gegen Pneumonien besitzen, so ist damit doch der Immuntherapie ein grundsätzlich neuer Weg aufgezeigt.

Es ist Goebel u. Mitarb.<sup>55</sup>) gelungen, die Struktur des Typ III-Polysaccharids vollkommen aufzuklären. Die sich periodisch wiederholenden Cellobiuronsäure-Einheiten sind derart aneinander gebunden, daß das C-Atom 3 der Glucuronsäure an das C-Atom 1 der folgenden Glucose-Einheit  $\beta$ -glykosidisch anknüpft.

Außer bei Typ III bestehen die spezifischen Kohlenhydrate der Pneumococcen Typ II und VIII ebenfalls aus Glucose und Glucuronsäure, bei Typ VIII im Verhältnis 7 : 2. Aus Typ VIII-Polysaccharid konnte die gleiche Cellobiuronsäure als Baustein isoliert werden<sup>52</sup>), welche auch hier determinanten Charakter besitzt, so daß die Typen III und VIII Kreuzreaktion zeigen<sup>56</sup>). Doch enthält das Typ VIII-Antiserum darüber hinaus noch weitere, nicht mit Typ III kreuzreagierende Antikörper, denn Typ III-Pneumococcen binden nur etwa ein Drittel aller spezifischen Typ VIII-Antikörper. Bei der vollen Typ VIII-Spezifität sind demnach weitere Glucose-Einheiten mit im Spiel. Heidelberg<sup>57,58</sup>) hat diese Kreuzreaktion und die einzelnen Antikörperfraktionen sehr eingehend analysiert. Bei Typ II scheint Glucuronsäure allein oder vielleicht die der Gentiobiose entsprechende Gentioburonsäure determinante Funktionen zu besitzen<sup>54</sup>). Typ II zeigt entsprechend keine Kreuzreaktion mit III oder VIII.

Die bis heute bekannten zahlreichen Kreuzreaktionen bei natürlichen Antigenen oder Haptenen verschiedenster biologischer Herkunft können vielfach auf übereinstimmende determinante Kohlenhydrat-Anteile zurückgeführt werden. Das nimmt an sich nicht wunder. Wenn, wie bei den Pneumococcen, Disaccharid-Radikale bereits die immunologische Spezifität bestimmen können, so darf man annehmen, daß in der Natur derartige Kohlenhydrat-Kombinationen gelegentlich mehrmals gefunden werden und sich in serologischen Kreuzreaktionen manifestieren. Es kann sich dabei um ausgesprochene Zufallsspiele der Natur handeln. In diesem Sinne lassen immunologische Kreuzreaktionen nicht ohne weiteres auf biologische Verwandtschaft schließen.

Aus der großen Zahl bekannter Kreuzreaktionen seien hier nur einige wenige Beispiele mit Pneumococcen-Kohlenhydraten genannt, die chemisch näher untersucht sind. Seit langem kennt man die Kreuzreaktion von Pneumococcen Typ II und Friedländer Typ B-Bacillen<sup>59</sup>). Neuerdings haben E. J. Hehre u. Y. J. Sugg<sup>60</sup>) Kreuzreaktionen zwischen einem spezifischen Polysaccharid, welches von *Leuconostoc mesenteroides* gebildet wird (das übrigens durch ein isoliertes Enzymsystem in vitro aus Rohrzucker synthetisiert werden kann) und den Antiseren von Pneumococcen Typ II und XX beschrieben. Von großem Interesse ist die immunologische Beziehung des Pneumococcus Typ XIV zu den Blutkörperchen des Menschen<sup>61</sup>). Typ XIV-Pferdeimmunseren wirken beim Menschen spezifisch hämolytisch und können daher therapeutisch nicht verwendet werden. Das Typ XIV-Kapselpolysaccharid besteht aus Galaktose und N-Acetyl-glucosamin<sup>62</sup>). Es lag daher nahe, die menschlichen Blutgruppen-Kohlenhydrate für diese Reaktion verantwortlich zu machen, welche zum größten Teil aus den nämlichen Zuckern aufgebaut sind<sup>63</sup>). In der Tat ließ sich diese Annahme bestätigen<sup>64</sup>). Für die Aufklärung der Blutgruppensubstanzen kann diese Kreuzreaktion von Bedeutung sein. Das spezifische Polysaccharid des Typs XIV zeigt überdies auch immunologische Verwandtschaft zu einem Polysaccharid von Anthrax<sup>64</sup>).

<sup>53</sup>) W. F. Goebel, J. exp. Medicine **63**, 409 [1938]; Nature [London] **143**, 77 [1939].

<sup>54</sup>) Derselbe, J. exp. Medicine **72**, 33 [1940].

<sup>55</sup>) R. E. Reeves u. W. F. Goebel, J. biol. Chemistry **139**, 511 [1941]; M. H. Adams, R. E. Reeves u. W. F. Goebel, ebenda **140**, 653 [1941].

<sup>56</sup>) J. Y. Sugg, E. L. Caspari, W. L. Fleming u. J. M. Neill, J. exp. Medicine **47**, 917 [1928]; W. F. Goebel, l. c. Note 52.

<sup>57</sup>) M. Heidelberg, E. A. Kabat u. D. Shrivastava, ebenda **65**, 487 [1937].

<sup>58</sup>) M. Heidelberg, E. A. Kabat u. M. Mayer, ebenda **75**, 35 [1942].

<sup>59</sup>) W. F. Goebel, M. Heidelberg u. O. T. Avery, ebenda **42**, 708 [1925].

<sup>60</sup>) Ebenda **75**, 339 [1942]; J. Immunology **43**, 119 [1942].

<sup>61</sup>) M. Finland u. E. C. Curnen, Science [New York] **87**, 417 [1938]; A. J. Weil u. E. Sherman, J. Immunology **38**, 139 [1939].

<sup>62</sup>) P. B. Beeson u. W. F. Goebel, J. exp. Medicine **70**, 239 [1940].

<sup>63</sup>) K. Freudenberg u. O. Westphal, Heidelberg Akad. **1938**, 1; K. Landsteiner u. R. A. Harte, J. exp. Medicine, **71**, 551 [1940]; J. biol. Chemistry **140**, 673 [1941].

<sup>64</sup>) G. Ivanovic, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **98**, 373, 420 [1940].

Gewisse pflanzliche Gummiarten, wie Akazien- und Kirschgummi, sind Polyuronsäuren mit einem hohen Gehalt an Glucuronsäure und Glucose. Mit Pneumococcen Typ II- und III-Antiseren geben die nativen Gummi keine spezifischen Reaktionen<sup>65</sup>), wohl aber, wie Marrack<sup>66</sup>) gezeigt hat, durch schonende Säureeinwirkung gewonnene Abbauprodukte. Künstliche Antigene mit Akazien- und Kirschgummi ergeben bei der Immunisierung keine pneumococcen-wirksamen Antikörper<sup>65</sup>), trotz der zweifellos in der Molekel vorhandenen Aldobionsäure-Einheiten. Diese liegen im nativen Gummi offenbar maskiert vor und werden erst nach vorsichtiger Hydrolyse determinant. Nach C. L. Butler u. L. H. Cretcher<sup>67</sup>) werden bei milder Hydrolyse von Akaziegummi zuerst Arabinose und Rhamnose abgespalten. Die besondere Anordnung dieser beiden Zucker wird daher nach Partridge u. Morgan<sup>68</sup>) für die serologische Spezifität nativen Akaziengummi von Bedeutung sein. Die Urnsäure scheint hierfür keine Rolle zu spielen, da Urnsäure-Haptene die Präzipitation von Akaziengummi durch Akaziengummi-Antiserum nicht hemmen. Man kann dies als ein Beispiel für „serologische Konstitutionsforschung“ bezeichnen.

## 2. Aufbau der natürlichen Vollantigene.

Die Methoden der Immunisierung gegen Infektionskrankheiten sind zwar schon lange bekannt; Versuche zur Reindarstellung der hierbei wirksamen Vollantigene wurden jedoch erst in den vergangenen 10 Jahren mit Erfolg unternommen. Diese Untersuchungen befaßten sich vor allem mit der Isolierung somatischer Antigene von gramnegativen Bakterien<sup>68</sup>). A. Boivin u. L. Mesrobian<sup>69</sup>) zeigten als erste, daß aus gramnegativen Bakterien durch Behandlung mit 0,2 n Trichloressigsäure bei 0° wäßrige Extrakte mit stark antigenen Eigenschaften gewonnen werden können. Die Analyse des alkohol-fällbaren, hochmolekularen Materials ergab einen hohen Gehalt an Kohlenhydrat und Lipoiden, dagegen wurde Eiweiß in größerer Menge nicht gefunden („glycolipoide Antigene“). Zur gleichen Zeit fanden H. Rastick u. W. W. C. Topley<sup>70</sup>), daß durch die Einwirkung von Trypsin in schwach alkalischem Medium der antigene Komplex gewisser Bakterien in Lösung gebracht werden kann. Die Analysen ergaben ähnliche Resultate wie die der Trichloressigsäure-Extrakte. Besonders einfach vollzieht sich der Trypsin-Auflösung mancher Bakterien in schwach alkalischer 15—25%iger Harnstoff-Lösung<sup>71</sup>). J. Walker<sup>72</sup>) gibt an, daß 2,5 molare Harnstoff-Lösung aus Bakterien der Salmonellagruppe Substanzen extrahiert, welche kohlenhydrat-reich und eiweißarm sind und bei Mäusen stark antigen wirken. J. W. Palmer u. T. D. Gerlough<sup>73</sup>) zeigten, daß man bei Typhusbacillen mit 90%igem Phenol wasserlösliches, antigenes Material extrahieren kann. Neuerdings haben Westphal u. Bister<sup>74</sup>) ein einfaches, allgemeiner anwendbares Verfahren zur Extraktion antigener Glykoproteide aus (gramnegativen) Bakterien aufgefunden. Es besteht in der Behandlung der Bakterien mit Phenol-Wasser-Emulsionen, wobei sich Glykoproteide als alkohol-fällbare Substanz in der wäßrigen Phase anreichern. Es konnten so u. a. Vollantigene aus *Bact. proteus* X 19, *proteus vulgaris*, Ruhr-, Typhus- und Colibacillen isoliert werden. In ihren eingehenden Untersuchungen über das somatische O-Antigen von *Bact. dysenteriae* (Shiga) und *Bact. typhosum* fanden Morgan u. Partridge<sup>74,75</sup>), daß organische Lösungsmittel, insbes. Glykole wie Diäthylenglykol ( $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) zur schonenden Extraktion des Vollantigens hervorragend geeignet sind.

Das somatische Vollantigen von *B. dysenteriae* ist ein Komplex, der in 3 charakteristische Komponenten zerlegt werden kann: ein Polysaccharid, welches für die Shiga-Spezifität verantwortlich ist, ein (genau analysiertes<sup>74</sup>) Phospholipoid und einen Protein-Träger (sog. „conjugated protein“). Durch Erhitzen mit verd. Essigsäure lassen sich die 3 Komponenten voneinander trennen. Von großem Interesse ist der Befund<sup>74,75</sup>), daß Formamid den antigenen Komplex löst und daß in Lösung Dissoziation des Komplexes eintritt, insbes. nach

<sup>65</sup>) S. M. Partridge u. W. T. J. Morgan, Brit. J. exp. Pathol. **23**, 84 [1942].

<sup>66</sup>) J. R. Marrack u. Carpenter, ebenda **19**, 52 [1938]; l. c. Note 4. Vgl. B. Woolf, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **130**, 60, 70 [1941].

<sup>67</sup>) J. Amer. chem. Soc. **51**, 1519 [1929].

<sup>68</sup>) Vgl. Th. Wagner-Jauregg, diese Ztschr. **53**, 319 [1940].

<sup>69</sup>) C. R. Stances Soc. Biol. Filiales Associées **112**, 76, 611, 1009; **114**, 302, 305 [1933]; **115**, 304 [1934]; Rev. Immunologie **2**, 113 [1936]. A. Boivin, Paris Médical Nr. 6 [1939]; Rev. Immunologie **8**, 16 [1942].

<sup>70</sup>) Brit. J. exp. Pathol. **15**, 113 [1934]; vgl. Lancet **1**, 252 [1937].

<sup>71</sup>) O. Westphal u. F. Bister, unveröffentlicht.

<sup>72</sup>) Biochemic. J. **34**, 323 [1940].

<sup>73</sup>) Science [New York] **92**, 155 [1940]; s. a. W. T. J. Morgan u. S. M. Partridge, l. c. Note 74.

<sup>74</sup>) W. T. J. Morgan u. S. M. Partridge, Biochemic. J. **31**, 2003 [1937]; **34**, 169 [1940]; **35**, 1140 [1941].

<sup>75</sup>) Dieselben, Brit. J. exp. Pathol. **23**, 151 [1942].

Zusatz von wenig Ameisensäure. Zunächst wird das Phospholipid abgespalten. Der verbleibende binäre Symplex, ein Glykoprotein, besitzt noch die volle antigene Wirkung. Damit ist erwiesen, daß das Phospholipid für die Antigenität keine Rolle spielt<sup>76)</sup>. Bei längerer Einwirkung von Formamid findet weiter schrittweise Dissoziation statt; Zwischenprodukte lassen sich fassen. Schließlich liegt das reine Polysaccharid neben dem Protein vor. Die 3 Komponenten wurden isoliert und analysiert. Das eiweißfreie Polysaccharid ist nicht antigen, während das „conjugated protein“ noch schwache (aber nicht Shiga-spezifische) antigene Eigenschaften besitzt<sup>77)</sup>. Von grundsätzlicher Bedeutung ist es, daß es gelang, die Polysaccharid- und die Protein-Komponente zum vollantigenen Symplex zu rekombinieren. Dies gelingt z. B. durch Lösen in Formamid, welches anschließend gegen Wasser ausdialysiert wird, oder durch Vereinigen der Komponenten in alkalischer Lösung und vorsichtiges Ansäuern. Das Protein allein fällt beim Ansäuern aus, in Kombination mit dem Kohlenhydrat entsteht dagegen eine kolloidale Lösung, aus der das Vollantigen isoliert werden kann.

Aus *Bact. typhosum* konnte ein analog aufgebautes Vollantigen gewonnen werden<sup>78)</sup>. Der dissoziierende Abbau führte ebenfalls zu einem Phospholipid<sup>76)</sup>, dem typhus-spezifischen Kohlenhydrat und einem „conjugated protein“. *Morgan* u. *Partridge* konnten zeigen, daß diese Proteine von *Bact. typhosum* und von *Shigabacillen* in jeder Hinsicht (chemisch, physikalisch-chemisch und immunologisch) identisch sind. Infolgedessen gelingt es leicht, das Typhus-Kohlenhydrat mit dem Shiga-Protein, oder umgekehrt, zum Vollantigen aufzubauen.

Es ist wahrscheinlich, daß die oben beschriebenen, angeblich praktisch protein-freien Vollantigene gramnegativer Bakterien<sup>69,70,72)</sup> ebenfalls mehr oder weniger eines „conjugated protein“ enthielten. Die Protein-Komponente in diesen Antigenen entzieht sich in vieler Hinsicht der qualitativ analytischen Erfassung. So ist das Protein von *Morgan* u. *Partridge* gegen proteolytische Enzyme sehr stabil (Trypsin). Nach der Kombination mit Kohlenhydrat verschiebt sich die Fällbarkeit durch Elektrolyte und durch Protein-Fällungsmittel ganz erheblich. Es wird interessant sein, zu prüfen, ob das „conjugated protein“ von Dysenterie- und Typhusbacillen noch von anderen Bakterien gebildet wird.

Die Neigung dieser Bakterien-Proteine, Symplexe zu bilden, geht außerordentlich weit. *Partridge* u. *Morgan*<sup>65)</sup> fanden, daß viele Kohlenhydrathaptene, z. B. Akazien- und Kirschgummi, Agar-Agar u. a., mit diesen Proteinen kombiniert werden können und so Vollantigene von hoher Immunisierungswirkung entstehen! Diese elegante Methode scheint allgemeinerer Anwendung fähig zu sein, sie kann auch praktische Bedeutung erlangen. Es gelang *Morgan*<sup>78)</sup>, die Blutgruppensubstanz A (aus Schweinemagenschleimhaut<sup>79)</sup>) an das konjugierte Shiga-Protein zu kuppeln und so ein stark wirksames A-Vollantigen aufzubauen.

Ein anderes Verfahren zur Überführung von Haptenen in Vollantigene ist die schon länger bekannte, sog. **Kombinations-Immunisierung**<sup>80)</sup>. Hierbei genügt die Injektion des Haptens (in diesem Falle besonders von Lipoiden) in Mischung mit einem artfremden Protein, um bezüglich des Haptens antigene Wirkung zu erzielen. Man kann Hapten und Protein sogar getrennt verabfolgen. Das klassische Beispiel ist das in der Natur weit verbreitete *Forsman*-Hapten<sup>81)</sup>. Reine Kohlenhydrathaptene können so jedoch nicht antigene Eigenschaften erlangen.

Gelegentlich hat sich das Azo-Verfahren zur Überführung von Polysaccharid-Haptenen in Vollantigene bewährt. *Goebel* u. *Avery*<sup>49)</sup> stellten den p-Nitro-benzyläther des Pneumococcus Typ III-Kohlenhydrates her, welchen sie zum p-Amino-benzyläther reduzierten. Die Diazotierung und Kupplung an Eiweiß lieferte ein wirksames Vollantigen. In ähnlicher Weise konnten *O. Westphal*, *E. Reiche* u. *E. Kvah*<sup>82)</sup> die menschliche Blutgruppensubstanz A ohne Wirk-

samkeitsverlust an Proteine kuppeln und erhielten durch Injektion der so gewonnenen Vollantigene beim Kaninchen Antiseren, welche spezifisch nur menschliche A-Blutkörperchen, nicht aber solche der Gruppen B oder Null agglutinierten. *J. H. Humphrey*<sup>83)</sup> hat Hyaluronsäure nach dem Azo-Verfahren an Proteine gekuppelt. Bei der Immunisierung wurden keine Antikörper mit Hyaluronsäure-Spezifität erhalten. Diese Polyuronsäure scheint demnach keine Hapten-Eigenschaften zu besitzen, vermutlich wegen ihres ubiquitären Vorkommens. *O. Westphal*, *H. Schmidt* u. *M. Hasenbrink*<sup>84)</sup> fanden, daß die von *K. Maurer*<sup>85)</sup> durch gerichtete Oxydation mit Stickstoffdioxid aus Cellulose dargestellten Polyuronsäuren nach der Kupplung an Eiweiß (Azo-Verfahren) als typische Haptene mit markanter Spezifität fungieren. Wegen ihrer Ähnlichkeit mit einigen spezifischen Pneumococcus-Kohlenhydraten haben diese, in beliebiger Menge darstellbaren<sup>85)</sup> Stoffe als Modell-Haptene Bedeutung. Zur Kupplung von Pektin an Eiweiß hat sich in Händen von *H. Mischeel* u. *H. Dörner*<sup>86)</sup> das Azid-Verfahren bewährt, indem Ester des Pektins über das Hydrazid in das Azid übergeführt wurden, die dann in schwach alkalischer Lösung mit Proteinen reagierten.

Bezüglich der Struktur der Vollantigene stehen besonders 2 Fragen zur Diskussion:

#### 1. Können reine Proteine antigen sein?

Es sind damit Proteine gemeint, welche praktisch nur aus Aminosäuren aufgebaut sind. Einige Forscher verneinen diese Frage unter Hinweis auf gewisse — allerdings wenige bisher bekannte — reine Proteine, welche in der Tat praktisch unantigen sind: z. B. das vollkommen kohlenhydrat-freie Crystalalbumin von *L. F. Hewitt*<sup>87)</sup>, bei welchem nicht, wie bei der ebenfalls unantigenen Gelatine, der Einwand erhoben werden kann, daß es sich um ein Abbauprodukt handelt<sup>88)</sup> oder um ein Protein, dem aromatische Aminosäuren fehlen<sup>89)</sup>. Die verschiedenen möglichen Gründe für die Nichtantigenität von Proteinen des Crystalbumin-Typs sollen hier nicht erörtert werden. *H. Schmidt* u. Vf. untersuchen zur Zeit, ob Pferde- oder Rinder-Crystalbumin durch chemische Abwandlung oder Substitution antigen werden können. *Mischeel*<sup>86,90)</sup> nimmt an, daß die Einführung von determinantem Kohlenhydrat eine Vorbedingung für die Antigenität der Proteine sei, und tatsächlich enthalten ja die meisten Proteine einige Prozent fest gebundenes Kohlenhydrat. So sind z. B. im Gegensatz zu Crystalbumin die Serumglobuline kohlenhydrat-haltig und starke Antigene. Indessen haben *Coghill* u. *Creighton*<sup>91)</sup> beweisen können, daß die immunologische Spezifität des stark antigenen Pferdeserum-Pseudoglobulins nicht durch seinen Kohlenhydrat-Anteil (3,7%)<sup>92)</sup> gegeben ist. Denn weder mit reinen kristallisierten proteolytischen Fermenten gewonnene Abbauprodukte des Pferdeglobulins, in denen der Zucker angereichert war, noch das schonend isolierte Kohlenhydrat selbst, gaben irgendwelche spezifischen Hemmungsreaktionen mit Pferdeglobulin-Antiserum. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen über den Zuckeranteil von Eialbumin<sup>93)</sup> und Thyreoglobulin<sup>94)</sup>.

In den Fällen, wo die Hydrolysenprodukte aus den Kohlenhydrat-Anteilen von Serumproteinen isoliert wurden, fand man die gleichen drei Zucker, Mannose, Glucosamin und gelegentlich Galaktose<sup>95,96)</sup>. Wenn auch die zugrunde liegenden Kohlenhydrate nicht identisch sein müssen, so kann dennoch in vielen Proteinen das gleiche Kohlenhydrat vorliegen. Zur Zeit scheint es, daß die serologische Spezifität derartiger Kohlenhydrate in Proteinen nicht hapten-artig ist, sondern mehr der R-salz-azobiphenyl-azo-Gruppe in den oben beschriebenen<sup>39-41)</sup> Protein-Derivaten ähnelt. „Wenn diese Anschauung zutrifft, so kann die Anwesenheit des gleichen Kohlenhydrates die Spezifität der damit verbundenen Proteine in geringerem oder größerem Ausmaße modifizieren, ohne die Bildung von Antikörpern auszulösen, welche mit dem isolierten Kohlenhydrat reagieren“ (vgl. Note 41). Im Hinblick auf die gestellte Frage verdient die Beobachtung von *Pillemer*, *Ecker* u. Mitarb.<sup>96)</sup> Beachtung,

<sup>76)</sup> Für die Toxizität des Symplexes scheint das Phospholipid eine gewisse Rolle zu spielen.

<sup>77)</sup> Durch weitere Dissoziation in Phenol-Lösung oder in Alkali geht das „conjugated protein“ in ein „simple protein“ über, welches kohlenhydrat- und phosphor-frei ist und nicht antigen, und welches nicht mehr mit dem Shiga-Kohlenhydrat Bindung eingeht.

<sup>78)</sup> Chem. and Ind. **60**, 722 [1941].

<sup>79)</sup> *W. T. J. Morgan*, Biochemic. J. **37**, 640 [1943].

<sup>80)</sup> *H. Sachs* u. *A. Klopstock*, Biochem. Z. **159**, 491 [1925]; vgl. *A. J. Weil* u. *A. Besser*, Klin. Wschr. **10**, 1914 [1931]; *E. Berger* u. *H. Scholer*, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **78**, 16 [1932]; *R. Brandt* u. *H. Goldhammer*, Klin. Wschr. **15**, 1875 [1936].

<sup>81)</sup> *K. Landsteiner* u. *J. v. d. Scheer*, J. exp. Medicine **41**, 427 [1925]; **42**, 123 [1925]; *F. E. Brumius*: Chemical studies on the true Forsman-Hapten, the corresponding antibody and their interaction, Stockholm 1936.

<sup>82)</sup> Naturwiss. **32**, 40 [1944].

<sup>83)</sup> Biochemic. J. **37**, 460 [1943].

<sup>84)</sup> *K. Maurer* u. *G. Reiff*, J. makromol. Chem. **1**, 27 [1943].

<sup>85)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **280**, 92 [1944].

<sup>86)</sup> Biochemic. J. **30**, 2229 [1936]; **31**, 1047 [1937].

<sup>87)</sup> Nach *F. B. Seibert* (Bacteriol. Rev. **5**, 69 [1941]) kann man Tuberkulin-Präparate vom Molekulargewicht < 17000 darstellen, welche stark antigene Wirksamkeit besitzen.

<sup>88)</sup> Vgl. hierzu: *W. Mutsaers*, Ann. Inst. Pasteur **62**, 197 [1939]; *N. Gutman*, Rev. Immunologie **4**, 111 [1938]; *F. Haurowitz*, *M. Tuncu* u. *P. Schwerin*, Biochemic. J. **37**, 249 [1943].

<sup>89)</sup> *F. Mischeel*, *H. Emde* u. *H. Dörner*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 258 [1942].

<sup>90)</sup> J. Immunology **35**, 477 [1938].

<sup>91)</sup> Vgl. *C. Rimington*, Biochemic. J. **25**, 1062 [1931].

<sup>92)</sup> *R. M. Ferry* u. *A. H. Levy*, J. biol. Chemistry **105**, XXVII [1934].

<sup>93)</sup> *H. E. Stockinger* u. *M. Heidelberger*, J. exp. Medicine **66**, 251 [1937].

<sup>94)</sup> *S. Fränkel* u. *C. Jellinek*, Biochem. Z. **185**, 392 [1927]; *P. A. Levene* u. *T. Mori*, J. biol. Chemistry **84**, 49 [1929]; *Bierry*, C. R. heb. Séances Acad. Sci. **191**, 1381 [1930]; *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* **116**, 702 [1934]; *M. Stacey* u. *J. M. Wolley*, J. chem. Soc. [London] **1940**, 184; **1942**, 550.

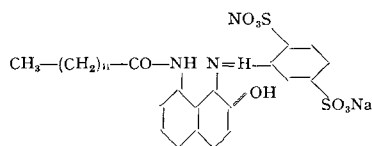
<sup>95)</sup> *L. Pillemer*, *E. E. Ecker*, *V. C. Myers* u. *E. Muntwyler*, J. biol. Chemistry **123**, 365 [1938].

daß die stark antigene kristallisierte Urease durch UV-Strahlung nicht nur als Ferment inaktiviert wird, sondern gleichzeitig auch ihren antigenen Charakter weitgehend verliert. Von allgemeinem Interesse ist die Frage nach der Antigenitäts- und Spezifitäts-Änderung, welche Proteine während der Denaturierung erfahren. Leider sind die zur Klärung dieser Frage angewendeten Methoden nur in wenigen Fällen exakt reproduzierbar. Hier sei vor allem eine Untersuchung von *J. O. Erickson* u. *H. Neurath*<sup>97)</sup> genannt. Sie fanden, daß kristallisiertes und reversibel denaturiertes (8 M Harnstoff-Lösung) Pferdeserum-Albumin immunologisch die gleiche Spezifität zeigten. Dagegen war die antigene Wirksamkeit während des Denaturierungsprozesses auf weniger als 10% von der des nativen Albumins abgesunken. Im Anschluß an diese Befunde diskutieren Vff. die Beziehungen zwischen Protein-Denaturierung und immunologischer Aktivität auf der Basis der bisher bekannten physikalisch-chemischen Unterschiede zwischen nativen und denaturierten Proteinen.

2. Gibt es eiweiß-freie Antigene? (Vgl. hierzu auch Noten 69, 70, 72). Mehrfach ist behauptet worden, daß es gelingt, Haptene durch Adsorption an beliebige organische oder anorganische Kolloide zu eiweiß-freien Vollantigenen aufzubauen<sup>98</sup>). Es besteht kein Zweifel, daß schwache Antigene durch Adsorption an Trägerkolloide wesentlich verstärkt werden können<sup>99</sup>). Daher haben *K. Landsteiner* u. *A. Jacobs*<sup>100</sup>) darauf hingewiesen, daß bei allen derartigen Versuchen zunächst die absolute Eiweißfreiheit des Haptens bewiesen werden müsse. *M. Stacey*<sup>101</sup>) gibt zu bedenken, daß polysaccharid-synthetisierende Fermente oftmals in geringen Mengen am Substrat gebunden bleiben und so u. U. zur Manifestierung geringer Antigenität, die dann durch unspezifische kolloide Träger verstärkt wird, ausreichen können.

Die sorgfältige Nachprüfung hat ergeben, daß eindeutig protein-freie Hapten-Adsorbate, gewonnen aus vollkommen stickstoff-freien Kohlenhydraten, niemals antigen sind<sup>102)</sup>. Somit bleibt nach den bisherigen Untersuchungen ein gewisser (gegebenenfalls minimaler) Protein-Anteil notwendige Voraussetzung der Antigenität.

*Fierz-David, Jadassohn* u. Mitarb.<sup>109</sup>) haben versucht, eiweißfreie, antigen-ähnliche Modelle zu synthetisieren. Modellmäßig wird ein Antigen als Verbindung zwischen Hapten und einer „Schiene“ aufgefaßt. Als „Schiene“ fungieren längere Fettsäure-Radikale, welche an das Hapten (Disaccharid u. ä.) gebunden sind, z. B. Disaccharid-Fettsäurerest. Damit solche Verbindungen genügend wasserlöslich sind, müssen noch polare Gruppen anwesend sein, z. B. Disaccharid-Fettsäure-Rest-Phosphorsäure. Diesen theoretischen Anforderungen genügte das Oleyl-N-methyl-taurin, welches anaphylaktisierende Wirkung besitzen sollte. Es wurde dann aber gefunden, daß die Wirkung häufig auch am nicht-sensibilisierten Uterus eintrat<sup>104</sup>), demnach nicht spezifisch ist. *K. Landsteiner* u. *J. v. d. Scheer*<sup>105</sup>) hatten gefunden, daß nach Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Succinanyl-säure-azoprotein (Vollantigen!) der anaphylaktische Schock mit Bis-succinanyl-säure-azoresorcin (Hapten) ausgelöst werden kann. Neuerdings haben *Fierz-David, Jadassohn* u. a.<sup>106</sup>) „anaphylaxie-ähnliche“ Reaktionen beschrieben, welche durch 2'-Oxy-8'-acylamino-naphthalin-1'-azo-benzol-2,5-disulfosaures Natrium auslösbar sein sollen, wenn der Acyl-Rest länger als C<sub>12</sub> ist. Verbindungen mit Acyl-Resten von C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub> hemmen die durch C<sub>13</sub>-C<sub>18</sub>-Verbindungen auslösbare Uteruskontraktion.



Da es sich hier immer um stark capillaraktive Mittel handelt, erscheint es fraglich, ob die beschriebenen Reaktionen mit der echten Anaphylaxie zusammenhängen. Vielleicht handelt es sich um Effekte, wie man sie bei der Einwirkung verschiedener Seifen auf Proteine<sup>107)</sup> beobachtet.

Es gibt einige **einfache chemische Verbindungen**, welche dadurch spezifisch antigene Wirkungen ausüben, daß sie *in vivo* mit körpereigenen Proteinen kuppeln. *Landsteiner*<sup>108)</sup> injizierte Meerschweinchen z. B. Dinitrochlorbenzol. Bei der Zweitinjektion mit Dinitrochlorbenzol-azoprotein wurde typischer anaphylaktischer Schock ausgelöst. Für entsprechende Haptene zeigten die Tiere starke Hautüberempfindlichkeit. Die wiederholte Berührung mit solchen einfachen chemischen Verbindungen (Dinitrohalogenbenzole, Diazomethan, Phenylhydrazin u. a.) kann beim Menschen zu allergischen Erscheinungen führen (z. B. Kontaktdermatitis in der chemischen Industrie<sup>109)</sup>). *K. Landsteiner u. M. W. Chase*<sup>110)</sup> zeigten, daß Hautüberempfindlichkeit gegen Dinitrofluorbenzol oder Picrylchlorid dadurch hervorgerufen werden kann, daß man Stromata der eigenen Spezies mit diesen Verbindungen konjugiert und die Konjugate intraperitoneal injiziert. Die sensibilisierende Wirkung einer anderen Gruppe von einfachen Substanzen (z. B. Pikrinsäure) scheint darauf zu beruhen, daß sie zunächst in reaktionsfähigere Stoffe übergehen, die dann mit Proteinen kuppeln können<sup>111)</sup>.

### 3. Wirkstoffe als Antigene.

a) **Fermente.** Man kann durch Injektion von Amylase<sup>112</sup>, Trypsin<sup>113</sup>, Pepsin und Pepsinogen<sup>114</sup> von Katalase<sup>115</sup>, von Tyrosinase<sup>116</sup> und besonders von Urease<sup>117</sup> (vgl. auch Note 96) die Bildung e c h t e r Antikörper auslösen. Bei Urease gründet sich ein sehr wirksames Anreicherungsverfahren auf die Zergliederung des spezifischen Präzipitates Urease-Antiurease<sup>118</sup>). In manchen Fällen wird das Ferment durch sein Antiferment spezifisch inaktiviert, in anderen Fällen ist die Inaktivierung gering oder gar nicht zu beobachten. Hier darf angenommen werden, daß die determinante Gruppe des Antigens mit der prosthetischen Gruppe des Fermentes nicht zusammenfällt (vgl. hierzu Note 116).

Hierzu haben *F. Kubowitz* u. *P. Ott*<sup>119)</sup> einen interessanten Beitrag geliefert. Sie isolierten und kristallisierten aus Muskeln und *Jensen*-Sarkomen der Ratte das reduzierende Gärungsferment, welches die Reaktion: Brenztraubensäure + Dihydropyridinnucleotid = Milchsäure + Pyridinnucleotid bewirkt. Das Ferment ist für Kaninchen antigen, das gebildete Antiferment hemmt die Wirkung sowohl des Fermentes aus Muskeln als auch desjenigen aus Sarkom. Diese Hemmung hängt jedoch von der Brenztraubensäure-Konzentration ab; sie nimmt ab, wenn letztere steigt. Dies ist theoretisch von Interesse, „weil aus dem Antagonismus zwischen Brenztraubensäure und Antiferment folgt, daß beide Substanzen von der gleichen Stelle des Fermentproteins gebunden werden; daß also das Antiferment hemmt, indem es die Brenztraubensäure von dem Fermentprotein verdrängt“.

b) **Virus.** Es ist bekannt, daß das Überstehen gewisser Viruskrankheiten hochgradige Immunität gegen die Zweitinfektion verursacht<sup>120</sup>). Nachdem einige Virusarten in reinem Zustande als Virusproteide dargestellt worden waren, konnte ihr Verhalten als Antigen genauer untersucht werden<sup>121</sup>). Besonders eingehend wurde das antigene Verhalten des T a b a k m o s a i k v i r u s studiert<sup>122,123</sup>). Bemerkenswert ist, daß die enzymatische Abspaltung der Nucleinsäure auf die Antigenität und Spezifität des Tabakmosaikvirus keinen Einfluß hat<sup>124</sup>). Die Nucleinsäure besitzt hier offenbar keine determinanten Eigenschaften<sup>125</sup>). Die antigene Spezifität der Viren ist zur Unterscheidung und Erkennung nahe verwandter Arten ge-

<sup>97)</sup> J. exp. Medicine **78**, 1 [1943].

<sup>93)</sup> P. Gonzalez u. M. Armangué, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **106**, 1007 [1931]; **110**, 216 [1932]; J. Zozaya, Science [New York] **74**, 271 [1932]; J. exp. Medicine **55**, 325 [1932]; J. Zozaya u. J. Clark, ebenda **57**, 21 [1933].

<sup>99)</sup> S. F. Jones, ebenda 48, 303 [1927]; L. Hektoen u. W. H. Welker, J. infect. Diseases 53, 309 [1933]; vgl. A. J. Weil u. A. Besser, Klin. Wschr. 1931, 1914.

<sup>100)</sup> Proc. Soc. exp. Biol. Med. **29**, 570 [1932].

<sup>101)</sup> Chem. and Ind. **61**, 110 [1942].

<sup>102)</sup> L. B. J. G. FitzGerald, Trans. Roy. Soc. Canada, Sect. III 37, 1 [1933]; S. M. Partridge u. W. T. J. Morgan, l. c. Note 65.

<sup>103)</sup> H. E. Fierz-David, W. Jadassohn u. A. Margot, *Helv. chim. Acta* **21**, 293 [1938].

<sup>104)</sup> H. E. Fierz-David, W. Jadassohn u. A. Kleemann, ebenda 22, 3 [1939].

<sup>105</sup>) J. exp. Medicine **56**, 399 [1932]; **57**, 633 [1933]; **67**, 79 [1938].

<sup>107)</sup> *M. L. Anson*, *Science* [New York] **90**, 256 [1939]; [*J. gen. Physiol.* **23**, 239 [1939]

R. Kuhn u. H. J. Bielig, Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 1080 [1940]; O. Westphal u. D. Jeckel, Kolloid-Z. **101**, 213 [1942].

<sup>108)</sup> K. Landsteiner u. J. Jacobs, J. exp. Medicine **61**, 643 [1935]; **64**, 625 [1936]; K. Landsteiner, New England J. Med. **215**, 1199 [1936]; K. Landsteiner u. M. W. Chase, J. exp. Medicine **66**, 337 [1937].

<sup>108)</sup> Vgl. z. B. N. S. Wedroff u. A. P. Dolgoff, Arch. Dermatologie Syphilis **171**, 647 [1935]; K. Landsteiner, Schweiz. med. Wschr. **71**, 1359 [1941].

<sup>110)</sup> J. exp. Medicine **78**, 431 [1941]; K. Landsteiner, l. c. Note 109.

<sup>111)</sup> K. Landsteiner u. A. A. Di Somma, ebenda **72**, 361 [1940].

<sup>113)</sup> E. Standenath, ebenda 9, 9 [1928]; C. Tam, Brossch. I, b

<sup>114</sup> J. H. Northrop, *J. gen. Physiol.* **13**, 739 [1930]; C. V. Seastone u. R. M. Harriott

ebenda **20**, 797 [1937].

<sup>113)</sup> *E. Tria*, J. biol. Chemistry **129**, 377 [1939]; *D. H. Campbell* u. *L. Fourt*, ebenda **129**,

385 [1939].  
116) M. H. Adams, *Leop. Med.*

<sup>117)</sup> *L. S. Kirk u I. B. Sumner*, *J. Immunology* **28**

<sup>11)</sup> J. S. Kirk u. J. B. Sumner,  
Enzymforsch., **6**, 201 [1937]

<sup>118)</sup> *J. S. Kirk*, *J. biol. Chemistry* **100**, 667 [1933].

<sup>119)</sup> Biochem. Z. **314**, 94 [1943].

<sup>120)</sup> R. Doerr, Handb. d. Virusforsch., Springer, Wien 1938, I, 90 ff.; C. Hallauer, ebenda I. Erg.-Bd. 1944, 349 ff.; Rocha-Lima, Reis u. Silberschmidt: Methoden d. Virusforsch., Urban - Schwarzenberg, Berlin-Wien 1939, 300 ff.; T. M. Rivers, Science [New York] 85, 107 [1942].

<sup>121)</sup> Vgl. J. R. Marrack, l. c. Note 2.

<sup>122)</sup> G. Schramm u. H. Friedrich-Freksa, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **270**, 233 [1941];  
M. v. Andrusch, H. Friedrich-Freksa u. G. Schramm, Arch. exp. med. 2, 89 [1941].

<sup>123)</sup> W. M. Stanley u. T. F. Anderson. J. biol. Chemistry **139**, 325, 339 [1941].

124) G. Schramm, Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 536 [1941].

<sup>125)</sup> Vgl. D. Lackman, St. Mudd u. Mitarb., J. Immunology **40**, 1 [1941].

eignet<sup>126)</sup>. *G. Schramm* u. *H. Friedrich-Freksa*<sup>127)</sup> konnten eine Mutante des Tabakmosaikvirus vom ursprünglichen Tabakmosaikvirus serologisch unterscheiden!

c) **Hormone.** Es ist gelungen, für einige Proteohormone, das thyreotrope<sup>128)</sup> und gonadotrope<sup>129)</sup> Hormon sowie Prolactin<sup>130)</sup> spezifische Antihormone nachzuweisen. Die Antigenität von Insulin ist umstritten<sup>90,131)</sup>. Der Nachweis der Antihormone konnte bisher nicht einwandfrei mit immunologischen Methoden (Präzipitation usw.) erbracht werden, sondern gründet sich auf biologische Inaktivierung der Hormonwirkung. In geringer Menge scheinen Antihormone auch normalerweise im Blut vorzukommen, bei langdauernden Hormongaben treten sie jedoch in größerer Menge auf, so daß die Versuchstiere u. U. gegen das Hormon refraktär werden<sup>132)</sup>. Bildungsort der Antihormone ist das Reticuloendothel<sup>132)</sup>, wo auch die Antikörper entstehen. Man ist geneigt, ihre Bildung als Regulationsmaßnahme des Organismus gegen ein Überangebot an tropen Hormonen anzusehen<sup>133)</sup>.

*Harington* u. Mitarb.<sup>133)</sup> stellten fest, daß durch Kupplung von Thyroxin an Eiweiß chemospezifische Antigene erhalten werden, in denen das Thyroxin die Rolle der determinanten Gruppe spielt. Die Thyroxin-Antikörper zeigen antagonistisches Verhalten gegenüber der stoffwechselsteigernden Wirkung des Schilddrüsenhormons. Thyroxyl-Proteine lösen also die Bildung von „Antithyroxinen“ im serologischen und physiologischen Sinne aus. In Verfolg derartiger Untersuchungen zeigten die englischen Forscher<sup>134)</sup>, daß künstliche

Aspiryl-Proteine sich ebenfalls als chemospezifische Antigene verhalten. Bei jungen Ratten mit experimentellem Fieber blieb nach passiver Immunisierung mit Antiaspirin-Serum vom Kaninchen die antipyretische Wirkung des Aspirins aus, die bei nicht-immunisierten Tieren regelmäßig eintritt. Neuerdings haben *Went*, *Kesztyüs* u. Mitarb.<sup>135)</sup> Adrenalin-azo-proteine hergestellt und den determinierenden Einfluß des Adrenalins durch serologische Hemmungsreaktionen nachgewiesen. Die durch Injektion von Adrenalin-azo-proteinen entstandenen Antikörper hatten keinen Einfluß auf die Wirkung des Adrenalins am Blutdruck, an der Nickhaut von Katzen, am virginellen Katzenuterus, am *Trendelenburg*-Frosch und am hypodynamen Froschherzen. Lediglich gegenüber der primären Abnahme des respiratorischen Stoffwechsels weißer Ratten auf hohe Adrenalin-Dosen verhielten sich die Antikörper antagonistisch. Bei mit Adrenalin-azo-eiweiß immunisierten Ratten kam es statt dieser Senkung zu einer beträchtlichen Steigerung des respiratorischen Stoffwechsels<sup>136)</sup>.

*S. B. Hooker* u. *W. C. Boyd*<sup>137)</sup> haben versucht, Morphin und Strychnin an Proteine zu koppeln. Die Versuche mit Morphin waren nicht erfolgreich. Dagegen konnte ein Monoaminostrychnin dargestellt und gekuppelt werden. Die Reaktion der erhaltenen Antiseren mit Strychnylproteinen wurde durch Strychnin gehemmt. Gegenüber der lethalen Strychninvergiftung bei Mäusen waren die Antiseren jedoch ohne neutralisierende Wirkung.

Die Kupplung östrogenen Hormone wurde von *L. F. King* u. *W. R. Franks*<sup>138)</sup> beschrieben. Über die Immunologie dieser Hormon-Proteide ist dem Vf. bisher nichts bekannt geworden.

Die serologische und physiologische Prüfung von chemospezifischen Antigenen mit bestimmten physiologischen oder pharmakologischen Wirkstoffen als determinanter Gruppe wird jedenfalls auch weiterhin theoretisch und praktisch von Interesse sein.

Teil II folgt demnächst. Eingeg. 11. April 1944. [A. 3.]

<sup>126)</sup> Vgl. z. B. *A. S. Lazarus* u. *K. F. Meyer*, *J. Bacteriol.* **38**, 171 [1939]; *M. D. Eaton*, *W. P. Martin* u. *M. D. Beck*, *J. exp. Medicine* **75**, 21 [1942], u. a.

<sup>127)</sup> Privatmitteilung.

<sup>128)</sup> *J. B. Collip*, *Lancet* **1934**, 784; *J. Physiology* **82**, 11 [1934]; *A. Loeser*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **177**, 745, 749 [1935]; **184**, 23 [1938]; daselbst Übersicht mit Literatur. — Vgl. aber *S. C. Werner*, *Endocrinology* **22**, 291 [1938]; *W. Eichhoff* u. Mitarb., *Frankf. Z. Pathol.* **52**, 303 [1938]; *Verh. dtsch. pathol. Ges.* **31**, 461 [1939].

<sup>129)</sup> *B. Zondek* u. *F. Sulman*, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **37**, 193, 198, 343 [1937]; *J. W. Rowlands*, *Lancet* **1937**, 924; *Proc. Roy. Soc. [London]*, Ser. B **124**, 503 [1938]; **126**, 76 [1938]; *R. Brandt* u. *H. Goldhammer*, *Klin. Wschr.* **1938**, 236.

<sup>130)</sup> *F. G. Young*, *Biochemic. J.* **32**, 656 [1938]; *W. J. Strangeways*, *J. Physiology* **93**, 47 P [1938].

<sup>131)</sup> *P. Wassermann*, *R. H. Broh-Kahn* u. *J. A. Mirsky*, *J. Immunology* **38**, 213 [1940].

<sup>132)</sup> *A. S. Gordon*, *Cold Spring Harbour Sympos. quantitativ. Biol.* **5**, 419 [1937]; *I. c.* Noten 128–130.

<sup>133)</sup> *R. F. Chilton*, *C. R. Harington* u. *M. E. Yuill*, *Biochemic. J.* **32**, 1119 [1938].

<sup>134)</sup> *G. C. Butler*, *C. R. Harington* u. *M. E. Yuill*, ebenda **34**, 838 [1940].

<sup>135)</sup> *St. Went*, *L. Kesztyüs* u. *T. Szilagyi*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **193**, 609 [1939]; **198**, 338 [1941]; *St. Went*, *Klin. Wschr.* **1942**, 470.

<sup>136)</sup> *St. Went*, *L. Kesztyüs* u. *T. Szilagyi*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **202**, 143 [1943].

<sup>137)</sup> *J. Immunology* **38**, 479 [1940].

<sup>138)</sup> *L. F. King* u. *W. R. Franks*, *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 2042 [1941].

## Über Umkehrbarkeit physiologischer Reaktionen\*)

Von Prof. Dr. F. KNOOP, Tübingen. Physiolog.-Chemisches Institut

In den letzten Jahren ist in der chemischen Literatur wiederholt auf die Bedeutung der Reversibilität physiologisch-chemischer Reaktionen hingewiesen worden<sup>1)</sup>, und zahlreiche Arbeiten aus verschiedenen Gebieten haben Belege dafür gebracht. Zweifellos finden Reaktionen wie die Verseifung der Fette, die Spaltung der Glucosid-Bindung der Kohlenhydrate und der Peptid-Bindung der Eiweiße im lebenden Organismus ebenso in umgekehrter Richtung statt, reversible Hydrolysen, die mit geringer Wärmetönung einhergehen und bei dem Umbau der körperfremden Nährstoffe zu körperadäquaten von größter Bedeutung für die Ernährung sind. Sie lassen sich in vitro in einfachen Ansätzen verfolgen, und man kann annehmen, daß sie in den Zellen ähnlich verlaufen, auch wenn hier ihre genaue Messung nur schwer möglich ist. Nach *Eggert* u. *Hock*<sup>2)</sup> kann man solche Vorgänge als reversibel im physikalischen Sinne (also als Gleichgewichtsreaktionen) nur bezeichnen, „wenn sie ohne Veränderung ihrer Umgebung verlaufen“. Aber: Leben ist Bewegung, — und die Vorgänge in den Zellen des Gesamtorganismus verlaufen ganz sicher mit fortwährender Veränderung ihrer Umgebung.

Es seien deshalb hier einige Reaktionen zusammengestellt, die für den ganzen Zellchemismus charakteristisch sind, die aber nicht wie etwa die Umaminierung der Eiweiß-Abbauprodukte nach *Braunstein* u. *Kritzmann* oder wie die reversiblen Übergänge von Citronensäure  $\rightleftharpoons$  Aconitinsäure  $\rightleftharpoons$  Isocitronensäure Gleichgewichtsreaktionen sind, sondern solche, die mit starken Energieverschiebungen in Oxydation und Reduktion einhergehen und bei denen auf dem gleichen oder aber auch auf ganz anderen Wegen dieselben Substanzen zurückgebildet werden, von denen sie ausgegangen waren — Reaktionen, bei denen wir also, lediglich am Effekt gemessen, von einer physiologischen Umkehrbarkeit sprechen müßten.

1926 haben die Kliniker *Knipping* u. *Ponndorf*<sup>3)</sup> „die Besonderheit der Einwirkung von Organismen auf organische Substanzen“ unter dem Gesichtspunkt der Reversibilität erörtert. Sie verfütterten einerseits Aceton, andererseits Isopropylalkohol und fanden im Harn stets beide — also Oxydation und Reduktion am gleichen Substrat. Die Autoren zitierten besonders die Aminosäure-Synthese des Verfassers und seine Betonung des Reversibilitätsprinzips im Lebensbereich auf dem Stockholmer Physiologenkongreß<sup>4)</sup>, unabhängig von der die Autoren zu ihrer Auffassung gekommen waren. Wenn nun auch in dem Nachweis der physiologischen Umkehrbarkeit des Aminosäure-Abbaus eine Analogie zu ihren Reaktionen vorliegt, da in Anwesenheit von Ammoniak Ketosäuren zu Aminosäuren hydriert werden können und dabei eine klare Umkehrung ihres Abbaues erfolgt, so wurde doch gleichzeitig ausgeführt, daß hier keine einfache Reversibilität vorliegt. Der Befund der reduktiven physiologischen Aminierung, bei der sich in diesem Fall gleichzeitig eine Acetylierung abspielte, hatte uns schon veranlaßt, nach dem Wasserstoff-Donator zu suchen; und wir fanden 1922, daß dafür vor allem die Brenztraubensäure in Frage kam, die unter gleichzeitiger Essigsäure-Bildung den Acetyl-Rest und den Wasserstoff liefert. Hier war also eine weitere Substanz beteiligt. Und so etwa verlaufen solche Prozesse im Tierkörper meistens. Überall liegt ein buntes Gemisch verschiedenster Substanzen vor, die sich fortwährend gegenseitig beeinflussen und so in gekoppelter Reaktion die Umkehr eines Vorganges herbeiführen können, der vorher, vielleicht andersorts, in entgegengesetzter Richtung verlaufen war.

Es ist in der Tat die Umkehrbarkeit physiologischer Reaktionen für das Leben besonders charakteristisch; und es ist sehr dankenswert, daß hier auch einmal von klinischer Seite auf einen so allgemein biologischen Gesichtspunkt hingewiesen

\*) Nach einem Vortrag im chemischen Colloquium in Tübingen im November 1943.

<sup>1)</sup> Vgl. *W. Franke*, diese Ztschr. **52**, 696 [1939].

<sup>2)</sup> Lehrbuch d. physikal. Chemie 1941, S. 42.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **180**, 25 [1926].

<sup>4)</sup> Münchener Med. Wschr. **18**, 2151 [1926]; Naturwiss. **18**, 224 [1930].