

Über die Behringschen Diphtherie- und Tetanus-Antitoxine

Von Prof. Dr. HERMANN E. SCHULTZE*), Marburg-L.

Aus den Behringwerken Marburg/Lahn

Es scheint, daß Antikörper als struktur-modifizierte γ -Globuline aufzufassen sind. Die nativen Antitoxine lassen sich durch Elektrophorese in reine Fraktionen vom γ -Globulin- und T-Globulin-Typ aufteilen. Enzymatischer Abbau von Diphtherie-Antitoxin ergab ein Antitoxin mit Kristallisationstendenz. Diffusion von Antigen und Antikörper in Gelatine führt zu Präzipitatbanden, deren Zahl mit fortschreitender Reinigung abnimmt. Mit diesem Verfahren wurde das Tetanus-Antitoxin genauer differenziert und eine spezifische Toxin-Antitoxin-Verbindung gefunden. Es scheint derart ein Weg gegeben, der in Kürze zu reinsten Antitoxinen führen kann.

Anläßlich der 100. Wiederkehr des Geburtstages von Emil von Behring wird aus seinem umfangreichen wissenschaftlichen Vermächtnis besonders die im Jahre 1890 gemeinsam mit Kitasato veröffentlichte Arbeit: „Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren“¹⁾ in unserer Erinnerung lebendig. Mit ihr hat der geniale Arzt und Forscher nicht nur seinen Fachkollegen ein neues Heilverfahren zugänglich gemacht, sondern zugleich den Grundstein zur spezifischen Serumtherapie und -prophylaxe gelegt.

Von ärztlicher Seite wurde die Entdeckung der Antitoxine gegen Diphtherie- und Tetanustoxin zum Segen der Menschheit erschöpfend ausgenutzt. Die Literatur gibt klare und eindeutige Auskunft hierüber. Sie umreißt eine große Epoche ärztlicher Forschung, die im Begriff steht, mit Emil von Behring als „Retter der Kinder und Verletzten“ in die Geschichte einzugehen. Legen wir uns aber die mehr an den Chemiker gerichtete Frage nach der Natur oder gar nach der Konstitution der Behringschen Antitoxine vor, so müssen wir zugeben, daß wir noch recht weit von ausgereiften Erkenntnissen entfernt sind. Nachstehend soll versucht werden, die chemische Problematik dieser Antikörper durch eine einführende Übersicht und eigene experimentelle Beiträge klarzulegen.

Gewinnung, Auswertung, Reinigung

Das von Behring entdeckte antitoxische Diphtherie- bzw. Tetanusserum wird von größeren Tieren, bevorzugt von Pferden, Rindern oder Schafen gewonnen, denen über einen längeren Zeitraum hochtoxische Kulturfiltrate von Diphtherie- oder Tetanusbazillen in allmählich ansteigenden Dosen parenteral verabfolgt werden. Im Laufe der Jahre ist es gelungen, die ursprüngliche Immunisierungstechnik zu verbessern und hierdurch den Antitoxintiter im Serum der behandelten Tiere zu erhöhen. Dabei hat sich die Anwendung der auch für die aktive Immunisierung des Menschen geeigneten ungiftigen aber noch antigenwirksamen Formoltoxoiden²⁾ und deren Adsorption an schwer resorbierbare Trägersubstanzen besonders bewährt.

Als Grundlage für die Wertbemessung der Diphtherie- und Tetanusantitoxine dient seit Behring, Ehrlich und Römer³⁾ das im Kleintierversuch (Meerschweinchen, Mäuse) durch Verdünnungsreihen feststellbare Neutralisationsvermögen eines Serums gegenüber gerade tödlichen Dosen der entsprechenden Toxine. Um jedoch zu

international vergleichbaren Wertzahlen für die in 1 cm³ Serum enthaltenen Antitoxineinheiten (AE, IE) zu gelangen und auch um individuelle Unterschiede in der Giftempfindlichkeit der Versuchstiere auszuschalten, wird das durch einen Parallelversuch ermittelte Giftneutralisationsvermögen eines Standardantitoxins als Bezugswert verwendet. Neben der Auswertung *in vivo* hat die von Ramon⁴⁾ für das Diphtherieantitoxin entdeckte und von Scholz⁵⁾ auf das Tetanusantitoxin übertragene Flockungsreaktion zeitweise eine größere Bedeutung als quantitative Testmethode erlangt. Obwohl feststeht, daß in einem bestimmten Bereich der Flockungszonen, die in Mischungen elektrolythaltiger Antitoxine und der homologen Toxine bzw. Toxoide aufzutreten pflegen, sowohl das Antitoxin wie das Toxin (Toxoid) in das Präzipitat übergehen, hat man nach den Ergebnissen neuester, später noch zu erörternder Untersuchungen damit zu rechnen, daß das bisher analytisch verwertete Flockungsoptimum durch eine Vielzahl unspezifischer Flockungsreaktionen überlagert wird, die das Reagenzglasverfahren der Antitoxinbestimmung mit einem erheblichen Unsicherheitsfaktor belasten.

Wie bei allen Wirkstoffen ist auch für die Erforschung der Antitoxine eine ausreichende Reinigung eine wichtige Voraussetzung. Mit ihr hat sich bereits v. Behring in seinen letzten Lebensjahren befaßt⁶⁾ und die ersten experimentellen Hinweise für die Eiweißnatur der Antitoxine gegeben. Es hat sich aber bald gezeigt, daß eine erfolgreiche Serumreinigung, die eine möglichst weitgehende Abtrennung inaktiver Proteine von antitoxinhaltigen Serumproteinen anstreben muß, mit weit größeren Schwierigkeiten verbunden ist als die Isolierung biologischer Wirkstoffe von geringerer Molekülgröße. Die im Laufe der Zeit erzielten Fortschritte ergaben sich aus dem jeweiligen Stand der präparativen und analytischen Erfahrungen auf dem gesamten Eiweißgebiet.

Anfänglich bestand die einzige Möglichkeit, Serum-eiweißkörper zu fraktionieren darin, sie auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in Wasser oder in mehr oder weniger konzentrierten Salzlösungen zu trennen. Das am meisten angewandte Verfahren beruhte auf der Fällung der die Diphtherie- und Tetanusantitoxine enthaltenden Gesamt-globuline durch Halbsättigung mit Ammonsulfat, der Entfernung der in 33% gesättigter Ammonsulfat-Lösung unlöslichen „Euglobuline“ und der Anreicherung der Antitoxine in der wasserlöslichen „Pseudoglobulin“-Fraktion, die im Bereich von 33–50% Ammonsulfat-Sättigung ausgefällt und anschließend dialysiert wurde. Erhebliche Schwierigkeiten bereitete die Gewinnung lösungsstabiler Antitoxin-Konzentrate. Etwa 10 Jahre nach Behrings

*) Ausschnitte aus Vorträgen über die Plasmaproteine, gehalten am 25. 9. 1953 in Karlsruhe und am 10. 11. 1953 in Gießen.

¹⁾ E. v. Behring u. S. Kitasato, Dtsch. med. Wschr. 16, 1113 [1890].

²⁾ J. L. Burckhard, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. I. O., 1895, 257. E. Salkowsky, Berl. klin. Wschr. 1898, 545. E. Loewenstein, Hyg. Infektionskrankh. 62, 491 [1909].

³⁾ R. Otto u. H. Hetsch: Prüfung u. Wertbemessung der Sera und Impfstoffe, Jena, G. Fischer 1935. H. Schmidt: Praxis der Auswertung von Toxinen und Antitoxinen; Jena, Verlag Fischer 1931. Cl. Jensen: Intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin; Kopenhagen 1933.

⁴⁾ G. Ramon, C. R. Séances Soc. Biol. 86, 661 [1922].

⁵⁾ W. Scholz, Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde, Infektionskrankh. I. O. 91, 72 [1924]. G. Ramon u. P. Descombey, C. R. Séances Soc. Biol. 95, 434 [1926].

⁶⁾ E. v. Behring: Einführung in die Lehre von der Bekämpfung von Infektionskrankheiten; Verlag Hirschwald, Berlin 1912, S. 252.

Tode gelang es jedoch, in den Laboratorien der Behringwerke (1928), eiweißarme Antitoxine durch schonende Elektrodialyse⁷⁾ der durch Salzfractionierung aus Pferdeserum gewonnenen Pseudoglobulinfraktion zu erhalten, die weit über ihre Laufzeit völlig klar blieben. In den folgenden 25 Jahren konnte die Antitoxinreinigung großen Nutzen aus den ständig verbesserten Methoden der Plasmafraktionierung ziehen, die durch moderne analytische Methoden, insbesondere die Ultrazentrifugier- und Elektrophoresetechnik, wesentlich gefördert wurde^{8a)}.

Physikalisch-chemische Eigenschaften nativer

Antitoxine

Elektrophoretisches Verhalten

Bereits vor dem Kriege konnte mit Hilfe der von *Tiselius* entwickelten Elektrophorese-Apparatur nachgewiesen werden, daß die zuvor als einheitlich betrachtete normale Pseudoglobulin-Fraktion elektrophoretisch uneinheitlich zusammengesetzt ist und zum Teil aus α -Globulinen, im wesentlichen aus β - und γ -Globulinen besteht. Die vom Pferd oder Rind gewonnenen antitoxischen Pseudoglobuline ließen mit derselben Methode zusätzlich eine Komponente erkennen, deren elektrophoretische Beweglichkeit zwischen der der β - und γ -Globuline liegt. *Kekwick* und *Mitarb.*⁸⁾ rechnen sie zu den β -Globulinen, *Deutsch* und *Mitarb.*⁹⁾ zu den γ -Globulinen. Eigene, kürzlich bekanntgegebene Auswertungsergebnisse¹⁰⁾ von *Tiselius*-Elektrophoresen, die mit der Skalenmethode¹¹⁾ erhalten wur-

den, haben uns bewogen, die von *Wyckoff* und *Mitarb.*¹²⁾ vorgeschlagene, von *Smith* und *Mitarb.*¹³⁾ ebenfalls benutzte Bezeichnung „T-Komponente“ für das in antitoxischen Pferde- und Rinderseren nachweisbare, schneller als γ -Globulin wandernde Protein zu übernehmen.

Die Vermehrung dieser Komponente während der Immunisierung läßt sich auch papierelektrophoretisch mit der von *Grassmann* und *Hannig*¹⁴⁾ vorgeschlagenen Methode verfolgen. Wir haben uns dieses Verfahrens bedient, weil es schnell durchführbar ist und uns auch die Möglichkeit bot, auf Papier getrennte Eiweißfraktionen durch Elution einzeln zu isolieren und auf diese Weise besonders charakteristische Globulin-Typen näher zu untersuchen.

Bei normalen Pferdeseren und Diphtherie- sowie Tetanusseren vom Pferd ergab die Papierelektrophorese die in Tabelle 1 zusammengefaßten, mit fortschreitender Immunisierungsdauer zunehmenden Verschiebungen im elektrophoretischen Eiweißaufbau.

Die stark anwachsende T-Komponente enthält regelmäßig mehr Antitoxin als die ebenfalls aktive β - und γ -Globulin-Fraktion, ihr Absolutgehalt an Antitoxin hängt aber vom Ausgangstiter ab. Sie erreicht sowohl bei Diphtherie- wie bei Tetanus-Seren Konzentrationen, die im Endstadium bei dem von individuellen Faktoren der Tiere abhängigen Höchstmaß an Antitoxin-Produktion etwa dreimal so hoch sind als im Ausgangsstadium. Außerdem ist eine Abnahme des Albumins (um 20–30% der Ausgangsgewichtsmenge) und der normalen γ -Globulin-Fraktion (um etwa 20% der Ausgangsmenge) deutlich erkennbar. Die relative und absolute Vermehrung an T-Komponente ist aber viel größer als die Abnahme an Albumin und γ -Globulin. Sie ist somit wesentlich beteiligt an der Erhöhung des Gesamteiweißes, die besonders stark zutage tritt, wenn während der Immunisierung keine größeren

⁷⁾ H. E. Schultze, in Ullmanns Encyclopädie der techn. Chemie 3. Aufl. I. Band 613 [1951].

^{8a)} Ein Referat über „Die Methoden und Ergebnisse der Plasmafraktionierung“ von H. E. Schultze und H. D. Matheka wurde in den Behringwerk-Mitteilungen Heft 28 veröffentlicht.

⁸⁾ R. A. Kekwick u. B. R. Record, Brit. J. exp. Pathol. 22, 29 [1940]. R. A. Kekwick, B. L. J. V. Knight, M. G. McFarlane u. B. R. Record, Lancet 1941, Nr. 1, 571. L. Levine, Brit. J. exp. Pathol. 32, 190 [1952].

⁹⁾ H. F. Deutsch u. J. C. Nichol, J. biol. Chemistry 176, 797 [1948]. E. L. Hess u. H. F. Deutsch, J. Amer. chem. Soc. 71, 1376 [1949].

¹⁰⁾ H. E. Schultze, M. Schönenberger u. H. D. Matheka, Behringwerk-Mitteil. Heft 26, 3 [1952].

¹¹⁾ O. Lamm, Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis IV, 10, 1 [1937]. Th. Svedberg u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge; Verlag Th. Steinkopff, Dresden 1940.

¹²⁾ J. van der Scheer u. R. W. G. Wyckoff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 33, 427 [1940]; dieselben u. F. H. Clarke, J. Immunol. 40, 73 [1941].

¹³⁾ E. L. Smith, J. biol. Chemistry 164, 345 [1946]. E. L. Smith u. R. D. Gerlough, ebenda 167, 679 [1947]. E. L. Smith u. D. M. Brown, ebenda 183, 241 [1950].

¹⁴⁾ W. Grassmann u. K. Hannig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290, 1 [1952]; 292, 32 [1953]. Vgl. auch diese Ztschr. 62, 170 [1950].

	Antitoxin i. cm ³	% Ges.- Eiweiß	Albu- min	α_1 -	α_2 -	β_1 -	β	β_2 -	T-	γ -Glo- bulin
Mittelw. v. 8 unters. Normalpferden	—	7,1	29,9	5,6	14,7	12,9		7,8	8,6*)	23,5
Diphtheries. 2003 vor Behandlung	1/80 AE	7,0	33,4	5,6	10,5	5,7		10,8	13,4	20,6
„ 2003 nach 13 Antigeninjekt. ...	80 AE	7,3	29,0	7,0	13,2	7,4		7,3	12,0	24,0
	Antitoxinverteilung							60%		30%
„ 2003 „ 20 „ ..	330 AE	6,9	27,5	4,9	13,6	11,0		8,6	15,1	19,3
	Antitoxinverteilung							60%		39%
„ 2003 „ 23 „ ..	650 AE	7,9	24,5	6,4	14,3		10,4		26,9	17,5
	Antitoxinverteilung							85%		14%
„ 2003 „ 29 „ ..	700 AE	9,0	20,9	4,2	15,1		16,9		26,1	16,8
	Antitoxinverteilung							83%		6%
„ 2059 „ 28 „ ..	900 AE	8,7	20,8	4,2	11,8		14,3		32,6 [†]	16,3
	Antitoxinverteilung						28%		66%	8%
	AE/1 g Eiweiß						16000		23600	7000
„ 2142 „ 34 „ ..	2300 AE	9,2	17,7	4,7	10,8		10,8		39,7	16,3
„ 2142**) „ 34 „ ..	1600 AE	7,7	20,6	4,2	10,9		13,2		33,6	18,6
Tetanuss. 1997 „ 33 „ ..	1300 IE***)	9,8	16,3	4,5	12,4		15,1		39,3	12,4
	Antitoxinverteilung						12%		80%	8%
	IE/1 g Eiweiß						10000		30000	8300
„ 1997**) „ 42 „ ..	650 IE	7,6	23,2	5,8	10,5		12,5		28,0	20,0
	Antitoxinverteilung						15%		78%	7%
	IE/1 g Eiweiß						10000		15700	2950

Tabelle 1. Elektrophoretische Zusammensetzung antitoxischer Pferdeseren

*) Wir fanden diese Komponente nur bei 5 von 8 untersuchten Normalpferden und bezeichneten sie ebenfalls als T-Komponente, weil sie dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie die nach Immunisierung stark vermehrte T-Komponente aufweist.

**) Die Serumproben entstammen Blutentnahmen, denen an drei Vortagen Aderlässe von je 4 l vorausgingen.

*** Die Wertbemessung der Antitoxineinheiten (AE) in Tetanusseren geschieht seit dem 1. Juli 1950 in internationalen Einheiten (IE); 2 frühere AE entsprechen 1 IE. Versuchstier: Maus.

Blutentnahmen vorgenommen werden. Nach stärkeren Aderlässen sinken Gesamteiweiß, T-Komponente und mit ihr der Antitoxintiter, wobei der zur Konstanzhaltung des Blutvolumens schnell einsetzende osmotische Verdünnungseffekt bereits nach 24 h von einem Ansteigen der Normal- γ -Globuline begleitet wird. Die Resynthese des Albumins folgt langsamer.

Zwischen der Albumin-Synthese und der Antitoxin-Produktion besteht nach dem derzeitigen Wissensstand kein direkter Zusammenhang. Hypoalbuminämien können bekanntlich auch durch Organfunktionsstörungen (Arteriosklerose, Nierenentzündung, Lebercirrhose, Plasmocytom, Makroglobulinämie) ausgelöst werden¹⁵), bei denen keine Antikörperbildung stattfindet. Wahrscheinlicher ist eine Beziehung der Antitoxinbildung zur γ -Globulin-Synthese. Bekanntlich führen natürliche Infektionen des Menschen im Stadium der Antikörperbildung zu einer Vermehrung der γ -Globulin-Fraktion, in der die gebildeten Immunstoffe auch in der Regel nachgewiesen werden können. Auf diese und andere Beobachtungen gründet sich die zur Zeit am besten fundierte Auffassung, daß die für die Produktion von γ -Globulinen befähigten Zellen (Plasmazellen des Knochenmarks, Zellen des Reticuloendothelsystems) auch die Bildungsstätte für Antikörper sind, daß aber die normalen γ -Globuline unter der Einwirkung eines Antigens ein spezifisches, komplementäres Strukturmerkmal erhalten und die entstandenen Antikörper somit als modifizierte γ -Globuline aufzufassen sind. Bei der künstlichen Immunisierung von Pferden hat *Kekwick*⁸) durch Ammonsulfat-Fraktionierung im Anfangsstadium eine bevorzugte Bildung von Diphtherie-Antitoxinen vom γ -Globulin-Typ festgestellt, die dann bei fortgesetzter Antigen-Behandlung in einen elektrophoretisch beweglicheren Typ übergehen. *Cinader* und *Weitz*¹⁶) machten kürzlich eine entsprechende Feststellung bei Tetanuspferdeserum. Auch unsere Untersuchungen zeigen eine ständige Abnahme des Antitoxin-Gehalts in elektrophoretisch isolierten γ -Globulinen und eine zunehmende Anreicherung in der schneller wandernden T-Komponente, deren Vermehrung im Verlaufe der Hyperimmunisierung bereits von *Wyckoff* und Mitarb.¹²) beobachtet wurde. *Deutsch* und *Nichol*⁹) fanden in durch Alkohol fraktionierten Diphtherie- und Tetanus-Seren vom Pferd die Hauptmenge der Antitoxine in der γ_1 -Globulin-Fraktion, deren Wanderungsgeschwindigkeit ($u = -2,8 \cdot 10^{-5}$ bei p_H 8,6 und

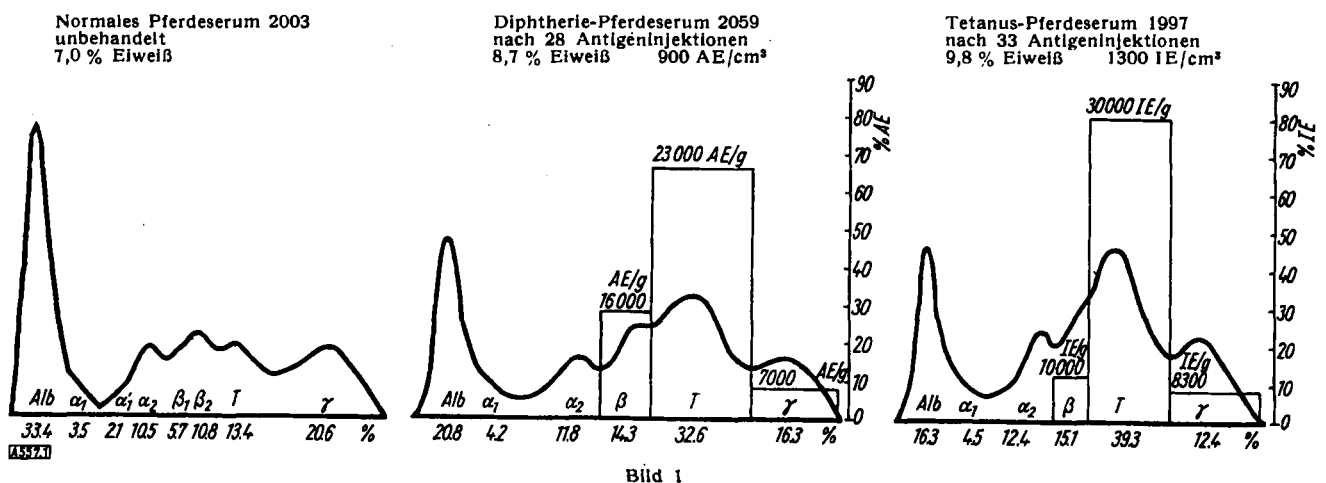
Ionenstärke 0,1) mit der von uns durch Elektrophorese abgetrennten T-Komponente nahezu übereinstimmt ($u = -3,1 \cdot 10^{-5}$, Tabelle 2). Die mit Alkohol isolierte γ_2 -Fraktion ($u = -1 \cdot 10^{-5}$ bei p_H 8,6 und Ionenstärke 0,1) von *Deutsch* entspricht unserer γ -Globulin-Fraktion und enthielt wie diese weit weniger Antitoxin als die beweglichere Komponente. Somit liegen nun bereits mehrere Befunde vor, die für die Annahme sprechen, daß auch beim Großtier die Bildung antitoxischer Immunstoffe mit der Produktion normaler γ -Globuline in Zusammenhang steht, daß aber unter fortgesetzter Antigeneinwirkung die Entstehung eines stärker modifizierten Antikörpertypus mit erhöhter negativer Ladung begünstigt wird.

Während unsere Albumin- und α -Globulin-Fractionen frei von Antitoxinen waren, fanden wir verhältnismäßig viel Antitoxin in der β -Globulin-Fraktion. Hierzu ist aber zu bemerken, daß die elektrophoretische Trennung von β -Globulinen und T-Komponente weit größere Schwierigkeiten bereitet als die Trennung der letzteren von den γ -Globulinen. Während sich im normalen Pferdeserum die β_1 - und β_2 -Globuline deutlich abheben, gehen beide Fraktionen mit fortschreitender Immunisierungsdauer immer mehr in die stark zunehmende T-Komponente über, wie es durch Bild 1 veranschaulicht wird.

Die in Tabelle 1 für Immunseren angegebenen β -Globulin-Gehaltszahlen weisen nicht unbeträchtliche Schwankungen auf, die wir auf die mangelhafte Aufteilung zurückführen. Die ungünstigen experimentellen Voraussetzungen gestatten es daher auch nicht, die Frage einer Beteiligung von β -Globulinen bei der Antitoxin-Synthese zu diskutieren. Es ist uns selbst durch dreimalige präparative Elektrophorese nicht gelungen, das β -Globulin des Tetanuspferdeserums von der T-Komponente zu befreien. Die Unhomogenität des betreffenden Präparates wird durch die in Bild 4 dargestellte, in der *Tiselius*-Apparatur ermittelte Elektrophoresekurve veranschaulicht, bei der zwar als Hauptkomponente das β -Globulin mit der Wanderungsgeschwindigkeit $-3,5$, daneben aber auch beträchtliche Mengen T-Globulin mit der Wanderungsgeschwindigkeit $-(2,5-3,0)$ zu erkennen sind. Der auffallend hohe Antitoxin-Gehalt dieses β -Globulin-Präparates ist sehr wahrscheinlich auf die starke Verunreinigung durch T-Globulin zurückzuführen. Es ist aber noch nicht sicher auszuschließen, daß im nativen Diphtherie- und Tetanuspferdeserum auch kleine Mengen Antikörper von der Beweglichkeit der β -Globuline vorkommen. Bei Hyperimmunseren überwiegt jedenfalls der T-Globulin-Typ sehr stark, während im Anfangsstadium der Immunisierung neben ihm auch der γ -Globulin-Typ in größerer Menge vertreten ist.

¹⁵) F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly: Die Blutweißkörper des Menschen; Verlag B. Schwabe, Basel 1952. H. Bennhold, Med. Klin. 49, 8 [1954].

¹⁶) B. Cinader u. B. Weitz, J. of Hyg. 51, 293 [1953].



Die heterogene Zusammensetzung der Antikörper gilt bei den Blutgruppenagglutininen als erwiesen, und *Haurowitz*¹⁷⁾ hat plausible Gründe für ihre Entstehung angegeben.

Fraktionierung mit Ultrazentrifuge

Da das elektrophoretische Verhalten nicht zur Charakterisierung von Proteinen ausreicht, haben wir die elektrophoretisch isolierten Nativ-Antitoxinpräparate auch in der Ultrazentrifuge (Phywe) untersucht. Dabei erwiesen sich die γ -Globuline und T-Komponenten als weitgehend homogen. Die ermittelten, in Tabelle 2 angeführten Sedimentationskonstanten streuen in dieser Versuchsreihe stärker als bei früheren Untersuchungen¹⁰⁾, bei denen wir in Übereinstimmung mit zahlreichen Literaturangaben¹⁸⁾ keinen Unterschied im Sedimentationsverhalten normaler und antitoxischer Immunglobuline vom Pferd und Rind fanden. Unsere früheren Befunde erstrecken sich auf Protein-Fractionen, die auf chemischem Wege gewonnen und noch nicht in γ - und T-Globuline aufgetrennt worden waren. Bei den nun untersuchten reinen, elektrophoretisch isolierten Unterfraktionen fällt auf, daß die Sedimentationskonstante der antitoxischen T-Komponente und der ebenfalls Antitoxin-reichen β -T-Globulin-Fraktion größer ist als die der entsprechenden Normalglobuline und der relativ Antitoxin-armen γ -Immunglobulin-Fraktion. Diese, noch durch weitere Versuche zu stützende Beobachtung weist darauf hin, daß die Bildung antitoxisch wirksamer T-Globuline möglicherweise mit einer geringgradigen Molekelvergrößerung einhergeht, die auch die Ursache der stärker negativen Ladung des T-Antitoxins gegenüber dem γ -Antitoxin sein könnte. Unsere elektrophoretisch gewonnenen γ - und T-Globuline enthielten nicht die bei der Alkohol-Fraktionierung von *Smith* und *Deutsch* beobachtete, etwa 20% ausmachende Fraktion eines höher polymeren Produktes von $S_{20} = 8-15$.

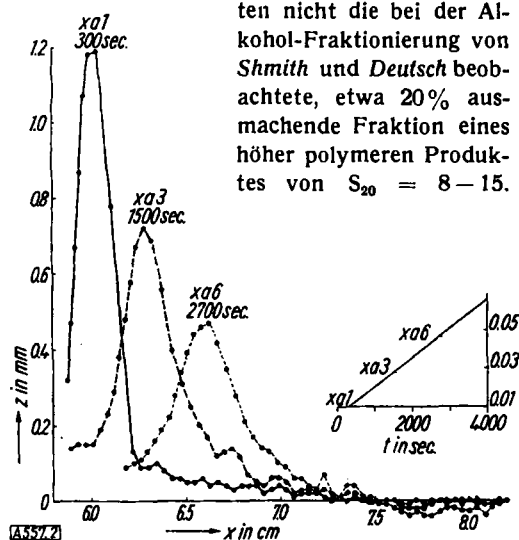


Bild 2
Natives Normal-T-Globulin durch präparative Elektrophorese isoliert
Sedimentation in der Ultrazentrifuge
Lammische Skalenmethode
Phosphatpuffer $pH = 6,8$; Proteinkonzentration = 0,8%;
50000 Umdr./min $S_{20}^{0,8} = 6,2$.
Elektrophorese nach *Tiselius*; Lammische Skalenmethode
Dole-Puffer $pH 8,6$; $\mu = 0,1$, Proteinkonzentration = 1,0%; 20 m Amp.; 335 Volt;
Aufn. nach 150 min, absteigend

Dagegen waren unsere normalen und Antitoxin-haltigen β -Globuline durch höhermolekulare Proteine verunreinigt, von denen eine Komponente mit der Sedimentationskonstanten $S_{20}^{0,8} = 18 \cdot 10^{-13}$ anteilmäßig etwa 4% ausmachte

Elektrophoret. Wanderungsgeschwindigkeit. $10^{-5} cm^2 V^{-1} sec^{-1}$	β -Globulin	T-Globulin	γ -Globulin
Normal-Globuline	-3,6*	-3,0	-1,4
Tetanus-Globuline	-3,5*	-3,1	-1,4
Sedimentationskonst. $s_{20}^{0,8**}$			
Normal-Pferdeserum	6,2*	6,2; 6,3; 6,2	6,4; 6,5 $\cdot 10^{-13}$
Tetanus-Pferdeserum	6,8*); 7,1*)	6,9; 6,9; 6,9	6,5; 6,5 $\cdot 10^{-13}$
IE/g Globulin	16600	18600	6250

Tabelle 2

Physikalisch-chemisches Verhalten nativer, elektrophoretisch getrennter Globulin-Fractionen aus normalem und antitoxin-haltigem Pferdeserum

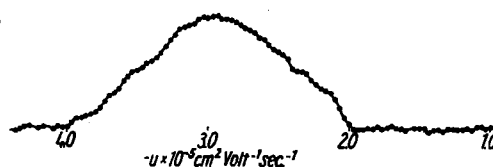
*) Hauptkomponente.

**) Eine Extrapolation auf die Konzentration 0 haben wir in dieser Versuchsreihe nur bei den T-Globulinen vorgenommen und fanden in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, daß die Sedimentation der Globuline in dem hier interessierenden Bereich konzentrationsunabhängig ist. Den von *Smith* und *Brown*¹⁸⁾ nur bei antitoxischem T-Globulin beobachteten Konzentrationseffekt konnten wir somit nicht reproduzieren. Die Ultrazentrifugerversuche wurden von Dr. *Schönenberger*, die Elektrophoreseversuche von *Schmidberger* in den Behringwerken ausgeführt.

(vgl. Bild 4). Entsprechend aufgearbeitete Fractionen aus Diphtherieserum unterscheiden sich nicht merklich im physikalisch-chemischen Verhalten und der Antitoxin-Verteilung von den für Tetanusantitoxin angeführten Daten.

Für die wichtigsten in der Tab. 2 zusammengestellten Konstanten werden in den Bildern 2, 3 und 4 die Sedimentations- und Elektrophoresekurven als Beleg für den jeweils erzielten Homogenitätsgrad angeführt.

Zusammenfassend dürfen wir diesem Teil der Untersuchungen entnehmen, daß sich die nativen Diphtherie- und Tetanus-Antitoxine des Pferdes durch präparative Elektrophorese in reine Fractionen vom γ -Globulin- und T-Globulin-Typ aufteilen lassen, von denen der erste zugunsten des zweiten im Verlauf der Immunisierung abnimmt. Die regelmäßig den höchsten Antitoxingehalt aufweisende T-Komponente, die im Normalserum nur in



¹⁷⁾ F. *Haurowitz*: Chemistry and Biology of Proteins; Acad. Press New York 1950, S. 288.

¹⁸⁾ P. v. *Mutzenbecher*, Biochem. Z. 266, 226, 256 [1933]. A. S. *McFarlane*, Biochem. J. 29, 407 [1935]. T. *Svedberg*, Nature [London] 139, 1051 [1937]; derselbe, Ind. Engng. Chem. Analyt. Edit. 10, 113 [1938]. A. M. *Pappenheimer*, H. P. *Lundgren* u. J. W. *Williams*, J. exp. Medicine 71, 247 [1940]. M. L. *Petermann* u. A. M. *Pappenheimer*, J. phys. Chem. 45, 1 [1941]. J. W. *Williams*, R. L. *Baldwin*, W. M. *Saunders* u. Ph. G. *Squire*, J. amer. Chem. Soc. 74, 1542 [1952]. R. A. *Kekwick* u. B. R. *Record*, S. 29. A. *Rothen*, S. 487. H. F. *Deutsch* u. J. C. *Nichols*, E. L. *Smith* u. D. M. *Brown*, S. 241. H. E. *Schulze*, S. 395, 426. H. E. *Schulze* u. Mitarb.¹⁹⁾

geringen Mengen vorhanden und nicht immer nachweisbar ist, nimmt während der Immunisierung auch mengenmäßig stark zu. Die β -Globulin-Fraktion der Pferdeimmunseren läßt sich papierelektrophoretisch nicht rein isolieren. Sie enthält relativ große Mengen T-Komponente und Antitoxin. In der *Tiselius*-Apparatur sind die Antitoxin-haltigen Nativglobuline nicht von normalen γ -, T- und β -Globulinen zu unterscheiden. Wahrscheinlich ist aber das Molekel-

gewicht der Antitoxine vom T-Typ etwas größer als das der Antitoxine vom γ -Typ und der normalen γ -, T- und β -Globuline.

lassen alle Veröffentlichungen über den enzymatischen Abbau antitoxinhaltiger Pferdeseren erkennen, daß — unabhängig von der Fermentart (Trypsin, Pepsin, Papain oder Bromelin) — die Einhaltung schwach saurer Reaktion (p_H 3–4,5) notwendig ist. Pope und Mitarb.²³⁾ haben kürzlich ein p_H von 3,8 als optimal gefunden. Bei stark saurer Reaktion werden die Antitoxine in inaktive Spaltstücke überführt, während in einem mehr nach der alkalischen Seite verschobenen p_H -Bereich die Fermenteinwirkung unerschwerig bleibt. Das unter optimalen Bedingungen angedaute Diphtherie-Serum hinterläßt ein durch die üblichen Fällungsverfahren leicht zu reinigendes Globulin mit

einem gegenüber Nativglobulinen deutlich verminderten Molekelgewicht. In Lösung zeichnet sich das partiell abgebaute Globulin zusätzlich durch eine herabgesetzte Viskosität und eine verringerte Hitzekoagulierbarkeit aus. Der besondere Vorteil der fermentativen Reinigung beruht aber auf der starken Anreicherung des Antitoxins in einer gegenüber Proteinasen unter optimalen Versuchsbedingungen verhältnismäßig resistenten Globulin-Fraktion. Man erreicht im allgemeinen eine 3–5fache Konzentration, wobei zu bemerken ist, daß der jeweils erzielbare Endtiter von der Wertigkeit des Ausgangsserums abhängt, wie wir es zuvor bei der nativen T-Komponente beobachten konnten. Bei der Aufarbeitung partiell abgebauter Immunseren entstehen größere Antitoxin-Verluste als bei der direkten Fraktionierung der nativen Serumproteine. Sie betragen nach Angaben der Literatur etwa 40%, lassen sich aber durch geeignete Modifikationen der Verfahren auf etwa 25% senken. Wir erhielten gelegentlich aus hochwer-

tigen Nativseren partiell abgebaute Antitoxinkonzentrate mit 40000AE/g (Diphtherie) und 60000 IE/g (Tetanus) ohne einen Aktivitätsverlust von 20% zu überschreiten.

Petermann²³⁾ hat gezeigt, daß bei tryptischer Andauung von Diphtherie-Pferde- und -Rinderantitoxin die genuinen Antikörper halbiert werden und daß die Spaltebene normal zur längeren Achse liegt. Da die eine Hälfte dieselbe Aktivität besitzt wie das genuine Globulin und die andere in niedere Abbauprodukte zerlegt wird, müssen die spezifischen Bindungsgruppen auf bestimmte Bezirke der ursprünglichen Antikörpermolekel lokalisiert sein. Haurowitz²⁴⁾ sieht in diesen interessanten, aber noch durch weitere Experimente zu stützenden Befunden ein wichtiges Beispiel für einen univalenten Antikörpertyp.

²³⁾ C. G. Pope u. M. Stevens, Biol. J. exp. Pathol. 32, 314 [1951].
²⁴⁾ M. L. Petermann, J. Amer. chem. Soc. 68, 106 [1946].
²⁵⁾ F. Haurowitz²⁵⁾, S. 290.

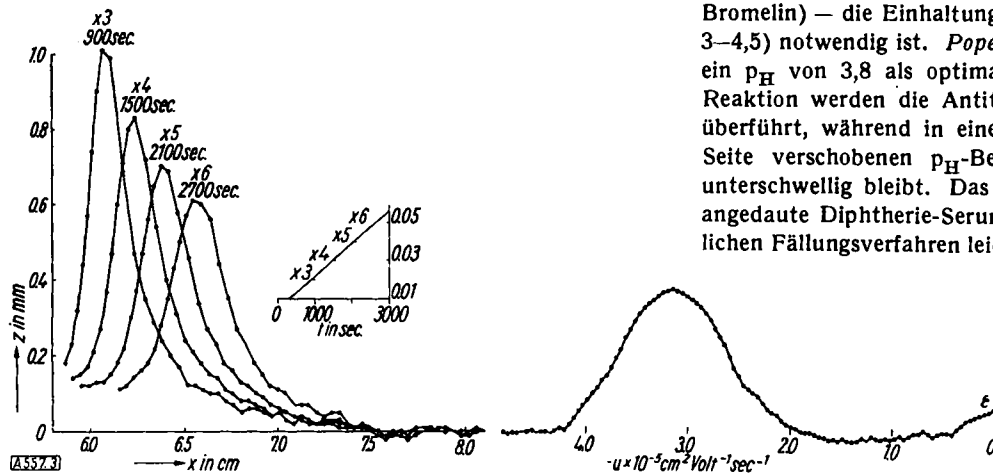


Bild 3.

1 g = 18600 I E Native T-Komponente durch präparative Papierelektrophorese isoliert

Sedimentation in der Ultrazentrifuge;
Lammische Skalenmethode

Phosphatpuffer p_H = 6,8; Proteinkonzentration = 0,8 %;
50000 Umdr./min $S_{20}^{0,8\%}$ = 6,9.

Elektrophorese nach Tiselius; Lammische Skalenmethode

Dole-Puffer p_H 8,6; μ = 0,1; Proteinkonzentration = 1,0 %; 20 m Amp., 220 Volt;
Aufn. nach 150 min, absteigend

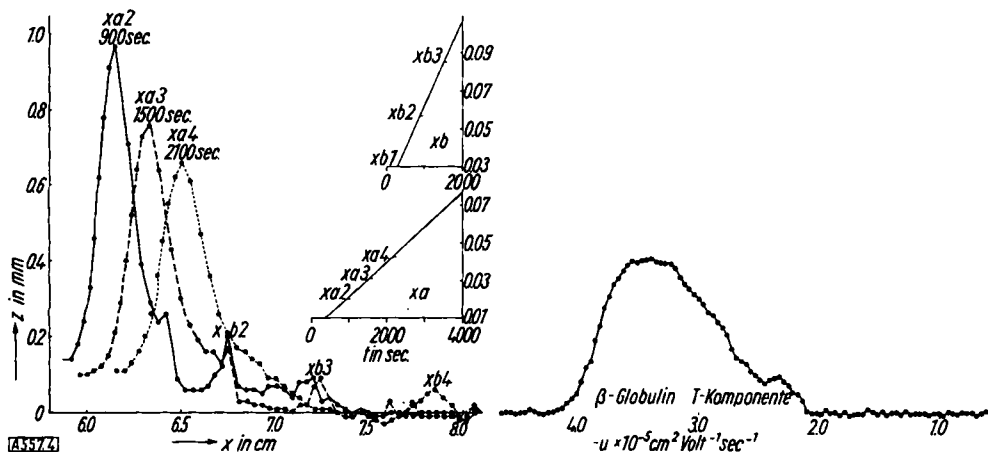


Bild 4.

Tetanus-Antitoxin

1 g = 16600 I E Native β -Globulin-Fraktion durch dreifache präparative Elektrophorese isoliert

Sedimentation in der Ultrazentrifuge;
Lammische Skalenmethode

Phosphatpuffer p_H = 6,8; Proteinkonzentration = 0,8 %; 50000 Umdr./min;
 $S_{20}^{0,8\%}$ = 7,1 (96,5%); $S_{20}^{0,8\%}$ = 18,2 (3,5%)

Elektrophorese nach Tiselius; Lammische Skalenmethode

Dole-Puffer p_H 8,6; μ = 0,1; Proteinkonzentration = 1,0 %; 20 m Amp.; 330 Volt; Aufn. nach 150 min, absteigend

Enzymatisch abgebaute Antitoxine

Schon zu Lebzeiten v. Behrings¹⁹⁾ hat man versucht, antitoxische Immunseren durch Einwirkung proteolytischer Fermente zu reinigen. Sie haben aber erst in den Jahren 1936–40²⁰⁾ zu praktisch verwertbaren Ergebnissen geführt und in Deutschland die Herstellung hochaktiver Antitoxinkonzentrate (Fermoseren-Behringwerke) mit verminderter Artspezifität ermöglicht. Obgleich in der Folgezeit noch zahlreiche Verbesserungsvorschläge²¹⁾ gemacht wurden,

¹⁹⁾ Engl. Pat. 18340, Imray 1902; E. v. Behring¹⁹⁾ S. 253.

²⁰⁾ J. A. Parfentjev, U.S. Pat. 2065196 [1936]; 2123198 [1938].
C. G. Pope, Brit. J. exp. Pathol. 20, 133, 201 [1939].
H. E. Schultze, Biochem. Z. 305, 196 [1940]; 308, 266 [1941].
A. Hansen, ebenda 299, 363 [1938].
F. Modern u. G. Ruff, ebenda 299, 377 [1938].
G. Sandor, C. R. Séances Soc. Biol. 130, 840 [1939]; 131, 461, 1224 [1939].

²¹⁾ P. J. Moloney u. J. N. Hennessy, Canad. Publ. Health J. 1942, 157.
M. L. Petermann, J. biol. Chemistry 144, 607 [1942].
G. Höxter u. D. Decoussan, Memorias d. Inst. Butantan, Sao Paulo 27, 187 [1948].
A. I. Harms, Biochemic J. 42, 390 [1948].
A. Hansen, Acta pathol. microbiol. Scand. 25, 460 [1948].

Pope und Healey²⁶⁾ erhielten bei Diphtherie-Antitoxin einen Reinheitsgrad von 130000 AE/g, wenn sie Pepsin bei p_H 3,5 auf das beim Vermischen äquivalenter Toxin- und Antitoxin-Mengen entstehende Fällungsprodukt (T-A-Flocken) einwirken ließen. Zu etwa derselben Aktivitätsanreicherung gelangte Northrop²⁸⁾ durch Trypsin-Spaltung der ebenfalls zuvor isolierten Toxin-Antitoxin-Verbindung. Seine Beobachtung, daß durch Fraktionierung des Verdauungsansatzes mit Ammonsulfat ein Diphtherie-Antitoxin mit deutlicher Kristallisationstendenz isoliert werden kann, konnten wir bestätigen. Leider mußten wir uns aber bei der Nacharbeitung des Northropschen Verfahrens davon überzeugen, daß der technischen Verwirklichung erhebliche wirtschaftliche Bedenken entgegenstehen.

Physikalisch-chemische Eigenschaften partiell abgebauten Antitoxine

Nach Untersuchungen Rothens²⁷⁾ verhält sich das von Northrop isolierte Diphtherie-Antitoxin mit etwa 130 bis 140000 AE/g in der Ultrazentrifuge homogen und weist eine Sedimentationskonstante von $5,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-13}$ auf, der ein Molekulargewicht von etwa 90000 entspricht. In der Elektrophorese-Apparatur ermittelte Rothen für dasselbe Präparat eine für γ -Globuline charakteristische Wan-

sein Verhalten bei mehrstündiger Tiselius-Elektrophorese gleichfalls typisch für γ -Globulin bei p_H 8,6 ist. β - und T-Globuline, die Hauptträger der Antitoxin-Aktivität der Nativfraktionierung, sind nicht mehr nachweisbar. Nach Erhöhung der Ionenstärke durch Zusatz von $CaCl_2$ zeigt das Tetanus-Antitoxin die von Rothen bei hochgereinigtem Diphtherie-Toxin beobachtete Diffusionsverminderung während der Elektrophorese. Demnach stellen die partiell abgebauten Antitoxine einen physikalisch selbständigen Protein-Typ dar. Ihr gegenüber nativen Antitoxinen vermindertes Molekulargewicht weist darauf hin, daß sie in einer höherpolymeren Form (vorwiegend als T-Komponente) gebildet werden, während die mit dem partiellen Abbau einhergehende Rückverwandlung des nativen T-Globulin-Typs in einen elektrophoretisch weniger beweglichen γ -Globulin-Typ den Schluß erlaubt, daß die stärker negative Ladung des primären T-Globulin-Typs nicht durch spezifische Gruppen der Antitoxine verursacht wird. Da sich partiell abgebaute Antitoxine verschiedener Aktivität und Spezifität bei der Sedimentationsanalyse und der Elektrophorese gleichartig verhalten, ergibt sich als zusammenfassende Schlußfolgerung, daß die klassischen Methoden zur Differenzierung von Proteinen zur Charakterisierung der partiell abgebauten Diphtherie- und Tetanus-Antitoxine vom Pferd nicht ausreichen.

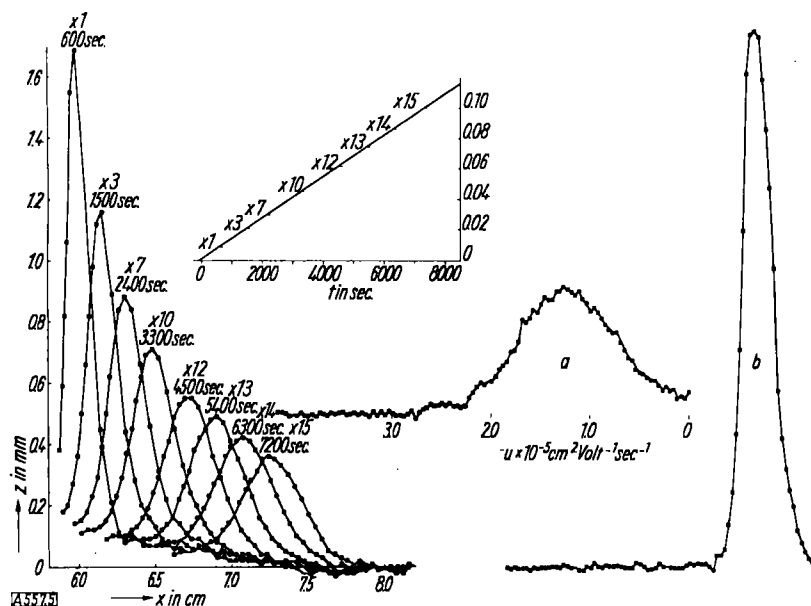


Bild 5

Tetanus-Antitoxin

1 g = 62000 I E Partiiell durch Pepsin hydrolysierte Hauptkomponente nach elektrophoretischer Reinigung

Sedimentation in der Ultrazentrifuge
Lammische Skalenmethode

Phosphatpuffer p_H = 6,8;
Proteinkonzentration = 0,8 %;
50000 Umdr./min; $S_{20}^{0,8\%}$ = 5,4.

Elektrophorese nach Tiselius
Lammische Skalenmethode

a: Dole-Puffer p_H 8,6; μ = 0,1;
20 m Amp.; 323 Volt;
b: Dole-Puffer p_H 8,6; μ = 0,1 mit
 $CaCl_2$ ($c = m/30$) auf μ = 0,25 erhöht;
20 m Amp.; 147 Volt;
Proteinkonzentration = 1,5 %;
Beide Aufnahmen nach 150 min, absteigend

derungsgeschwindigkeit von $u = -0,4 \cdot 10^{-5}$ (m/15 Veronalpuffer, p_H 7,3). Wir fanden²⁸⁾ bei einem direkt aus Serum erhaltenen partiell abgebauten Diphtherie-Antitoxin mit 36000 AE/g ebenfalls eine Sedimentationskonstante von $5,6 \cdot 10^{-13}$ und bei einem entsprechend gewonnenen, durch präparative Papierelektrophorese von geringen β -Globulin-Verunreinigungen befreiten Tetanus-Antitoxin mit 62000 IE/g die gleiche Konstante von $5,4 \cdot 10^{-13}$. Die Einheitlichkeit dieses Präparats belegt Bild 5, welches auch zeigt, daß

²⁶⁾ C. G. Pope u. M. Healey, Brit. J. exp. Pathol. 20, 213 [1939].

²⁷⁾ J. H. Northrop, J. gen. Physiol. 25, 465 [1942].

²⁸⁾ A. Rothen, ebenda 25, 487 [1942].

²⁹⁾ H. E. Schultze, diese Ztschr. 62, 395, 426 [1950].

Immunchemische Eigenschaften nativer und partiell abgebauten Antitoxine

Diphtherie-Antitoxin

Langjährige Erfahrungen haben gezeigt, daß die Diphtherie- und Tetanus-Antitoxine auch nach der Reinigung sich wie artspezifische Vollantigene verhalten. Durch den enzymatischen Abbau kann die Tierspezifität zwar vermindert aber nicht vollständig zum Verschwinden gebracht werden²⁹⁾. Das Flockungsvermögen mit der homologen Toxin-Art wurde bis vor kurzem als spezifisch für die Antitoxine betrachtet, obgleich schon vor vielen Jahren gezeigt werden konnte, daß natives³⁰⁾ und partiell abgebautes³¹⁾ Diphtherie-Antitoxin auch mit nicht toxischen Bestandteilen des Diphtherie-Bazillus ein Präzipitat zu bilden vermag. Die Forderung, daß nichttoxische Antigen-Quoten der zur Immunserumgewinnung benutzten Kulturfiltrate neben den Antitoxinen auch unspezifische Antikörper hervorzurufen vermögen,

die dann ebenfalls an der Flockung teilnehmen, ist in ihrem Ausmaß unterschätzt worden. Überschätzt wurde dagegen die Einheitlichkeit des nach Eaton³²⁾

²⁹⁾ A. J. Weil, J. A. Parfentjev u. K. L. Bowman, J. Immunology 35, 399 [1938]. R. D. Coghill, N. Fell, M. Creighton u. G. Brown, ebenda 39, 207 [1940]. H. G. Arlt, Münchener Med. Wschr. 1940, 696. H. Domrich u. F. Hubert, Zbl. Chirurgie 1940, 14. W. Hellap, ebenda 1943, 200. Ch. Sensi, Med. Klin. 14, 301 [1946]. F. Blittersdorf, Z. ges. inn. Med. 3, 212 [1948]. P. A. Christensen u. J. E. Kerrich, J. Immunology 59, 21 [1948]. P. Hartley, Proc. Roy. Soc. [London] B 138, 499 [1951].

³⁰⁾ H. Schmidt u. W. Scholz, Arch. Hyg. 96, 185, 294 [1925]; Z. Immunforsch. 48, 217 [1926]; 64, 193 [1929].

³¹⁾ H. E. Schultze, Biochem. Z. 308, 383 [1941].

³²⁾ M. D. Eaton, J. Bacteriology 31, 347, 367 [1936].

und Pappenheimer³³) gereinigten Diphtherie-Toxins, das 2170 Flockungseinheiten (Lf) je mg N enthielt. In jüngerer Zeit konnten Pope und Mitarb.³⁴) zeigen, daß ein Toxin von diesem Reinheitsgrad noch eine große Zahl unspezifischer Antigene enthält. Zum Nachweis derselben bedienten sie sich der Methode von Oudin³⁵), bei der man Antigen und Antikörper in Agar (Gelatine) diffundieren läßt und die Zahl der entstandenen Präzipitatabanden bestimmt. Sie fanden im rohen Diphtherie-Toxin mindestens 24 verschiedene Antigene, von denen 15 proteolytisch aktiv waren. Mit fortschreitender Reinigung nimmt die Zahl ab. Gleichzeitig wird die beim direkten Vermischen von Toxin und Antitoxin auftretende, optisch meßbare Flockungszone schmäler und geht in einen Flockungspunkt über. Pope und Mitarb.^{34, 40}) sehen daher in der Tatsache, daß Healey und Pinfield³⁶) sowie Pappenheimer und Robinson³⁷) für das bisher reinste Diphtherie-Toxin (2200 Lf/mg N) und das ebenfalls als rein betrachtete partiell abgebaute Diphtherie-Antitoxin mit 135000 AE/g eine breite Flockungszone fanden, einen Beweis für die unzulängliche Reinheit. Diese Kritik, die nicht unwidersprochen blieb³⁸) konnte inzwischen von Pope und Stevens³⁹) dadurch gestützt werden, daß ihnen die Isolierung eines kristallisierenden Proteins aus rohem Diphtherie-Toxin glückte, das nach Beseitigung amorpher Anteile nur eine einzige Antigen-Antikörperbande im Diffusionstest ergab und etwa 3300 Lf je mg N enthielt.

- ³³) A. M. Pappenheimer, J. biol. Chemistry 120, 543 [1937]; vgl. auch M. Eisler, W. Auerwald u. H. Eibl, Wien. Klin. Wschr. 65, 768 [1953].
³⁴) C. G. Pope, M. S. Stevens, E. A. Caspary u. E. L. Fenton, Brit. J. exper. Pathol. 32, 246 [1951].
³⁵) J. Oudin, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 222, 115 [1946]; Bull. Soc. chim. biol. 29, 140 [1947]; Ann. Inst. Pasteur 75, 30, 109 [1948]; C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 228, 1890 [1949]. S. D. Elek, Brit. Med. J. 1948, I, 493. Ö. Ouchterlony, Acta pathol. microbiol. Scand. 25, 186 [1948]; Ark. f. Keml 7, 55 [1950]. J. Munoz u. E. L. Becker, J. Immunology 65, 47 [1950]. E. L. Becker, J. Munoz, C. Lapresle u. L. J. Le Beau, ebenda 67, 501 [1951]. H. Bowen, J. Immunology 68, 429 [1952]. C. L. Oakley u. A. J. Fulthorpe, J. Pathol. Bacteriology 65, 49 [1953]. E. L. Becker, Fed. Proc. 12, 717 [1953]; B. V. Jager, ebenda S. 723. H. F. Deutsch, ebenda S. 729. W. H. Teifer, ebenda S. 734.
³⁶) M. Healey u. S. Pinfield, Brit. J. exp. Pathol. 16, 535 [1935].
³⁷) A. M. Pappenheimer u. E. S. Robinson, J. Immunology 32, 291 [1937].
³⁸) H. E. Bowen, B. Polley u. J. Huang, ebenda 72, 112 [1954].
³⁹) C. G. Pope u. M. F. Stevens, Lancet 265, 1190 [1953].

Durch die verfeinerte immunchemische Diagnostik hat auch die Reinigung des Diphtherie-Antitoxins neuen Auftrieb bekommen. Pope und Stevens⁴⁰) beschäftigen sich z. Zt. damit, partiell abgebautes Diphtherie-Antitoxin durch Absorption an toxinfreie Bestandteile der Diphtherie-Bazillen oder ihrer Kulturfiltrate möglichst weitgehend von nicht-antitoxischen Antikörpern zu befreien. Sie haben bereits ein Antitoxin mit 211000 AE/g gewinnen können, das aber bezüglich seines immunchemischen Reinheitsgrades noch nicht voll befriedigt.

Tetanus-Antitoxin

Wir haben das Diffusionsverfahren in der von Pope beschriebenen Technik zur Antikörperdifferenzierung des Tetanus-Antitoxins benutzt, das bekanntlich mit Tetanustoxin unter Bildung einer spezifischen T-A-Flockung und einer von Ramon⁴¹) näher untersuchten Pseudoflockung reagiert. Da wir schon früher⁴²) eine Antigelatinease als Bestandteil der spezifischen Flockung nachweisen konnten und mit dem Vorkommen nicht-antitoxischer Geißelantikörper⁴³) in der Pseudoflockung rechnen mußten, haben wir eine Vielzahl von Präzipitatabanden erwartet. Tatsächlich haben wir in 12tägigem Diffusionsversuch bei 4–6 °C in der über den Antitoxin-Lösungen (gleichmäßig 500 IE in 1 cm³ 2proz. Gelatinelösung) befindlichen Gelatineschicht (2proz.), die mit 1 cm³ eines rohen, durch Ultrafiltration konzentrierten Tetanustoxins (DL_m Maus-0,0000004) bedeckt wurde, bis zu 8 Flockungszonen festgestellt. Die Bilder 6–10 veranschaulichen die Antigen-Antikörperreaktion bei den früher beschriebenen elektrophoretisch gereinigten Tetanus-Immunglobulinen.

Die Aufnahmen der Diffusionsansätze lassen bei allen Immunglobulinen mindestens ein starkes Präzipitataband erkennen, das wir auf die spezifische Toxin-Antitoxin-Verbindung zurückführen. Die jeweils verschiedene Zahl zusätzlicher Banden ist für die unspezifischen Antikörper

- ⁴⁰) C. G. Pope u. M. F. Stevens, Brit. J. exp. Pathol. 34, 241 [1953].
⁴¹) G. Ramon, Rev. Immunol. Thérap. antimicrobienne 6, 73 [1940]; vgl. H. Schmidt: Grundlagen d. spez. Therapie, B. Schultz-Verlag, Berlin 1940.
⁴²) H. E. Schultze, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 274, 157 [1942].
⁴³) A.-R. Prévot, C. R. Séances Soc. Biol. 127, 1166 [1938].

Nachweis der Antikörper in nativen und partiell abgebauten Tetanusantitoxinen*)

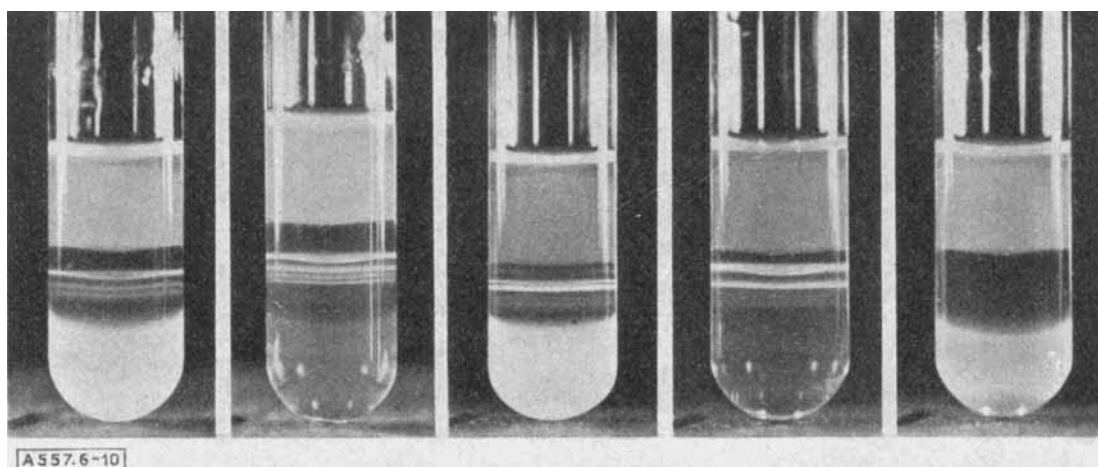


Bild 6.
β-Globulin
(16600 IE/g)
1 × stark
2 × schwach
1 × sehr schwach

Bild 7.
T-Globulin
(18600 IE/g)
Zahl und Stärke der Antigen-Antikörperpräzipitate in der Gelatineschicht
2 × stark
2 × schwach

Bild 8.
γ-Globulin
(6250 IE/g)
2 × stark
6 × sehr schwach

Bild 9.
Partielles Abbauprodukt
(62000 IE/g)
1 × stark
1 × mittelstark
2 × schwach

Bild 10.
T-Globulin
(Normalpferd)
—
—

*) Die immunchemischen Untersuchungen hat G. Schwick, Behringwerke, ausgeführt.

der Tetanus-Antitoxinpräparate vom Pferd charakteristisch. Die Aussichten für ihre Entfernung durch immunchemische Absorptionsverfahren sind bei dem partiell abgebauten Tetanus-Antitoxin am günstigsten, weil in ihm trotz starker Anreicherung der spezifischen Aktivität nur noch 4 von 8 in der nativen γ -Globulin-Fraktion sichtbaren Banden auftreten, von denen die unteren beiden erst sehr spät durch Aufteilung eines anfänglich gemeinsamen Bandes entstanden sind.

Im klassischen Flockungsversuch mit abgestuften Mengen partiell hydrolysierten Tetanusantitoxins beobachteten *Cinader und Weitz*¹⁴⁾ maximal 5 Flockungsmaxima. Wir bedienten uns zum Nachweis der einzelnen Flockungsreaktionen von abgebautem Antitoxin und rohem, durch Ultrafiltration angereichertem Tetanustoxin eines optischen Verfahrens, das auf der UV-Absorption der in verdünnter Natronlauge aufgenommenen Präzipitate beruht. Wie Bild 11 zeigt, werden mit dieser Methode ebenfalls 5 Flockungsoptima registriert und im Bereich sehr hoher Antitoxin-Konzentrationen eine weitere Aufteilung angedeutet.

Es bleibt nun noch zu untersuchen, ob die unspezifischen Begleitantikörper des durch Abbau vorgereinigten Tetanus-Antitoxins als Immunpräzipitate entfernt werden können oder ob sich durch Aufspaltung der spezifischen T-A-Flockung — unter Umständen unter Verwendung des inzwischen kristallin erhaltenen Tetanustoxins⁴⁴⁾ — reinstes Tetanus-Antitoxin gewinnen läßt, für das *Moloney und Hennessy*²¹⁾ auf Grund von N-Analysen des spezifischen Präzipitats eine Aktivität von etwa 286000 IE/g (0,0005mg N für 1 IE) errechneten.

Wenn es somit noch nicht möglich ist, zum 100. Geburtstage von *Behrings* über die geglückte Reindarstellung der von ihm entdeckten Diphtherie- oder Tetanus-Antitoxine

⁴⁴⁾ L. Pillemer, J. E. Burrell u. D. B. Grossberg, J. exp. Medicine 88, 205 [1948].

zu berichten, so zeichnet sich doch nun der Weg ab, der vielleicht schon in Kürze zu reinsten Antitoxinen führen wird. Dieser Weg ist, insbesondere wegen der Einbeziehung immunchemischer Methoden, bisher in der präparativen

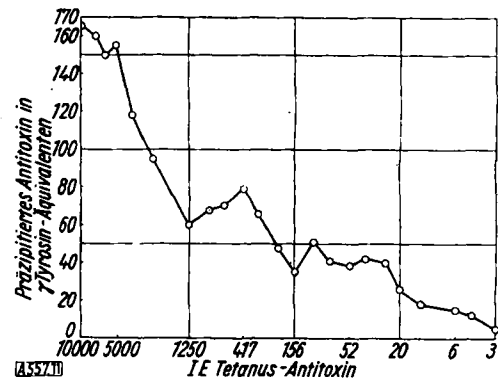


Bild 11

Spezifische und unspezifische Flockungen des partiell abgebauten Tetanusantitoxins

Je 0,5 cm³ Antitoxin in fortlaufender Verdünnung + 0,5 cm³ rohes Tetanustoxin, durch Ultrafiltration (DL_m Maus = 0,0000016) angereichert — 1,5 h bei 45 °C im Wasserbad und 1 h im Kühlschrank bei + 4 °C — Zentrifugiert, Präzipitat 2mal mit kalter physiol. NaCl-Lsg. pH 7,0 gewaschen und in 0,1 cm³ 1 n NaOH gelöst — Nach Auffüllen mit dest. Wasser auf 3 cm³ wurden die Ansätze im Zeiß-Opton-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 285 mμ gemessen. Die Meßwerte wurden zu den einer Eichkurve entnommenen Tyrosin-Äquivalenten in Beziehung gesetzt.

Chemie noch nicht besprochen worden. Es ist zu hoffen, daß er zu Produkten führen wird, bei denen sich die Anwendung moderner chemischer Methoden zur Aufklärung des Aminosäure-Aufbaus⁴⁵⁾ und aussichtsreicher optischer Verfahren zur Strukturanalyse lohnen wird.

Eingeg. am 22. Februar 1954 [A 557]

⁴⁵⁾ E. L. Smith, R. D. Greene u. E. Bartner, J. biol. Chemistry 164, 359 [1946], E. L. Smith u. R. D. Greene, ebenda 167, 679 [1947]; 171, 355 [1947].

Bildung, Messung und Dauer der Antikörper nach Immunisierung von Menschen

Von Prof. Dr. M. HEIDELBERGER, New York*)

Antikörper sind modifizierte Globuline. Über ihre Entstehung gibt es zwei Theorien, die einander nicht ausschließen. Neue Methoden zur Gewichtsbestimmung zeigten, daß der Verlauf der Antikörperbildung gegen Pneumokokken-Polysaccharide ein anderer ist als gegen die Eiweißkörper des Diphtherie-Toxins oder Diphtherie-Toxoids.

Die enorme Leistung v. *Behrings*, den wir heute feiern, kam zu einer Zeit, bevor die Kunst und Technik der Biochemie sich weit genug entwickelt hatten, um irgendwelche Auskunft zu geben über die chemische Natur des von ihm entdeckten und so erfolgreich angewandten Antitoxins. Obschon wir heute in dieser Richtung weitergekommen sind, gibt es jedoch keine direkten experimentellen Grundlagen für die beiden Theorien über den Mechanismus der Entstehung der Antikörper im tierischen Körper, trotz des großen Interesses dieser Frage seit den bahnbrechenden Tagen von *Ehrlich*, *Behring*, *Bordet*, *Dungern* und vielen anderen. Nach der Theorie von *Breinl-Haurowitz-Mudd-Alexander-Pauling*¹⁾ dringt das Antigen zur Stelle der Globulin-Synthese vor, um dort den Prozeß so zu stören, daß die veränderten Globu-

line nachher befähigt sind, immer wieder sich mit dem Antigen zu vereinigen. Nach der Theorie von *Burnet*¹⁾ dagegen ist die Antigenwirkung eine indirekte, nicht auf die Globuline selbst, sondern eine Umschaltung der Enzyme der Globulinsynthese oder der „Gitter“ für den Aufbau der Globuline. Nachdem dieser Prozeß sich einmal entwickelt hat, ist das Antigen nicht mehr nötig. Diese Theorie hat den Vorteil, die schnelle und starke Antikörperbildung nach einer kleinen sekundären Antigen-Zugabe zu erklären. Beschäftigen wir uns jetzt mit der Frage, ob diese Theorien fähig sind, die Vorgänge nach der Injektion beim Menschen von Antigenen sowie des Diphtherietoxoids und der typenspezifischen Polysaccharide der Pneumokokken klar zu stellen.

Bis etwa 1930 waren alle Antikörpermessungen stets relativ. Die Mengen wurden daher entweder als Verdünnungsendpunkte ausgedrückt oder als willkürliche Einheiten auf einen Standard bezogen. Da man nichts wußte über die chemische Natur der Antikörper und da

*) Vortrag anläßlich der Verleihung des *Behring*-Preises am 15. März 1954 in Marburg-Lahn.

¹⁾ Zusammenfassung in: The Nature and Significance of the Antibody Response, A. M. Pappenheimer Jr., Columbia University Press, New York, 1953.