

gut verständlich. Da unser Cumarin-imid schwächer basisch ist als die Glykosylamine, versteht man auch, daß unsere Maxima der Hydrolysegeschwindigkeiten erst bei viel höherer Säurekonzentration in Erscheinung treten ( $-\log[\text{HCl}] = 2$  bzw. 0,8, Bild 5 bzw. 7) als bei Isbell und Frush ( $p_{\text{H}} 5$ ). Man beachte, daß bei Isbell und Frush die

Imonium-Ionen hypothetisch sind, während sie bei uns in Form des Imid-hydrochlorids  $\text{A}_{11}$  kristallisiert vorliegen. Die zu beiden Seiten des Atlantik an recht verschiedenen Stoff-Systemen entwickelten Vorstellungen stützen und ergänzen sich somit wechselseitig.

Eingegangen am 13. April 1957

[A 808]

## Induzierter Funktionswandel von Proteinen in Biologie und Medizin

Von Prof. Dr. M. G. SEVAG\*)

Department of Microbiology, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia (USA)

Dedicated to Professor Heinrich Wieland, an inspiring teacher and friend, a pioneer and idealist, as I have known him. M. G. Sevag

Diese Übersicht behandelt Proteine und Nucleinsäuren, Bausteine von hereditären Einheiten, als vielfach wandelbare Körper infolge von Reaktionen mit Fremdstoffen wie Toxinen, Proteinen, Arzneimitteln, Strahlen usw. Diese Umwandlungen werden als Ursachen von anormalem Zellstoffwechsel im Sinne von krankhaften Zuständen, Überempfindlichkeit, Allergie, Sucht, Arzneimittelresistenz, pathologischem Wachstum, Mutationen, genetischen Blocks usw. angesehen. Strukturelle Veränderungen können durch Einwirkung artfremder, antigen-wirksamer, natürlicher wie künstlicher Eiweißkörper auf die normale Globulin-Synthese unter Antikörper-Bildung erzeugt werden. Derartige Vorgänge werden als Modell entsprechender Veränderungen von Gewebeproteinen und unizellulären Systemen diskutiert. Verschiedene Theorien werden vom chemischen und enzymatischen Gesichtspunkt aus betrachtet. Es wird der Schluß gezogen, daß Antigene in Konjugation mit Globulin-bildenden Zellen als Biokatalysatoren wirksam sind. Weiter wird gezeigt, daß gebildete Antikörper-Molekeln als spezifische Inhibitoren von biologischen Funktionen der verantwortlichen antigenen Proteine reagieren. Da Eiweiß-Substanzen, wenn sie als Antikörper-Bildner in ihren Mutterzellen wirksam würden, die Synthese von spezifisch hemmenden Antikörpern stimulieren und damit den Zelltod verursachen würden, wird die Antigeneigenschaft von Proteinen als artfremdes Verhalten betrachtet. Da weiterhin eine Antigeneigenschaft nur in einem artfremden multizellulären lebenden System manifest wird, kann sie nicht als eine native Charakteristik betrachtet werden, sondern als ein von außen herrührendes Verhalten sowie eine Auswirkung einer anderen genetisch determinierten Charakteristik eines Proteins. Antigen-Spezifität sowie biokatalytische Spezifität werden auf die gleichen Zentren zurückgeführt. Nur auf dieser Grundlage können gleichwertige Spezifitäten, die Neutralisation der biologischen Wirksamkeiten von Proteinen, der Konkurrenzantagonismus zwischen spezifischen Substraten und Antikörpern sowie der Mechanismus des Immunschutzes gegenüber infektiös wirksamen Stoffen erklärt werden. Hochgereinigte und mehrfach umkristallisierte Proteinpräparationen bestehen, wie man heute weiß, aus mikro-heterogenen Molekelpopulationen. Die Gründe für dieses Verhalten sind nicht bekannt. Gleichfalls können bekanntlich mehrfach umkristallisierte Enzyme multi-katalytische Funktionen entwickeln. Die möglichen Ursachen für diese Zusammenhänge werden diskutiert. Es ist zu hoffen, daß Physik, Chemie und Biologie die Rätsel der Protein-Molekel lösen werden.

Einleitung. — Antikörper-Globuline als Beispiele für den Strukturwandel von Proteinen. — Mechanismus des Strukturwandels der Globulin-Molekel. — Antikörper-Synthese und adaptive Enzym-Bildung. — Vorgänge bei der Induktion der Antikörper-Bildung durch Antigene. — Wie beeinflusst ein Antigen die Globulin-Synthese, so daß spezifisches Antikörper-Globulin gebildet wird? — Kritik der Einwände gegen die Auffassung von den Antigenen als Co-Katalysatoren. — Energetische Grundlagen der Antikörper-Synthese. — Wie wirken haptene Gruppen als Co-Katalysatoren? — Über die Parallelität von Antigen-Wirkung und enzymatischen Funktionen. — Ursachen und Auswirkungen von An-

tigen-Eigenschaften. — Über die Einheitlichkeit der Zentren von antigenen und enzymatischen Spezifitäten. — Größe der determinanten oder katalytischen Zentren von spezifischen Protein- und Enzym-Funktionen. — Aktivierungszustände von katalytischen Zentren und aktiven Gruppen. — Grundlage der serologischen Kreuzreaktion zwischen künstlichen Antigenen gleicher haptener Gruppen im Gegensatz zur Abwesenheit von Kreuzreaktionen zwischen Enzymen mit gleicher aktiver Gruppe oder gleichen Coenzymen. — Heterogenität der Molekel-Population innerhalb einer molekularen Art. — Multikatalytische Funktionen von Enzymen. — Zusammenfassende Bemerkung. — Summary. — Literatur.

### Einleitung

Emil Fischer berechnete 1923, daß 30 Aminosäuren von achtzehn verschiedenen Arten  $1,28 \cdot 10^{27}$  Protein-Isomere bzw. daß zwanzig der natürlichen bekannten Aminosäuren  $2,4 \cdot 10^{18}$  Isomere bilden können. Bedenkt man die Möglichkeiten des Auftretens einer oder mehrerer tautomerer Formen einer jeden Molekel, so können noch weitere Isomere existieren. Die Anzahl der Isomeren kann schließlich weiter gesteigert werden, wenn man die zusätzlichen molekularen Strukturen, die durch intramolekulare räumliche Umla-

gerung und Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen können, mit in Betracht zieht. Man kann sich vorstellen, daß derartige molekulare Varianten unter normalen dynamischen physiologischen Bedingungen, wie sie innerhalb lebender, proteinbildender Zellen existieren, auftreten. In Zusammenhang hiermit steht die Tatsache, daß anormale oder umgebaute neue Proteine unter dem Einfluß von fremden toxischen oder nicht-toxischen Substanzen von Eiweiß- oder Nichteiweißnatur entstehen können, die die lebende Zelle nicht zerstören oder unmittelbar eliminieren kann. Derartige Umbauvorgänge an genetisch determinierten Proteinen werden allgemein als sekundärer Ausdruck von primären Veränderungen der Desoxyribonucleinsäure-

\*) Die Arbeit wurde durch einen Vertrag mit dem Office of Naval Research, Department of the Navy, und die Universität von Pennsylvania unterstützt.

fixierten genetischen Matrix betrachtet. Man nimmt an, daß derartige Veränderungen die Bildung von neuen Stämmen und Zellmutanten induzieren, die sich voneinander biochemisch und genetisch unterscheiden, sowie von Zellvarianten, die durch Überempfindlichkeit oder Resistenz gegenüber verschiedenen toxischen Agentien charakterisiert sind. Veränderungen von Proteinen könnten schließlich in Überempfindlichkeitszuständen von lebenden Zellen als Folge von Reaktionen mit Substanzen wie Penicillin, Sulfonamiden, Aspirin, Chinin, Arsen, Chrom, Nickel, Phenolen, Pollen, Formaldehyd, Farbstoffen, Strahlen usw. zum Ausdruck kommen. Solche Überempfindlichkeitszustände können verdeckt oder latent vorhanden sein und schließlich manifest werden, sobald die wirksamen Stoffe erneut mit den sensibilisierten Zellen in Kontakt kommen (weitere Diskussionen s. *Sevag*, *Reid* und *Reynolds*, 1955, sowie *Sevag* 1956).

Bekanntlich bilden Substanzen entgegengesetzter Affinität Reaktionsprodukte, die sich grundsätzlich von den primären Reaktionspartnern unterscheiden. Solche Reaktionen sind jeweils mehr oder weniger reversibel. In lebenden Zellen sind vor allem die funktionellen Nucleinsäuren und Eiweißkörper Substrate solcher Umsetzungen. Vitaminmangelzustände, hormonelle Störungen, allergische Zustände, pathologische Stoffwechselsituationen und chronische Erkrankungen können auf veränderten Strukturen von Zellproteinen beruhen. In diesem Zusammenhang ist besonders das Fortdauern der pathologischen Stoffwechselsituationen von Bedeutung, was mit einschließt, daß die Mechanismen der Selbstreduplikation, die für die Synthese von normalen oder veränderten Eiweißkörpern verantwortlich zu machen sind, selbst reversibel oder irreversibel geschädigt sind.

### Antikörper-Globuline als Beispiele für den Strukturwandel von Proteinen

Vor 65 Jahren haben *Behring* und *Kitasato* zum ersten Male gezeigt, daß Blut von infizierten Tieren spezifische antiinfektiöse und antitoxische neue Verbindungen enthält, die heute als Antitoxine, Antikörper, Präzipitine, Agglutinine usw. bekannt und als strukturveränderte Globuline charakterisiert sind. Eiweißkörper verschiedener Herkunft, wie Antigene, Toxine usw., haben die Fähigkeit, in artspezifisch verschiedenen Tieren die Synthese von strukturell veränderten Globulinen oder Antikörpern zu induzieren. Die Antikörper reagieren hochspezifisch allein mit den induzierenden Stoffen.

Kaninchenserum-Albumin führt in artfremden Tieren zur Synthese eines Antikörpers, welches seinerseits mit Kaninchen-Albumin, jedoch nicht mit menschlichen oder anderen Albuminen reagiert. Weiter pflüpft jede molekulare Art der verschiedenen Zellproteine während ihrer Synthese ihre individuelle Spezifität auf die Globulin-Molekeln auf. So führen  $\alpha$ -Glycerophosphatase (*Sevag* und Mitarb. 1954), Hexokinase (*Miller* und Mitarb. 1949), Carboxylase (*Pasternak* und Mitarb. 1951) u. a. m., die von einer gegebenen Hefezelle isoliert wurden, zur Synthese von Antikörpern, die jeweils spezifisch für das einzelne Enzym sind. Immunologisch finden sich keine Beziehungen untereinander, wenn sie auch von derselben Hefe isoliert wurden und man annehmen muß, daß sie unter dem Einfluß des Genbestandes derselben Hefe synthetisiert werden. Antikörper, die in einem Tier z. B. gegen Hefe-hexokinase gebildet wurden reagieren nicht mit Rattenhirn-hexokinase. Eine Reihe von Enzymen mit jeweils einer SH-Gruppe als gemeinsame reaktiver Gruppe von artverschiedener Herkunft und ähnlicher Spezifität produziert Antikörper, welche jeweils

spezifisch für je ein Enzym sind und sich serologisch gegenseitig ausschließen. Diese Befunde zeigen, daß die Ähnlichkeit der enzymatischen Funktionen oder die Anwesenheit einer gemeinsamen reaktiven Gruppe in verschiedenen Enzymen nicht zur Synthese von Antikörpern führt, die eine gemeinsame oder Kreuzungsreaktivität besitzen. Daraus würde sich ergeben, daß die molekulare Eigenart, unabhängig von der Identität ihrer Quelle und den gemeinsamen reaktiven Gruppen im Hinblick auf ihre enzymatischen und antigenen Funktionen auf die räumlichen Spezifitäten ihrer katalytischen Zentren gegründet ist. Beide Spezifitäten in einer einzigen Protein-Molekel könnten, wie weiter unten diskutiert wird, von einem gemeinsamen Zentrum herrühren.

Außer den zahlreichen feinen charakteristischen Unterschieden einfacher oder konjugierter nativer Proteine und Enzyme gibt es zahllose Möglichkeiten für künstliche Azo-Proteine, Nitro- und Jod-Proteine, von denen jedes die Synthese eines oder mehrerer spezifischer Antikörper einleiten kann. Es ist damit möglich, die Konfiguration einer Globulin-Molekel auf so verschiedene Arten zu verändern, wie es Proteinarten und künstliche Azoprotein-Derivate gibt. In diesem Zusammenhang sind auch die möglichen Veränderungen der Gewebseiweißkörper, die der Synthese von Antikörpern vorangehen, von Interesse. Experimentelle Befunde zeigen, daß die Antikörperbildung der Entwicklung eines grundlegenden Ablaufs der Überempfindlichkeit sekundär folgt, der eine viel längere Zeitperiode braucht, als die Periode der Antikörperbildung dauert. Weiter ist die Frage nach dem Grad der Überempfindlichkeit oder Veränderung von Gewebseiweißkörpern und der Menge der pathologischen Reaktionsprodukte, mit denen der Stoffwechsel des Wirtsorganismus befallen und beeinflusst wird, von größtem medizinischem Interesse. Von diesem Gesichtspunkt aus müssen auch Antikörper, Reagin u. a. m. als pathologische oder potentiell toxische Produkte, die anaphylaktische Gewebsschäden verursachen können, angesehen werden (*Sevag*, 1956).

Kein Umbaumechanismus von Eiweißkörpern ist so ausführlich studiert worden wie die zur Bildung spezifischer Antikörper führende Synthese von Globulinen. Damit ist eine einmalige Gelegenheit gegeben, die verschiedenen Bedingungen dieser Strukturwandlung als passendes Modell für andere Typen von Veränderungen unter dem Einfluß verschiedener Fremdstoffen zu studieren.

### Mechanismus des Strukturwandels der Globulin-Molekel

Voraussetzung des Umbaus von Globulin-Molekeln zu Antikörpern ist die Anwesenheit des induzierenden antigenen Eiweißkörpers oder seiner Derivate an dem Orte der Globulin-Synthese. Außerdem muß der entstandene Antikörper-Globulin-Komplex weiterhin die Artspezifität des normalen Globulins in sich tragen. Das antigene Fremdprotein kann nicht als solches die Synthese des Antikörper-Globulins steuern. Eine Theorie des Mechanismus der Synthese von Antikörper-Globulinen muß daher ein Zusammenwirken von Globulin-synthetisierendem Enzymsystem und Fremdprotein berücksichtigen. So könnte das Fremdprotein seine spezifische Konfiguration der Globulin-Molekel während ihrer Synthese mit dem Ergebnis einer Antikörper-Globulin-Produktion einprägen oder induzieren.

Die Frage, ob ein Fremdprotein unter diesen Bedingungen eine vollgebildete Globulin-Molekel in eine Antikörper-Molekel umwandeln kann, ist von verschiedenen Seiten auf-

geworfen worden. *Pauling* (1940) hat als Ausgangspunkt ein voll-synthetisiertes „precursor“-Polypeptid vorgeschlagen, welches unter normalen Bedingungen in Globuline, unter dem Einfluß von Antigenen jedoch in Antikörper-Globulin umgebaut wird.

Gegen diese Vorstellung sind von verschiedenen Seiten Einwände erhoben worden. So haben *Green* und *Anker* (1954) mit Hilfe von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glykokoll festgestellt, daß der  $^{14}\text{C}$ -Gehalt von Anti-Ovalbumin-Antikörpern niedriger ist, als der  $^{14}\text{C}$ -Gehalt von Serum-Globulin. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß das Antikörper-Glykokoll eher aus dem Vorrat an freien Aminosäuren als aus dem bereits gebundenen, im normalen Serum-Globulin oder seinem unmittelbaren precursor-Polypeptid eingebauten Glykokoll herrührt. Dies würde jedoch bedeuten, daß der Antikörper aus einzelnen Aminosäuren unter dem Einfluß von Ovalbumin synthetisiert wurde. In Untersuchungen über den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glykokoll, L-Valin und  $^{35}\text{S}$ -Methionin in verschiedene chromatographische Fraktionen von Kaninchen- $\gamma$ -Globulin konnten *Porter* und seine Mitarbeiter (*Askonas*, *Humphrey* und *Porter* 1956) keinen Hinweis auf eine Umwandlung einer  $\gamma$ -Globulin-Form in eine andere oder von  $\gamma$ -Globulin in Antikörper im Kreislauf finden. In-vitro-Experimente haben gezeigt, daß Aminosäuren mit verschiedener Geschwindigkeit in unterschiedliche  $\gamma$ -Globulin-Fractionen eingebaut werden. *Gross* und seine Mitarbeiter (1952) kamen in ähnlichen Experimenten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Valin zu gleichartigen Ergebnissen. Bei der Diskussion verschiedener anderer Untersuchungen konnten wir (*Sevag* 1951) vor einiger Zeit darauf hinweisen, daß präformiertes normales Globulin kein Vorläufer von Antikörpern zu sein scheint.

Nach Ansicht von *Breml* und *Haurowitz* (1930) besitzen die Zellen, welche Globulin-Molekeln synthetisieren, spezifische Oberflächengruppen mit Restvalenzen. Diese sollen die bei der Globulin-Bildung beteiligten Aminosäuren jeweils anziehen oder abstoßen. Sobald sich ein Antigen mit diesen Oberflächen verbindet, kommt es zur Bildung eines neuen Zell-Antigen-Komplexes mit neuen Gruppen von Restvalenzen, welche Aminosäuren zur Bildung von Antikörper-Globulin orientieren. *Mudd* (1932) ist der Meinung, daß die Synthese von Antikörpern durch Bildung von Peptid-Bindungen in einem räumlich besonders orientierten Spalt zwischen Antigenen und Protoplasma vor sich geht. Die chemischen Gruppierungen, die mit der in Bildung begriffenen Molekel an der Antigen-Oberfläche verbunden sind, sollen räumlich adaptiert werden. Damit wird ein Antikörper gebildet, der in spezifisch-stereochemischer Weise mit dem Antigen korrespondiert. *Alexander* (1932) vertrat die Ansicht, daß das Antigen innerhalb der Globulin-bildenden Zellen selbst neue spezifische Katalysatoren bildet, die direkt die Bildung von Antikörpern zu steuern vermögen. Diese Vorstellungen scheinen durch immunologische Befunde gestützt zu werden. Neuere Untersuchungen von *Taliaferro* und *Talmadge* (1955) scheinen schließlich weiter die Anschauungen zu unterbauen, daß ein Zellen-Antigenkomplex (*Breml* und *Haurowitz*, 1930) oder ein Antigen-Protoplasma gebildet werden (*Mudd*, 1932), oder daß das Antigen einen neuen spezifischen Katalysator innerhalb der Globulin-bildenden Zellen (*Alexander*, 1932) bildet, bevor die Synthese von Antikörper-Globulinen beginnt. *Taliaferro* und *Talmadge* fanden, daß  $^{35}\text{S}$ -enthaltende Aminosäuren in präzipitierenden Antikörpern (gegen Rinderserumalbumin) während des Anstieges der Serum-Antikörper eingebaut werden und nicht bereits während der dreitägigen Induktionsperiode nach der Injektion des Antigens. Dieser Befund wird von den Autoren in der

Weise erklärt, daß die Induktionsperiode mit der Bildung eines Antikörper-synthetisierenden Enzymkomplexes zusammenhängt und weniger mit einem Aminosäure-haltigen Antikörper-„precursor“. Blaufarbte Antigene (Azofarbstoffe mit Rinder- $\gamma$ -globulin und Menschenalbumin) werden nach *McMaster*, *Kruse*, *Sturm* und *Edwards* (1954) in den reticulo-endothelialen Elementen von Leber, Milz und den mesenterialen Lymphknoten für längere Zeit gespeichert. Die Speicherdauer beträgt für Azo-globulin 85–120 Tage, für Azo-albumin 36–44 Tage. Damit liegen genügend Unterlagen für die Vorstellung vor, daß antigene Substanzen zusammen mit dem Globulin-bildenden protoplasmatischen Milieu ein neues Enzymsystem für die Synthese von spezifischen Antikörper-Molekeln bilden. Die Wirkung von Fremdproteinen auf die spezifischen empfindlichen Rezeptoren des Wirts kann damit zur Schädigung und Restitution, zu chemischem Umbau und schließlich zur Bildung eines aktiven Komplexes unter Kupplung mit dem Wirt-Enzym-System, aus dem die Synthese von veränderten Globulinen oder Antikörpern hervorgeht (*Sevag*, 1956), führen.

### Antikörper-Synthese und adaptive Enzym-Bildung

Die Theorie von *Burnet* und Mitarbeitern (*Burnet*, 1941; *Burnet* und *Fenner*, 1949) postuliert:

- a) Bestimmte Enzyme im Körper zerstören fremde antigen-wirksame Eiweißkörper und entwickeln durch „Training“ die spezifische Eigenschaft, Antikörper autokatalytisch als Kopien zu synthetisieren;
- b) die Synthese der neugebildeten Enzyme ist vererbbar.
- c) Die Antikörperproduktion hält auch, nachdem das verantwortliche Antigen den Körper verlassen hat, an und verursacht damit eine lebenslängliche Immunität gegenüber Virusinfektionen.

#### Bemerkungen:

1. Haptene Gruppen von künstlichen Antigenen oder Kapseln gewisser Bakterien, Polysaccharide von Pneumokokken, D-Glutaminsäure-Polypeptide von Anthrax-Bazillus usw. haben keine Ähnlichkeit mit Bestandteilen des Körpers; außerdem gibt es keine Beweise für das Vorhandensein von Enzymen zum adaptiven Abbau dieser Verbindungen im Körper. Zellen können nicht zur Synthese spezifischer adaptiver Enzyme für jedes der zahllosen unnatürlichen Haptene und bakteriellen Bausteine veranlaßt werden, wenn sie keine genetischen Anlagen dazu haben.

2. Die adaptive Enzym-Bildung durch eine Zelle ist nicht vererbbar, sondern hört auf, wenn die Zellen in Abwesenheit des Substrats weitergezüchtet werden. Die *Burnetsche* Auffassung der fortlaufenden Antikörper-Synthese in Abwesenheit des Antigens stimmt mit dieser Tatsache nicht überein.

3. Die Begriffe vom „adaptiven Enzym“ und der „adaptiven Antikörper-Bildung“ würde den Tatsachen entsprechen, wenn folgendes Experiment gelungen wäre: Nachdem ein Antikörper-bildendes Enzym entwickelt und als Anlage adaptiver Enzymbildung vererbbar geworden ist, muß eine Injektion des isolierten Antikörpers (aus einer Stammlösung) in das adaptierte Tier das Antikörper-bildende Enzym zu gesteigerter Antikörper-Synthese anregen können, da nämlich die Adaptation als autokatalytischer Vorgang angesehen wird. Dies wird durch die vorliegenden Daten nicht gestützt.

4. Die Vorstellung vom adaptiven Enzym trägt nicht der Tatsache Rechnung, daß nach Injektion von Gewebe

eines fremden Spenders in foetale Mäuse und Hühner keine spezifische immunologische Reaktion zu beobachten ist (Billingham, Brent und Medawar, 1953).

5. Der Vorstellung vom adaptiven Enzym widerspricht die Tatsache, daß Patienten ohne  $\gamma$ -Globulin nicht auf antigenes Material reagieren.

6. Entsprechend der Vorstellung vom adaptiven Enzym stimuliert eine Substanz die Bildung eines adaptiven Enzymes, welches diese Substanz, sein Analoges oder Homologes synthetisiert oder metabolisiert. Antikörper sind jedoch weder Analoge noch Homologe zu Antigenen.

7. Konfigurationsschwierigkeiten. Nach der Lehrmeinung führt die  $\alpha$ -Konfiguration eines künstlichen Antigens zur Synthese eines spezifischen Antikörpers, welcher nicht mit einem Antigen mit  $\beta$ -Konfiguration reagieren kann oder umgekehrt. Die Vorstellung von der adaptiven Enzymbildung scheint mit diesen spezifischen Beziehungen nicht in Übereinstimmung gebracht werden zu können. Monod und seine Mitarbeiter (1951) sowie Lester und Bonner (1952) berichten, daß *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität entwickeln, wenn als Stimulantien die spezifischen Substrate Lactose (4-( $\beta$ -D-Galactosido)-D-glucose) oder nicht-hydrolysierbare Melibiose (6-( $\alpha$ -D-Galactosido)-D-glucose), Lyxose bzw. Raffinose benutzt werden. Mit anderen Worten, eine  $\alpha$ -Konfiguration stimuliert die Synthese eines aktiven Enzymes von  $\beta$ -Konfiguration. Lederberg (1951) zeigte, daß eine *E. coli*-Mutante  $\beta$ -Galactosidase erzeugen kann, vorausgesetzt Alkyl-galactoside werden als Stimulantien benutzt. Die Mutante reagierte jedoch nicht auf das spezifische Substrat Lactose (4-( $\beta$ -D-Galactosido)-D-glucose). Halvorson und Spiegelman (1953) fanden, daß  $\alpha$ -Methylglucosid, ein nicht-utilisierbares Analogon der Maltose ( $\alpha$ -Glucosido-4-glucose), die Bildung von Maltase bei *Saccharomyces cerevisiae* induziert.

Auf diesen Grundlagen ist es schwer zu erklären, wie spezifische Antikörper entsprechend der einen oder anderen der obigen zwei Theorien adaptiv synthetisiert werden könnten.

8. Schließlich führt die Annahme von Burnet über die Vererbbarkeit der erworbenen Eigenschaft der Antikörper-Synthesen in Abwesenheit des verantwortlichen Antigens zu folgenden Fragen:

a) Burnet und seine Mitarbeiter sind der Ansicht, daß ein Antigen vererbbar die Antikörper-synthetisierenden Enzyme modifiziert. Wenn diese Vorstellung richtig ist, müssen wir den folgenden Ablauf der Dinge annehmen: Ein Antigen modifiziert irreversibel die Gene, die modifizierten Gene steuern die Synthese von modifizierten Enzymen, und die modifizierten Enzyme synthetisieren modifizierte Globuline oder Antikörper-Molekeln. Dieser Ablauf entspricht dem 4. Gesetz von Lamarck im Hinblick auf die Vererbbarkeit von erworbenen Charakteristiken. Schränken wir auf der anderen Seite die Bedeutung der Veränderungen, die eine Zelle durchmacht, auf das Ausmaß ein, in dem veränderte Zellen auf Antigene oder andere Wirkstoffe als Grundlage für eine Überempfindlichkeit und sekundäre Immunreaktion durch unmittelbare Aufnahme von Antikörper-Bildung ansprechen, so entsprechen unsere Überlegungen mehr den Tatsachen. Vor Burnet wurde dieser Zusammenhang bereits von verschiedenen anderen Forschern anerkannt (für weitere Diskussion s. Sevag, 1956).

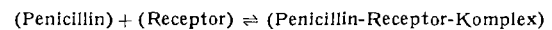
b) Antigene können auf Grund ihrer Wesensfremdheit nicht als genetisch gleichwertige Rekombinanten mit den Körperzellen wirken. Es besteht aber die Möglichkeit, daß Viren ihre Nucleinsäuren mit denen ihrer Wirte austauschen, wobei die Zellen modifiziert und möglicherweise zur Synthese von Globulinen in Form spezifischer Antikörper

befähigt werden. Könnte man das nachweisen, so würde es die lebenslängliche Immunität und Resistenz gegenüber Viren erklären. Die Einschränkung dieser Möglichkeit auf Viren würde den Mangel einer lebenslänglichen Antikörper-Synthese gegenüber nicht-viralen Antigenen erklären.

In den meisten Fällen adaptiver Enzymbildung, mit der möglichen Ausnahme der  $\beta$ -Galactosidase (Cohen-Bazire und Jolit, 1953), liegt im wesentlichen eher ein Aktivitätsanstieg als eine Neubildung des Enzymes vor (Pollock, 1953; Sevag, 1946; Vogel, 1957). Außerdem wird offensichtlich die Bildung von adaptiven Enzymen durch spezifische Induktor-Substrate sowie nicht-utilisierbare Substanzen vermittelt (Cohn und Monod, 1953; Pollock, 1953; Halvorson und Spiegelman, 1953; Vogel, 1957). Man kann daher annehmen, daß die Enzymbildung selbst unspezifisch vonstatten geht. Daraus ergibt sich schließlich, daß Induktoren die Enzymbildung analog dem Vorgang beeinflussen, durch den ein Enzym die Bildung der Sekundärprodukte aus den Substraten vermittelt (Pollock, 1953).

Es gibt keinen Beweis dafür, daß bei der adaptiven Enzymbildung der Induktor stöchiometrisch verbraucht wird. Entsprechend den Angaben von Pollock (1953) sind 100 Molekeln Penicillin notwendig, um den *Bacillus cereus* zur maximalen Enzymproduktion zu stimulieren. Der Umsatz ist zu  $5 \cdot 10^4$  berechnet worden. Nach Monod und Cohn (1952) läuft die  $\beta$ -Galactosidase-Bildung bei einer Sättigungskonzentration des Induktors von  $M \cdot 10^{-4}$  mit einer zufriedenstellenden Geschwindigkeit ab. Nachweisbare Wirkungen werden bereits bei einer Konzentration von  $M \cdot 10^{-5}$  beobachtet.

Pollock (1953) ist der Ansicht, daß in dem System



Penicillin als eine Art von Katalysator wirkt. Spiegelman und Halvorson (1953) haben eine direkte Synthese von adaptivem Enzym aus Aminosäuren nachweisen können. Hewitt (1953) nimmt an, daß das Substrat oder der Induktor einen katalytischen Komplex mit den Genen (oder DNS-Protein) zur Steuerung der Synthese von neuem Enzym bildet und für die Synthese von vielen adaptiven Enzymmolekeln verantwortlich sein könnte, da bei der Synthese das Substrat nicht verbraucht wird. Sobald das Substrat nicht länger in dem System anwesend ist, könnte die Gen-Substrat-Bindung unterbrochen und die Fähigkeit zur Synthese des spezifisch adaptiven Enzymes verloren gehen, bis das spezifische Substrat von neuem zugesetzt wird. Kacser (1932) zieht für seine Vorstellungen die Oberflächenadsorption des Substrats heran, wie sie für die heterogene Katalyse und enzymatischen Prozesse entwickelt wurde. Eine „Mehrpunkt-Adsorption“ führt zu einer relativ festen Bindung ohne wesentliche Verdrehung oder Spannung des Induktors mit der Oberfläche. Auf diese Weise stellt er sich die Bildung eines „Organizers“ vor, wie er von Pollock (1953) für die Bildung von adaptiven Enzymen vorgeschlagen wurde.

Auf der Grundlage dieser Vorstellungen ist man zu der Aussage berechtigt, daß man sich die adaptive Enzymbildung analog zur Bildung von gemischten Katalysatoren vorstellen muß, bei der der Induktor die Rolle eines Katalysators ausübt. Unter Anwendung dieser Vorstellungen auf die Antikörper-Synthese haben wir den Begriff der Immunokatalyse gebildet (Sevag, 1945, 1951, 1954). Wir stellen damit wiederholt fest, daß makromolekulare Antigene mit ihrer genetisch-determinierten Spezifität sich mit Globulinbildenden Zellen kombinieren und die Globulin-Synthese in Übereinstimmung mit der Spezifität der Antigenmolekel modifizieren.

## Vorgänge bei der Induktion der Antikörper-Bildung durch Antigene

Das Antikörper-Globulin muß sich chemisch, strukturell oder räumlich von normalem Globulin unterscheiden, wenn seine spezifische Reaktivität mit dem Induktor-Antigen erklärt werden soll. Die Reaktivität wird gemessen durch die Fähigkeit der Antikörper, die Aktivität von Toxinen und Enzymen zu neutralisieren, durch den Intensitätsgrad der anaphylaktischen Reaktionen, durch die Menge an Präzipitat, die bei einer Antigenreaktion gebildet wird, sowie den Grad der Agglutination, der sich bei der Reaktion mit antigenen Zellen bildet. Keine dieser Reaktionen kommt mit normalen Globulinen zustande. Auf Grund dieser Eigenschaften müßten Antikörper-Globuline sowohl chemisch wie auch immunologisch von den normalen Globulinen unterschieden werden können. Die vorliegenden Analysen haben jedoch keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf den Gesamt- und Amidstickstoff-Gehalt sowie die Aminosäure-Zusammensetzung gezeigt. Analysen von *Porter* (1950) über die Sequenz der Aminosäuren in den endständigen Pentapeptid-Ketten haben ebenfalls keine Unterschiede aufdecken können. Neuere Experimente über die Lokalisation der Spezifitätszentren in Enzymen scheinen jedoch zu zeigen, daß nicht die Endgruppen, sondern andere Molekelbezirke von entscheidender Bedeutung sind (weiteres siehe unten). Nimmt man an, daß die Spezifität durch ein Antigen katalytisch in die Antikörper-Molekel eingeführt wird, so muß der Untersuchung dieser Molekelbezirke im Hinblick auf ihre Bedeutung als Spezifitätszentren besondere Beachtung geschenkt werden.

Versuche, Antikörper von normalen Globulinen immunologisch zu differenzieren, waren bisher ergebnislos. Möglicherweise, weil Antikörpermolekeln ebenfalls Teile vom normalen  $\gamma$ -Globulin enthalten und daher im Hinblick auf mögliche durch Antigene bewirkte sowie chemische Unterschiede maskiert sind. Lediglich *Northrop* (1942) konnte aus einem Trypsin-Abbauprodukt eines Toxin-Antitoxin-komplexes ein vollkommen aktives kristallines Diphtherie-Antitoxin isolieren. Das Molekulargewicht betrug die Hälfte der gesamten Antitoxin-Molekel. Es war immunologisch von seinem normalen Gegenspieler klar zu unterscheiden. Man muß annehmen, daß eine normale Komponente der Antitoxin-Molekel durch Trypsin abgespalten wird und damit die Gruppen, die in immunologischen Testen störend wirken, von der antitoxischen Hälfte der Molekel abgeschält worden sind. (Zur immunologischen Differenzierung von Pepsin-verdaulichem Diphtherie-Antitoxin von normalem Globulin s. *Weil*, *Parfentjev* und *Bowman* (1938)).

### Wie beeinflußt ein Antigen die Globulin-Synthese, so daß spezifisches Antikörper-Globulin gebildet wird?

Wirkt ein Antigen als stöchiometrischer Reaktionspartner? Wirkt ein Antigen als ein Inhibitor? Hat ein Antigen die Funktion eines Biokatalysators?

Die Induktionswirkung von Antigenen, durch die der Globulin-Molekel spezifische stabile Strukturen und Funktionen eingeprägt werden, kann als chemischer Prozeß aufgefaßt werden. Antigene könnten bei der Antikörper-Synthese als stöchiometrische Reaktionspartner, als Inhibitoren oder als Biokatalysatoren an entsprechenden synthetischen Reaktionen teilnehmen. Verschiedene derartige Gesichtspunkte sind an anderer Stelle diskutiert worden. (*Sevag*, 1951, 1954). Folgende grundsätzlichen Tatsachen müssen jedoch beachtet werden:

1. Bekanntlich genügen Spuren von Antigenen, um die Bildung einer wesentlich größeren Anzahl von Antikörper-Molekeln einzuleiten. In dieser Hinsicht ist der Umsatz der Antikörper-Synthese ebenso hoch wie der von enzymatischen Substraten. Dies bedeutet, daß ein Antigen als Biokatalysator automatisch vom Antikörper-Molekel abdissoziieren kann, sobald deren Synthese vollzogen ist. Es kann die Synthese von neuen Molekeln in einem fortlaufenden Cyclus wieder aufnehmen, ohne selbst verbraucht zu werden. Mit anderen Worten, ein Antigen verhält sich in dieser Hinsicht wie jeder ideale Katalysator. Ein Antigen, welches als stöchiometrischer Reaktionspartner oder als Inhibitor einer Reaktion fungierte, würde fixiert sein und könnte daher seine Funktion nicht noch einmal wiederholen. Nach *Pauling* (1948) trennt sich eine Antikörper-Molekel vom Antigen unter dem Einfluß ihrer Wärmebewegung unter Bildung des freien Antikörpers.

In diesem Zusammenhang ist außerdem die Tatsache von Bedeutung, daß man keine charakteristische Gruppe eines Antigens in der freien Antikörper-Molekel findet. Die vielen Untersuchungen zu diesem Aspekt des Problems haben ohne Zweifel gezeigt, daß Antigene funktionell nicht als stöchiometrische Reaktionspartner oder Inhibitoren aufzufassen sind (ausführlichere Diskussionen s. *Sevag*, S. 35–38, 1951).

2. Die Antigen-Spezifität von Antikörpern ist von derartiger Präzision, wie sie nur eine Parallele bei den Enzym-Spezifitäten findet. Die zu beantwortende Frage ist, mit welchem spezifischen Mechanismus kann ein Fremdprotein oder irgendein Antigen eine spezifische, stabile, funktionelle Modifikation einer Globulin-Molekel während ihrer Synthese einprägen? Enzyme sind die einzig bekannten Einheiten, die mit Hilfe strukturell und funktionell spezifischer Molekeln die zu steuernde Synthese beeinflussen können. Die Synthese von rechts- und linksdrehenden natürlichen Verbindungen, Zuckern mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfigurationen, zahllose typen-spezifische Pneumokokken-polysaccharide usw. wird durch Enzyme mit biokatalytischen Spezifitätszentren gesteuert. Antikörper werden gegen die Protein-Hälfte und die haptene Gruppe von Azo-Antigenen produziert; Haptene, welche  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Konfiguration oder auch rechts- oder linksdrehende Aktivität haben sowie mit Proteinen durch Azo-Brücken verbunden sind, können ihre Konfiguration den Antikörpern einprägen (weitere Diskussion s. unten).

### Kritik der Einwände gegen die Auffassung von den Antigenen als Co-Katalysatoren

*Haurowitz* hat die Meinung vertreten (1952), wir hätten keine Gründe, den Antigenen Enzym-Eigenschaften zuzuschreiben, wenn wir die Beispiele der Immunisierung mit Enzymen unberücksichtigt lassen. Die determinanten Gruppen von konjugierten Antigenen haben außerdem seiner Ansicht nach keine Enzymaktivität. Schließlich sei das sicherste Kriterium eines Katalysators in der Tatsache zu sehen, daß er die Aktivierungsenergie der katalysierten Reaktion reduziert. Eine derartige Wirkung von Antigenen wäre jedoch nicht bekannt (s. außerdem *Boyd*, 1954, 1956). Diese Argumente scheinen den Hauptwert auf das vermutliche Fehlen besonderer Daten über den Energieumsatz bei Antikörper-Synthesen unter in-vivo-Bedingungen zu legen. Alle anderen passenden Befunde, welche die Kriterien der Katalyse vollkommen erfüllen, scheinen vergessen worden zu sein. Manche dieser Befunde wurden jedoch von *Haurowitz* und seinen Mitarbeitern (1942) sowie *Hooker* und *Boyd* (1932) selber erhoben.

## Energetische Grundlagen der Antikörper-Synthese

Nach der *Paulingschen* Konzeption (1948) gehen Polypeptid-Ketten als unmittelbare Vorläufer von normalem  $\gamma$ -Globulin oder Antikörper-Molekeln vom instabilen Zustand in eine stabile und spezifische Struktur über, die möglicherweise durch Wasserstoff-Brückenbindungen unter Austausch der Bindungsenergie zustande kommt (*Pauling* 1945).

Im Falle von Antikörper-Molekeln entsteht die spezifische Bindung notwendigerweise durch den orientierenden Einfluß der Oberflächenkräfte der Antigene (s. außerdem *Haurowitz, Mudd, Alexander*), wobei die Antigene weder stöchiometrisch im Endprodukt gebunden, noch während des Vorgangs verbraucht werden. Chemisch betrachtet werden wir also fragen müssen: Wie anders könnte ein Antigen die Antikörper-Synthese induzieren oder zustande bringen, ausgenommen als Katalysator, wenn die obigen Bedingungen erfüllt werden müssen? Im Falle der Kontaktkatalyse ist bekannt, daß durch Oberflächenadsorption der Molekeln der Energiegehalt geändert wird und daher energetisch die Möglichkeit zur Bildung neuer Produkte gegeben ist. Adsorption führt nicht unbedingt zu katalytischen Reaktionen, katalytische Reaktionen jedoch setzen gewöhnlich Adsorption voraus.

In diesem Zusammenhang soll hier der Begriff der gemischten Katalysatoren vorgetragen werden. Nach *G. M. Schwab* (s. *Taylor und Spence* 1937) beobachtet man bei der Mischung von zwei oder mehr Bestandteilen eines katalytischen Systems eine „Aktivierung“ (oder *Promotion*), die auf einer Vermehrung und Erhaltung von energiereichen Zentren beruht. Infolgedessen übt die Mischung nicht nur stärkere Wirkungen als die einzelnen Bestandteile aus, sondern besitzt außerdem neue Funktionen. Der eine Bestandteil des Katalysators kann praktisch nur den einen Reaktionspartner adsorbieren, der andere Bestandteil naturgemäß nur den anderen. Unter diesen Bedingungen können beide Reaktionspartner nur an den Grenzphasen in ausreichender Konzentration und genügend aktiviert adsorbiert zusammentreffen, während jede einzelne Komponente kein guter Katalysator ist. Außerdem sind derartige Grenzgebiete naturgemäß auch in der Lage, größere steuernde Wirkungen auf eine Reaktionsfolge auszuüben, als sie mit einer einfachen Kontaktmasse möglich sind.

Ein Katalysator beschleunigt bekanntlich die Einstellung des Gleichgewichts einer vorliegenden Reaktion oder einer unmeßbar langsam ablaufenden Reaktion. Da es keinen Beweis für die Existenz einer Antikörper-Bildung gegenüber den zahllosen natürlichen und künstlichen Antigenen unter normalen Bedingungen gibt, stellt sich die Frage nach der Kapazität eines Antigens zur katalytischen Induktion einer normalerweise nicht existierenden Reaktion.

Nach *Schade* (1923) und *Willstätter* (1927) beschleunigen jedoch Katalysatoren nicht nur eine bekannte Reaktion (*Berzelius, Ostwald* usw.), sondern bringen auch Reaktionen zustande, die ohne sie nicht vorkommen. In Erweiterung dieser Vorstellung stellt *Schwab* (mit *Taylor und Spence*, 1937) fest, daß mehr und mehr Fälle gefunden werden, bei denen Katalysatoren, z. B. in der Technologie oder in Organismen, Reaktionen ermöglichen, die in dem gleichen Substrat ohne Katalysatoren offenbar nicht abzulaufen scheinen. Aus diesem Grunde schließlich ist vermutet worden, daß Katalysatoren die Fähigkeit besitzen neue Reaktionen zu schaffen.

## Wie wirken haptene Gruppen als Co-Katalysatoren?

Man hat diskutiert, daß „die determinanten Gruppen von konjugierten Antigenen sicher keine enzymatische Aktivität haben“. Die Analyse dieser Feststellung deckt eine interessante Verwechslung auf. Der Gebrauch des Ausdrucks „enzymatische Aktivität“ in Beziehung zu den diskutierten Antigenfunktionen ist unklar und gibt daher zu Fehlschlüssen Anlaß. Ein Enzym wie z. B. die Hexokinase wirkt nicht wegen seiner Hexokinase-Aktivität antigen. Ist man der Ansicht, daß eine direkte Beziehung zwischen Hexokinase-Aktivität und antigener Wirksamkeit der Molekel besteht, so muß diese Feststellung ein für allemal im Zusammenhang mit unserer Vorstellung fallen gelassen werden. Wir sind der Ansicht, daß die antigene Wirksamkeit der Molekel durch die katalytischen Zentren vermittelt wird, welche die Spezifität ausüben und die außerdem auch für die Hexokinase-Aktivität als eine von verschiedenen potentiell möglichen Funktionen verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang muß allerdings gesagt werden, daß ein Hapten als solches keine „enzymatische Aktivität“ aufweist. Damit ist jedoch noch nicht die wohlbekannte Tatsache eingeschlossen, daß ein Hapten als solches außerdem nicht in der Lage ist, die Synthese eines spezifischen Antikörpers zu vermitteln. Das freie Hapten kann weder als determinante Gruppe noch als Antigen angesehen werden, sondern nur als eine chemische Substanz wie tausend andere Substanzen und ohne Bedeutung für die vorliegende Frage. In chemischer Kombination mit einem Eiweißkörper durch eine Azo-Bindung wird eine Substanz, z. B. die *p*-Aminobenzoesäure, zu einer neuen Komponente eines Komplexes, der erst dann, jedoch nicht vorher, antigenen Charakter trägt. Der Einbau von Substanzen mit haptenen Eigenschaften in Makromolekeln zieht eine beträchtliche Verzerrung der Elektronenstruktur nach sich, so daß diese nicht länger der ursprünglichen Molekel ähnlich ist. Die Azo-Brücken mit Proteinen schließen den Antagonismus gegenüber Sulfonamiden sowie die Funktion eines Wachstumsfaktors oder eines Vitamins gegenüber Folsäuren aus. Durch die Azo-Brücke mit einem Protein wird ein Hapten zu einem Co-Katalysator. Die Spezifität wird induktiv von der Protein-Molekel erworben, und der Verlust der Aktivität kommt durch Spaltung der Azo-Bindung zustande.

Um zu erklären wie eine einfache Substanz eine solche Eigenschaft durch eine Azo-Bindung mit einem Protein erhält, müssen wir einfache chemische und enzymologische Tatsachen heranziehen.  $\text{NH}_2$ -Gruppen besitzen als  $\text{HO-NH}_2$ , Anilin oder Äthylamin usw. unterschiedliche Eigenschaften. Im Hydroxylamin besitzt die  $\text{NH}_2$ -Gruppe verschiedene Eigenschaften. Im Anilin erwirbt sie einen aromatischen Charakter und beim Äthylamin zeigt sie aliphatisches Verhalten. Die SH-Gruppe bestimmt die Charakteristiken einer ganzen Liste von Enzymen mit verschiedenen Spezifitäten. Die SH-Gruppe des Schwefelwasserstoffes oder des NaHS hat keine enzymatische Aktivität. Alloxazin-adenin-dinucleotid kann als Co-Enzym oder Co-Katalysator nur dann wirken, wenn es mit einem spezifischen Eiweißkörper verknüpft ist. Seine Überträgerfunktion ergibt sich aus der Tatsache, daß ihm das spezifische Leistungsvermögen der Protein-Hälfte des konjugierten Systems induktiv mitgeteilt wird. Die Häm-Gruppe erwirbt induktiv die spezifischen Funktionen der Eiweißhälfte beim Hämoglobin, der Katalase, den Cytochromen, der Cytochromoxydase usw. Das Häm als solches besitzt keine der Eigenschaften, die es als Komponente des Konjugats erwirbt. Das Alloxazin-adenin-

dinucleotid wie das Häm haben nicht die Eigenschaften von Haptenen, wenn sie mit den entsprechenden spezifischen Proteinen auf natürliche Weise und nicht durch Azo-Bindungen konjugiert sind. Sie werden jedoch in Haptene umgewandelt, wenn sie durch Azo-Bindungen mit den Proteinen verbunden werden und damit spezifische Antikörper-Bildung induzieren. Unter dieser Bedingung müßten sie ihre natürlichen Co-Enzymfunktionen verlieren. In diesem Fall scheint sogar die Benutzung des Ausdruckes „konjugiert“ für künstliche Antigene im Vergleich zu natürlich konjugierten Eiweißkörpern inkorrekt zu sein.

Ähnlich den Azo-Antigenen verlieren Eiweißkörper, die mit Salpetersäure, salpetriger Säure oder Jod behandelt werden, teilweise oder vollständig ihre ursprüngliche Spezifität und manifestieren neue Spezifitäten. Kaninchen-Immunserum, welches gegen Kaninchenserum-Nitroprotein entwickelt wurde, kann weder zwischen dem Kaninchen-Nitroprotein und dem von anderen Tieren- oder Pflanzen-Arten unterscheiden noch mit normalen Serum-eiweißkörpern reagieren. Jodierte Proteine verhalten sich ähnlich. Obwohl mit anderen Worten Eiweißkörper nach Reaktion mit Fremdstoffen tiefgreifende Veränderung in ihrer ursprünglichen Spezifität erfahren, ist ihre katalytische Funktion zur Synthese von Antikörpern gegen veränderte Proteine nicht verloren gegangen, sondern modifiziert worden. Veränderte Eiweißkörper manifestieren also veränderte Spezifitäten.

Die Antwort auf die ursprüngliche Frage „Sind Antigene Fermente?“ (*Haurowitz*, 1954) liegt auf der Hand. Enzyme steuern Reaktionen entsprechend den Kriterien der Katalyse. Immunologische Befunde zeigen, daß Antigene als Vermittler der Synthese von spezifischen Antikörpern den Kriterien der Katalyse genügen. Native Eiweißkörper, Enzyme, Nitro-Eiweißkörper, jodierte Proteine, Azo-Proteine erfüllen als Antigene ebenfalls die Kriterien der Katalyse. Diese Tatsachen sind der Kern der Theorie der Immunkatalyse, sie sind außerdem die Antwort zu den obigen und früher gestellten Fragen.

### Über die Parallelität von Antigen-Wirkung und enzymatischen Funktionen

Aus dem Konzept der Antigen-Wirkung als biokatalytischen Prozeß ist zu folgern, daß alle Eiweißkörper „angeborene“ katalytische Funktionen aufweisen (*Sevag*, 1945, 1951), wenn auch Rinderserum-Albumin z. B. keine bekannte katalytische Aktivität aufweist. Jedoch bleibt die Tatsache bestehen, daß durch Beeinflussung der Globulin-Synthese zur Bildung spezifischer Antikörper Rinderserum-Albumin in Übereinstimmung mit den Kriterien der Katalyse wirkt. Weiter wußte man vor einer Dekade auch noch nicht, daß Globuline enzymatische Aktivitäten aufweisen können. So besteht der als Prothrombinase bekannte Enzymkomplex, der Prothrombin zu Thrombin abbaut, aus AC-Globulin (AC = Anticoagulant), Thromboplastin und Calcium. Wahrscheinlich ist AC-Globulin ein Pro-Enzym und wird in einer Mischung von Pro-thrombin, Calcium-Ionen und Thromboplastin aktiviert (*Seegers*, 1951). Man kann daher annehmen, daß wir im Laboratorium noch nicht die „angeborenen“ katalytischen Aktivitäten gewisser Proteine entdeckt haben, die wahrscheinlich in den Zellen, in denen sie entstehen, oder unter optimalen physiologischen Bedingungen wirksam sind. Vielleicht erwirbt auch eine nicht-katalytische Struktur wie die der Haptene, wenn sie sich mit Eiweißkörpern durch Azo-Bindungen verbinden, spezifitäts-induzierende Funktionen, sobald sie auf einer Oberfläche absorbiert ist oder mit einem globulin-synthetisierenden

Enzym-System kombiniert vorliegt. Man könnte sich auch vorstellen, daß die Antigenwirksamkeit ein Charakteristikum als solches darstellt, welches keine Beziehung zu den für die enzymatische Aktivität verantwortlichen katalytischen Zentren hat. Zur Unterstützung dieses Argumentes wurde darauf hingewiesen, daß Immunserum gegen verschiedene Enzyme wie Katalase, Urease, Tyrosinase, Ribonuclease mit den entsprechenden Enzymen reagieren und vollkommen präzipitiert werden kann. Die enzymatischen Aktivitäten werden jedoch dabei nicht oder nur teilweise gehemmt. Nach alten Vorstellungen hat die Antigenwirksamkeit der Enzyme keine Beziehung zu ihren enzymatischen Funktionen. Sie gründeten auf der falschen Annahme, daß Enzyme keine Eiweißkörper und daher nicht antigen wirksam seien. Neuere Ansichten basieren in gleicher Weise auf den Ergebnissen unvollständiger oder unzureichender Untersuchungen. So ist neuerdings gezeigt worden, daß hemmende Antienzyme gegenüber verschiedenen Enzymen wie z. B. Rinderleber-Katalase, Tyrosinase, Ribonuclease gewonnen werden können, die früher von verschiedenen Forschern als nicht-hemmbar durch die entsprechenden Antienzym-Antikörper gefunden wurden (Tab. 1).

Diese Diskrepanzen können durch folgende Möglichkeiten und Befunde erklärt werden:

1. Ein Enzym oder Toxin kann als multikatalytische Einheit die Synthese von mehr als einem spezifischen Antikörper anregen (*Sevag* 1954). Damit könnte der präzipitierende Antikörper mit dem Enzym-hemmenden Antikörper sowohl identisch als auch nicht-identisch sein. *Heidelberger* (1956) hat diese Tatsache in folgendem Satz berücksichtigt: „Es wird heute allgemein anerkannt, daß Antigene verschiedene immunologisch aktive Gruppierungen oder Bezirke enthalten können“. Diese Mehrzahl antigenen Gruppierungen in einer Molekel schließt in keiner Weise aus, daß die antigenen und enzymatischen Funktionen ihren Ursprung in demselben katalytischen Bereich haben können.

2. Im allgemeinen werden hemmende Antikörper gegen enzymatische Funktionen langsamer produziert oder erfordern eine längere Immunisierungsperiode als präzipitierende Antikörper gegen andere immunologisch aktive Molekelgruppierungen. Dies folgt aus der Beobachtung, daß meistens die Konzentration eines Enzym-hemmenden Antikörpers der Konzentration des präzipitierenden Antikörpers nachhinkt und daß zur Vermehrung des Antienzyms eine längere Zeit der Immunisierung mit dem Enzym notwendig ist. Außerdem können präzipitierende Antikörper, die mit Hilfe von inaktivierten Enzym-Molekeln produziert wurden, nicht die Enzym-Aktivität hemmen. Dieser Befund kann in dem Sinne interpretiert werden, daß das für die enzymatische Funktion verantwortliche katalytische Zentrum labil oder in seinen antigenischen oder enzymatischen Wirkungen einflußbar ist. Schließlich stellt die Antigenwirksamkeit einer inaktivierten Molekel den stabileren oder resistenteren Zustand dar. Der stabile Molekelkern scheint eine Behandlung durch Hitze, Nitrierung, Jodierung usw. im Hinblick auf die Antigenwirksamkeit mit veränderten spezifischen Funktionen gut zu vertragen.

3. Sterische Hinderung kann die Vereinigung zwischen enzymatisch-reaktiven Gruppen und spezifischen Antienzym-Antikörpern vollkommen oder partiell hemmen. So wurde inkomplette Urease-Hemmung durch Antiurease beobachtet. Dies läßt sich im Hinblick auf die Tatsache verstehen, daß eine Anzahl von aktiven SH-Gruppen innerhalb der Molekel gelegen und daher für Reaktionen mit der größeren Antiurease-Molekel nicht zugänglich, wohl jedoch für Reaktionen mit den kleineren Harnstoff-Molekeln erreichbar sind. Aus ähnlichen Gründen kann wahrscheinlich



Enzym	Quelle	Substrat	% Inhibierung	Literatur
$\alpha$ -Amylase	Bakterien	Stärke	100	Mackawa u. Kitozawa, 1954
$\beta$ -Amylase	Gerste	Stärke	95	Lüers u. Albrecht, 1926
Carboxylase	Hefe	Pyruvat	100	Pasternak, Sevag u. Miller, 1951
Carbobenzoxypeptidase	Rind	Carbobenzoxylglycyl-L-thryptophan	>80	Smith u. Mitarb., 1952
Katalase	Rinderleber	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60	Seabra u. Deutsch, 1955
Katalase	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43—77	Soru, 1956
Koagulase	<i>Staphylococcus aureus</i>	Plasma	100	Tager u. Hales, 1948; Duthie, 1954
Milchsäure-dehydrogenase	Muskel	Lactat $\rightleftharpoons$ Pyruvat	56—68	Mansour, Bueding u. Stavitsky, 1954
Milchsäure-dehydrogenase, lactic	<i>Schistosoma mansoni</i>	Lactat $\rightleftharpoons$ Pyruvat	50—69	Henion, Mansour u. Bueding, 1955
Dehydrogenase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat	Hefe	DPN	90—95	Krebs u. Najjar, 1948
Decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	Lysine	90	Howe u. Treffers, 1952
Desoxyribonuclease	<i>Streptococcus</i>	DNA	100	McCarty, 1949
Desoxyribonuclease	Rinderpankreas	DNA	100	McCarty, 1946, 1949
Desoxyribonuclease	<i>Bothrops jararaca</i> venom	DNA	87	Taborda u. Mitarb., 1952
Desoxyribonuclease	<i>Crotalus terrificus terrificus</i> , venom	DNA	60	Taborda u. Mitarb., 1952
$\beta$ -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	Lactose	0	Cohn u. Monod, 1951
$\beta$ -Glykosidase	Emulsin	Amygdalin	56	Hildebrandt, 1893; Ohta, 1913
Glucose-Isomerase	<i>Schistosoma mansoni</i>	Fructose-6-P- $\rightarrow$ Glucose-6-P	47	Bueding u. MacKinnon, 1955
Hexokinase	Bäckerhefe	Glucose $\rightarrow$ Glucose-6-P	100	Miller, Pasternak u. Sevag, 1949
Hyaluronidase	<i>Cl. welchii</i>	Mucoprotein	100	McClellan u. Hale, 1941
Lactase	Pilze	Guajakol	90	Bach u. Engelhardt, 1922
Lecithinase	<i>Cl. welchii</i>	Lecithin	100	Macfarlane u. Knight, 1941
Lipase	<i>Mycobacterium phlei</i>	Tributyrin	100	Sartory u. Meyer, 1947
Luciferase	<i>Cypridina hilgendorfi</i>	Luciferin	100	Harvey u. Deitrick, 1930
Lysozym	<i>M. lysodeikticus</i>	Mucopolysaccharide	100	Robert u. Wells, 1937; Smolens u. Charney, 1947
Mucinase	<i>Vibrio comma</i>	Ovomucin	100	Burnet u. Stone, 1947; Lam u. Mitarb., 1955
Papain	Pflanzen	Gelatine, Casein	58—72,5	Haas, 1940
Penicillinase	<i>Bacillus cereus</i>	Penicillin	100	Housewright u. Henry, 1947; Pollock, 1956
Peroxydase	Pilze	Pyrogallol	46—53,5	Bach u. Engelhardt, 1922
Phosphatase	Hefe	$\alpha$ -Glycerophosphate	100	Sevag, Newcombe u. Miller, 1954
Polysaccharidase	<i>B. palustris</i>	Polysaccharide aus Pneumokokken Typen III, VII	100	Sickles u. Shaw, 1950
Protease	<i>Cl. welchii</i> (Toxin-Präp.)	Gelatine	52	Maschmann, 1937
Milchsäure-dehydrogenase	Ratten-Muskel	Pyruvat + DPN, H <sub>2</sub>	44—75	Kubowitz u. Ott, 1943
Thryptophanase	<i>Escherichia coli</i>	Thryptophan	100	Dolbey, Hall u. Hoppold, 1952
Tyrosinase	Champignons	Tyrosin	100	Gessard, 1901—1906; Sizer, 1952
Tyrosinase	Champignons	Tyrosin	0	Adams, 1942
Tyrosinase	Mehlwurm	Tyrosin	46	Duliere u. Adant, 1934
Tyrosinase	<i>Glomerella cingulata</i>	Tyrosin	77	Owen u. Markert, 1954
Ribonuclease	Rinderpankreas	RNA	20—30	Smolens u. Sevag, 1942
Ribonuclease	<i>Bothrops jararaca</i> venom	RNA	100	Taborda u. Mitarb., 1952
Urease	Jack bean ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	Harnstoff	55—80	Summer, 1937; Marucci u. Mayer, 1952

Tabelle 1. Inhibierung von Enzymen durch spezifische Antienzym-Antikörper

die Aktivität bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase nicht durch antibakterielle oder antigalaktosidase Seren gehemmt werden (Cohn und Monod 1951). Dies kann mit einer sterischen Hinderung in Zusammenhang gebracht werden, die von der  $\beta$ -Konfiguration der Enzymoberfläche herrührt. Die  $\beta$ -Glykosidase im Emulsin soll jedoch ein Kaninchen-Immunsérum produzieren, welches die Hydrolyse von  $\beta$ -galaktosidischem Saligin hemmt (Hildebrandt 1893, Ohta 1913).

4. Das Phänomen der Konkurrenzhemmung zwischen Enzymsubstrat und spezifischem Antienzym-Antikörper verdient schließlich Beachtung: Wie anderweitig diskutiert (Sevag 1954; Sevag, Newcombe und Miller 1954) scheinen ältere Einwände, die auf der Beobachtung unvollständiger Aktivitätshemmung durch Antienzym-Antikörper begründet sind, keine Daseinsberechtigung mehr zu haben, wenn die Einflüsse, die diesem Vorgang zugrunde liegen, sorgfältig kontrolliert werden.

### Ursachen und Auswirkungen von Antigen-Eigenschaften

Eiweißkörper können Antigenwirksamkeit nur in fremden, multizellulären, lebenden Organismen wie Säugetieren entwickeln. Native Proteine zeigen keine Antigenwirksamkeit in den Zellen, in denen sie zu normalen Funktionen synthetisiert werden. Wenn sich eine antigene Funktion im nativen Milieu entwickeln würde, so käme es damit für die Zelle zu tödlichen oder pathologischen Bedingungen. Würden in den Zellen Antikörper gegenüber nativen Enzymen und Eiweißkörpern produziert werden, so würden sie die lebenswichtigen Funktionen dieser Enzyme blockieren und den Tod der Zelle bedingen. Z. B. führen Substanzen wie Chloramin-T, p-Chlorbenzoylchlorid, Picrylchlorid usw. zum Auftreten von Asthma, Rhinitis usw., wenn sie mit tierischen Systemen in Berührung gebracht werden. Bei diesen Reaktionen wurde die Be-



teilung von Reagin, einem anaphylaktischen Typus von Antikörper oder Präzipitin beobachtet. Da die Bildung dieser Antikörper in Abwesenheit eines exogenen Fremdproteins stattfand, muß man unweigerlich folgern, daß diese nicht-proteinartigen Fremdstoffen die nativen Proteine durch chemische Kombination in einem Ausmaß verwandelt haben, das zum Erwerb von antigenen Eigenschaften in ihrem eigenen Milieu geführt hat. Dieser Vorgang ist die Grundlage des als Autoimmunisation bekannten Phänomens, welches für verschiedene pathologisch-physiologische Reaktionen verantwortlich ist. Die antigene Wirksamkeit eines nativen Eiweißkörpers, die sich nur unter fremden Bedingungen manifestiert, kann nicht als angeborene Funktion betrachtet werden. Infolgedessen ist diese Wirksamkeit des Proteins als Störfaktor gegenüber dem genetischen Plan der Reproduktion, Erhaltung und Fortpflanzung der Spezies von Zellen anzusehen, innerhalb dessen die Synthese von Eiweiß gesteuert wird. Daraus muß man logischerweise schließen, daß die antigene Wirksamkeit eines Eiweißkörpers eine äußere (extrinsic) Manifestation einer anderen erworbenen Funktion ist.

Die Synthese von Eiweißkörpern und Enzymen als artspezifische Einheiten wird nach der Lehrmeinung durch Gene bzw. durch Desoxyribonucleo-Proteine als unentbehrliche Komponenten der Gene dirigiert. Wozu sollten Proteine in ihrem nativen Milieu spezifische biokatalytische Funktionen, die uns noch unbekannt sind, manifestieren? A priori würde man die antigene Wirksamkeit derartiger Proteine einer Erweiterung ihrer genetisch-bedingten Spezifitäten zuschreiben. Eine derartige vererbte Spezifität könnte dann auch die Synthese von Globulinen spezifisch modifizieren, die zur Bildung entsprechender Antikörper führt.

### Über die Einheitlichkeit der Zentren von antigenen und enzymatischen Spezifitäten

Die antigene Wirksamkeit als äußere erweiterte Manifestation einer vererbten biokatalytischen Eigenschaft wird durch Experimente mit Enzymen unterstützt. Wenn unsere Vorstellung richtig ist, müssen die antigenen und enzymatischen Spezifitäten von den gleichen genetisch bestimmten, spezifischen Zentren herrühren. Auf dieser Grundlage muß man folgende spezifischen Vorgänge annehmen:

a) Unter optimalen Bedingungen und in Abwesenheit von sterischer Hinderung muß eine Enzym-Antienzym-Kombination die Enzymaktivität inhibieren.

b) In Abhängigkeit von den relativen Konzentrationen von Substrat und Antienzym, der Reihenfolge der Zusätze der Reaktionspartner, dem relativen Grad der Affinitäten und dem Zustand des gebildeten Komplexes sollte ein Substrat durch Konkurrenz mit dem Antienzym die Hemmung partiell oder vollkommen aufheben. Werden diese Möglichkeiten nicht erkannt, so kann es zu Widersprüchen und Fehlschlüssen kommen (s. *Sevag* 1951, 1954, *Sevag* und *Mitarb.* 1955, *Cinader* 1953, 1955, *Bueding* und *MacKinnon* 1955, *Mansour* und *Mitarb.* 1954, zu dieser Art von Konkurrenz zwischen Substrat und Antienzym gegenüber zahlreichen bekannten Enzymen). Ein Toxin wirkt in Spuren auf einen spezifischen Acceptor des Wirts. Dieser Acceptor kann als Konkurrenz-Antagonist des spezifischen Antitoxins betrachtet werden. Die Affinitäten der reagierenden Gruppen eines Toxins würden in zwei entgegengesetzten Richtungen wirken, einmal im Hinblick auf den Antikörper und das Substrat, zum anderen auf die Stelle der Wirkung. Dieser Antagonismus kann dazu führen, daß das Antitoxin beim Neutralisieren der Toxine unter in-vivo-Bedin-

gungen versagt. Antigen-Antikörper-Kombinationen sind mit verschiedenen physikalischen Mitteln dissoziierbar, ohne daß es zu einer Schädigung des einen oder anderen der beiden Reaktionspartner kommt. Man nimmt an, daß die Kombinationen hauptsächlich durch elektrostatische Kräfte, von der Waalssche Kräfte und Wasserstoff-Brückenbindungen zustande kommen. Sie unterliegen dem Konkurrenz-Antagonismus in gleicher Weise, wie er zwischen Sulfonamiden und p-Aminobenzoesäure besteht.

Früher wurden derartige Hemmungen auf mechanische oder sterische Hindernisse gegenüber den Substraten zurückgeführt, die von der Antienzym-Enzym-Kombination herrühren. Diese Vorstellung kann nicht mehr damit belegt werden, daß Enzyme, die durch präzipitierende Antikörper (Tyrosinase, Urease, Katalase-Antikatalase und ähnliche Reaktionen) präzipitiert sind, in ihrer enzymatischen Aktivität nicht gemindert werden. Diese älteren Untersuchungen wurden inzwischen korrigiert. Unter kontrollierten Bedingungen können derartige Enzyme vollkommen oder partiell gehemmt werden. Es ist daher nicht schwer einzusehen, daß das gleiche katalytische Zentrum eines Enzymes als determinante Gruppe beider Spezifitäten der beobachteten Konkurrenz zwischen Substraten und Antienzymen unterliegt. Man kann nicht annehmen, daß ein Substrat eine Konkurrenz-Affinität auf den reaktionsfähigen Bezirk auf einem Antigen ausübt, welcher durch die reaktive Oberfläche des Antikörpers besetzt ist, wenn nicht Substrat und Antigenoberfläche gegenseitige Affinitäten ausüben.

Es erscheint daher paradox, daß native physiologische Funktionen, die für die Zellerhaltung notwendig sind, auch in einem Fremdmilieu Funktionen ausüben sollen, welche zur Bildung spezifischer, tödlich wirkender Antikörper führen. Nichtsdestoweniger wird diese zweifellos vorhandene antagonistische Beziehung zwischen antigenischen und enzymatischen Funktionen innerhalb einer Molekel wirksam gegen ein infektiöses Agens geschützt. Nach unserer Meinung könnte dies nicht der Fall sein, wenn beide spezifische Funktionen nicht induziert und durch das gleiche katalytische Zentrum gesteuert würden. Diese Tatsache kann einerseits die Fremdartigkeit der antigenen Wirkung eines Enzyms als eine Grundlage für die Unterdrückung ihrer normalen Funktionen erklären und andererseits gleichzeitig die Herkunft von äquipotenten Antigenen und biokatalytischen Spezifitäten von dem gleichen katalytischen Zentrum.

### Größe der determinanten oder katalytischen Zentren von spezifischen Protein- und Enzym-Funktionen

Im Studium der Größe und Natur von katalytischen Zentren in Eiweißkörpern wurden noch keine großen Fortschritte erzielt. Einzelne isolierte Tatsachen weisen auf allgemeine Grundsätze hin. *Marrack* (1938) hat auf die Notwendigkeit aufmerksam gemacht, die Existenz einer Anzahl von aktiven Bezirken auf der Oberfläche des Antigens als charakteristisches Phänomen von Eiweißkörpern zu postulieren. Diese Bezirke sollen aus Aminosäure-Residuen zusammengesetzt sein, die zusammen reagieren. Die grundsätzliche Vorstellung von *Marrack* ist bemerkenswert, wenn auch bisher keine Beweise vorhanden sind, daß Aminosäure-Residuen als katalytische Zentren oder antigendeterminante Gruppen funktionieren können. *Landsteiner* und *Chase* (1933) fanden, daß die Reaktion zwischen Schafserum-Antigen und seinem homologen Antikörper durch eine leicht dialysable Albumose aus peptischen Verdauungsprodukten von Hitze-koagulierte Schafserum-Antigen gehemmt werden kann. *Landsteiner* (1942) zeigte

weiter, daß die Hydrolyseprodukte von Seide, die aus Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 1000 bzw. aus 8 bis 12 Aminosäuren bestehen, in der Lage sind, mit Antiseide-Antikörpern zu reagieren. Dies könnte darauf hinweisen, daß die determinante Gruppe der Seide von dieser Größenordnung ist. *Holiday* (1939) berichtete, daß eine Komponente, welche durch peptische Verdauung von gereinigtem Pferdeserum-Albumin erhalten wurde, mit einem Molekulargewicht, entsprechend  $\frac{1}{8}$  der Albumin-Molekel, keine Antikörper-präzipitierende Eigenschaft hat, jedoch in der Lage ist, partiell die Reaktion zwischen den unverdauten Albumin-Molekeln und dem homologen Antikörper zu hemmen. Hydrolyseprodukte von peptisch verdaulichem Ovalbumin (*Tiselius* und *Erikson-Quensel* 1939) haben ein Durchschnittsmolekulargewicht von 1080. *Winnick* (1944) berichtete, daß Partialhydrolyse-Produkte der Wirkung von Chymothrypsin, Thrypsin, Pepsin, Fizin oder Papain auf Casein Produkte mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 600 bis 450 freisetzen. Die serologischen Eigenschaften dieser Produkte wurden nicht geprüft. Die teilweise cyclischen Strukturen der Hormone Oxytocin und Vasopressin (*Pierre* und *DuVigneaud* 1952, *Popenoe* und *DuVigneaud* 1954), die aus 8 Aminosäuren bestehen, wurden untersucht. Leucin und Isoleucin im Oxytocin sind im Vasopressin durch Arginin und Phenylalanin ersetzt. Die Frage, ob diese Strukturen katalytische Zentren von größeren Protein-Molekeln darstellen oder nicht oder ob sie de facto kleinere Molekulargewichtseinheiten sind, wurde nicht untersucht. *Binkley* (1955) konnte Amino-peptidasen aus Schweineiere mit Molekulargewichten von 6000 isolieren, aus denen noch kleinere Molekulargewichtsfractionen vom Molekulargewicht 1500 erhalten werden konnten. Die einfachere Amino-peptidase enthält Glutamat, Aspartat, Leucin, Guanisin, Uridindiphosphat und Glucosamin und besitzt hydrolytische wie synthetische Eigenschaften. Ribonuclease (Mol.-Gew. 14000) wurde durch Subtilisin (*Kalman* und Mitarbeiter 1955) abgebaut, wobei 22 Peptid-Bindungen pro Molekel hydrolysiert wurden. Im Durchschnitt bestanden die Ketten aus etwa sechs Peptiden. Offenbar kann eine beträchtliche Anzahl von Bindungen gespalten werden, ohne daß die Aktivität ernstlich beeinflußt wird. Auf Grund von Untersuchungen über die Aktivität von Ribonuclease in acht-molarem Harnstoff gegenüber Ribonucleinsäure und Uridin-2,3-diphosphat (*Anfinson* und Mitarbeiter 1955), wurde die Vermutung geäußert, daß die intakte Eiweißstruktur nicht wesentlich ist, sondern nur ein relativ kleiner Teil der Ribonuclease-Molekel direkt an der katalytischen Aktivität beteiligt ist und als aktives Zentrum von einer tödlichen Entfaltung durch entsprechende Vernetzungen (*cross linkages*) geschützt ist. Weitere Versuche zeigten schließlich, daß (*Kalnitzky* und *Anderson* 1955) 30proz. hydrolytische Spaltung der Ribonuclease-Molekel nach Inkubation mit Carboxypeptidase keine Abnahme der Aktivität nach sich zieht.

Pepsin. *Perlman* (1954) gibt an, daß bei Autodigestion von Pepsin, die bei  $p_H$  1,5–2,0 weit von jenem optimal für die Proteolyse vorstatten geht, die Aktivität in der dialysablen oder nicht-Protein-Trichloressigsäure-löslichen Fraktion von 10–20% des Gesamteiweißgehaltes wiedergefunden werden kann. Die Aktivität der dialysablen Fraktion (gegenüber Hämoglobin) war im Gegensatz zu den gesamten Pepsin-Molekeln niedrig. Die Aktivität gegenüber dem synthetischen Substrat Acetyl-l-phenyl-alanyl-dijodtyrosin betrug 64% des Wertes gegenüber dem intakten Protein.

Kristallines Papain. Leucin-amino-peptidase hydrolysiert nach *Hill* und *Smith* (1956) 120 von 180 Residuen,

die in einer Peptid-Kette von Quecksilber(II)-Papain vorhanden sind. Nach Abtrennen des Quecksilbers entwickeln alle abgebauten Präparationen von Quecksilber(II)-Papain die gleiche molare Aktivität gegenüber Benzoyl-L-argininamid wie die unverdauten Kontrollpräparationen von Quecksilber(II)-Papain unter den gleichen Bedingungen. Daraus wurde geschlossen, daß die aktive Gruppe der Papain-Molekel unabhängig und entfernt von der terminalen N-Gruppe der Eiweiß-Molekel liegt. Es ist bekannt, daß hormonelle und enzymatische Aktivitäten durch niedermolekulare cyclische Polypeptide, nucleotid-gebundene und andere niedermolekulare Polypeptide entwickelt werden, die durch proteolytische Verdauung größerer Enzym-Molekeln entstehen. Man kann annehmen, daß die niedermolekularen katalytischen Zentren eine größere Resistenz gegenüber Enzym-Verdauung besitzen.

Auf der Grundlage dieser Befunde müßten Seide und Serumalbumin niedermolekulare Peptid-Zentren besitzen, die gegenüber Hitze und proteolytischem Abbau resistent und außerdem in der Lage sind, ihre immunologischen Spezifitäten unter diesen Bedingungen zu erhalten.

### Aktivierungszustände von katalytischen Zentren und aktiven Gruppen

Es wird allgemein angenommen, daß katalytische Zentren von einmaliger geometrischer Konfiguration sind und daß diese auf Grund der niedrigen Aktivierungsenergie, die an derartigen Zentren für die aktivierte Adsorption, die eine notwendige Voraussetzung für die katalytische Reaktion darstellt, wirksam werden (*Schwab* mit *Taylor* und *Spence*, 1937). Diese Zentren aktivieren oder induzieren entsprechende polare oder aktive Gruppen für Reaktionen mit spezifischen Substraten. Die aktiven Gruppen werden durch aliphatische oder aromatische polare Gruppen repräsentiert. Nicht die aktiven Gruppen, sondern die einmaligen Konfigurationen von katalytischen Zentren bestimmen die Spezifitäten von Eiweißkörpern. Für die Funktion der  $\beta$ -Amylase des Chymothrypsins sowie des follikel-stimulierenden und lactogenen Hormons ist die Unversehrtheit der phenolischen wie der Disulfid-Gruppen wesentlich. Für Lysozym sind es Amino-, Carboxyl-, Amid-, Guanidyl-, Hydroxyl- und Disulfid-Gruppen, für Thrypsin Indolyl- und Amid-Gruppen, für Insulin Phenol-, Disulfid- und Carboxyl-Gruppen. Die Sulfhydryl-Gruppen dienen als funktionelle Gruppe für eine ganze Reihe von Enzymen verschiedener Spezifitäten. Daher muß offensichtlich jedes Enzym katalytische Zentren mit einmaliger Struktur haben, die jeweils die SH-Gruppe\*) in verschiedener Weise zur Funktion anregen. In-vitro-Experimente haben gezeigt, daß die steuernde Rolle von katalytischen Enzymzentren reversibel herabgesetzt wird, wenn die reaktiven terminalen Gruppen mit Gruppen-spezifischen Reagentien reagieren. Inaktivierungen von Enzymen mit physikalischen Mitteln zerstören die Fähigkeit der Molekel zur Induktion und Synthese von Antienzymen. Sie können jedoch präzipitierende Antikörper bilden, die dann aber nicht in der Lage sind, Enzymaktivitäten zu hemmen. Diese Tatsache mag darauf hinweisen, daß ein neuer stabiler Zustand entsteht, der zur Antikörper-

\*) Wie experimentell festgestellt wurde, inaktiviert die Bindung der Sulfhydryl-Gruppe durch Jodacetat die aktiven Gruppen (SH) oder die „enzymatischen Anlagen“, ohne daß die Reaktion zwischen dem Antikörper und der antigenen Bestimmungsgruppe oder dem katalytischen Zentrum mit besonderen Konfigurationen gestört wurde. Ähnlich können gewisse Toxine, die durch milde Behandlung mit Formaldehyd hergestellt wurden, die aktiven Gruppen (NH<sub>2</sub> usw.) neutralisieren, ohne daß die antigenen Bestimmungszentren, die möglicherweise toxische Reaktionen der NH<sub>2</sub>-Gruppe mit veranlassen, irreversibel geschädigt werden. Von solchen, nur leicht modifizierten Antigenen würde man die Produktion von neutralisierenden Antikörpern erwarten.

synthese-Induktion mit neuer Spezifität in der Lage ist. Zellextrakte mit Tyrosinase- und Thryptophanase-Aktivitäten bilden Antienzyme, jedoch nicht Extrakte, die keine derartigen Aktivitäten enthalten. Enzymatisch aktive Präparationen erzeugen wirksame Immunsereen (weiteres s. *Sevag* 1954).

### **Grundlage der serologischen Kreuzreaktion zwischen künstlichen Antigenen gleicher haptener Gruppen im Gegensatz zur Abwesenheit von Kreuzreaktionen zwischen Enzymen mit gleicher aktiver Gruppe oder gleichen Coenzymen**

Künstliche Azo-Antigene, die aus gleichen haptogenen Gruppen, jedoch verschieden artspezifischen Proteinen hergestellt sind, erzeugen kreuzreagierende Antikörper. Auf dieser Grundlage sollten ebenfalls verschiedene Enzyme mit gleicher SH-Gruppe oder gleichen Coenzymen Antikörper mit der Fähigkeit zur Kreuzreaktion produzieren. Jedoch kann man zunächst kein paralleles Verhalten zwischen künstlichen und natürlichen Körpern erwarten. Wie oben diskutiert (*Sevag* 1954) ist die Azo-Bindung unnatürlich. Weder einfache noch konjugierte native Eiweißkörper und Enzyme enthalten, soweit bekannt ist, eine Azo-Bindung. Die chemisch eingeführte Azo-Bindung verwandelt die Eiweißkörper in völlig neue Produkte, so daß sogar Substanzen wie Galactose, Lactose, p-Aminobenzoesäure, Peptide usw., die in lebenden Systemen vorkommen, andere Eigenschaften erhalten. Mit anderen Worten, in der Azo-Kombination mit Eiweißkörpern sind sie nicht länger natürlich reagierende Substanzen, sondern künstliche Einheiten, die neu in der Natur erscheinen. Damit sind sie dem tierischen System fremd und in der Lage, die Synthese von spezifischen Antikörpern zu induzieren. Eine der ersten Bedingungen für die antigene Wirkung ist, daß die Substanz dem tierischen Empfängersystem gegenüber nicht verwandt sein darf. Flavin-adenin-dinucleotide und andere Coenzyme, die in allen Zellen gemein und in ihren natürlichen Bindungen mit spezifischen Proteinen nicht-antigen sind, können analog der p-Aminobenzoesäure antigenen Charakter erlangen, wenn sie mit dem gleichen Protein durch Azo-Bindungen verbunden sind. Sie besitzen jedoch dann keine Coenzym-Funktion mehr. Im Hinblick auf diese Zusammenhänge kann die Erklärung spezifischer Wirkungen, die durch künstliche Antigene entwickelt werden, nicht von natürlichen und unveränderten einfachen sowie konjugierten Proteinen her erwartet werden.

Die Existenz künstlicher Antigene zeigt jedoch, daß die Molekeln verschiedener Eiweißkörper innerhalb und außerhalb der Nativzellen eine große Anzahl von Entwicklungsmöglichkeiten haben, um neue und nicht voraus-veranlagte Spezifitäten oder Verhaltensweisen unter verschiedenen künstlichen Bedingungen oder unter Einfluß von Fremdstoffen zu entwickeln, die nicht durch den Eiweißkörper oder seine Umgebung zerstört werden können.

### **Heterogenität der Molekel-Population innerhalb einer molekularen Art**

Seit langer Zeit kennen wir die Heterogenität der Zellen in Populationen einer Zellart. Die einzelnen Zellen variieren im Hinblick auf Stoffwechselfunktionen, Virulenz, Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber Arzneimitteln usw. Wir kennen weiter die Heterogenität von Atomen einer Art. Es gibt schwerere und leichtere, radioaktive und nicht-radioaktive Atome. Während der letzten Jahre haben die Ergebnisse zahlreicher Forscher gezeigt, daß die Molekel in mehrfach umkristallisierten Eiweißkörpern und Enzymen

keine absolute Homogenität zeigen. *Jacobsen* trennte (1947) aus Chymothrypsin  $\pi$ -Chymothrypsin, welches zwei bis zweieinhalb mal so aktiv ist wie das gewöhnliche  $\alpha$ -Chymothrypsin. Aus  $\pi$ -Chymothrypsin wurde weiter durch thryptische und autolytische Hydrolyse  $\delta$ -Chymothrypsin abgetrennt, welches anderthalbmal so aktiv ist wie  $\alpha$ -Chymothrypsin, das andere autolytische Produkt des  $\pi$ -Chymothrypsins. *Kunitz* (1938) hat bereits früher  $\alpha$ -Chymothrypsin isoliert und aus der Mutterlauge die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Chymothrypsine erhalten, die von der  $\alpha$ -Form durch Löslichkeit, kristalline Form und die Inaktivierungsgeschwindigkeit durch Alkali, Säuren oder Harnstoff unterschieden sind. Damit gibt es sechs verschiedene molekulare Chymothrypsin-Einheiten. Papain wurde in der oxydierten  $\alpha$ -Form sowie nach Reduktion in der  $\beta$ -Form nachgewiesen. Die  $\beta$ -Form ergibt in Kombination mit einem Coenzym (SH-Verbindung) verschiedene Enzyme. Wir kennen  $\alpha$ -,  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Globulin, vier verschiedene Arten von  $\beta_1$ -Globulin und ein  $\beta_2$ -Globulin sowie verschiedene Molekulargewichte von den  $\gamma$ -Globulinen. In immuno-elektrophoretischen Untersuchungen (*Williams* und *Grabar* 1955) mit Serumeiweißkörpern wurde die Gegenwart einer Globulin-Gruppe von zwei  $\alpha_1$ -Globulinen, vier  $\beta_1$ -Globulinen, fünf  $\alpha_2$ -Globulinen und einem  $\beta_2$ -Globulin, die als Antigene verwandt waren, beobachtet. *Pollock* (1956) berichtete über die Existenz von zwei immunologisch und physikochemisch unterschiedlichen, jedoch enzymatisch ähnlichen Penicillasen in *Bacillus cerius*.

In einem ausführlichen Übersichtsartikel trugen *Colvin* und seine Mitarbeiter (1954) Beweismaterial zur Heterogenität von hochgereinigten Eiweißkörpern zusammen. Studien über Sedimentation, Diffusion, Elektrophorese, Phasenverteilung und Löslichkeitstest als Kriterium der Reinheit sowie Chromatographie, Aminosäure-Zusammensetzung, Aminosäure-Reihenfolge und immunologische Studien ergeben Unterschiede zwischen individuellen Molekeln der Präparationen im Hinblick auf Molekulargewicht, Ladungsdichte, Zusammensetzung, molekulare Konfiguration (indirekter Nachweis), Löslichkeit und biologische Aktivität. Es gibt drei Arten von kristalliner Hefe-D-glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, A- und B-Lactoperoxidase, A- und B-Pankreasribonuclease, drei Komponenten im Lysozym,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - sowie die  $\pi$ -Formen des Chymothrypsins, drei Komponenten im Cytochrom c und fünf verschiedenen Formen von Hämoglobin usw. Einige Unterschiede können durch physikalische Methoden, jedoch nicht immunologisch erfaßt werden.

### **Multikatalytische Funktionen von Enzymen**

Auf der Grundlage von enzymatischen und antigenen Eigenschaften von Enzymen und toxischen Eiweißkörpern wurde vorgeschlagen anzunehmen (*Sevag* 1954), daß Eiweißkörper spezifisch-multikatalytische Funktionen entwickeln könnten. Papain katalysiert proteolytische Vorgänge, Synthesen von Peptiden (*Bergmann* 1942), die Gerinnung der Milch (*Hinkel* und *Zippin* 1951) sowie Fibrinogen (*Eagle* und *Harris* 1937), die Spaltung der Mesoxalsäure zur Glyoxylsäure, CO<sub>2</sub> und Wasser (*Brunel-Chapelle* 1953), die Hydrolyse von Glyceryltriacetat (*Falk* 1933) sowie die Synthese spezifischer Antikörper (*Haas* 1940). Diese Eigenschaften können nicht durch fraktionierte Reinigung voneinander getrennt werden.

Acetylcholinesterase katalysiert die Hydrolyse von Acetylcholin, Äthylacetat, die Austauschreaktion zwischen R-CO<sup>18</sup>O<sup>18</sup>H und 2 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O unter Bildung von R-CO<sup>18</sup>OH und 2 H<sub>2</sub><sup>16</sup>O (*Bentley* und *Rittenberg* 1954). Sie katalysiert weiter den Austausch von Sauerstoff-Atomen zwischen Thioessigsäure und H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (*Wilson* 1951).

Triosephosphat-dehydrogenase. Mehrfach umkristallisierte Präparationen katalysieren folgende Reaktionen (Krimsky und Racker 1952, Racker und Krimsky 1952, Harting und Velick 1952): a) die Arsenolyse von Acetylphosphat in Abwesenheit eines Systems zur Reduktion von DPN sowie den schnellen  $^{32}\text{P}$ -Austausch mit Phosphat von Acetyl-Phosphat; b) die Übertragung von Acetylphosphat auf entweder Glutathion oder Coenzym A unter Bildung von Acetylglutathion; c) die Hydrolyse von Thioestern oder ihrer Reduktion in Gegenwart von DPNH; die Bildung von Acetyl-CoA aus Coenzym A, GSH und Acetylphosphat bei Bestimmung der Acetylsulfonamid-Bildung sowie von Citrat aus Oxalacetat.

$\alpha$ -Chymotrypsin (kristallin) katalysiert a) die Gerinnung der Milch, jedoch nicht die Gerinnung von Fibrinogen oder Blut; b) die Hydrolyse von Eiweißkörpern; c) die Hydrolyse von Polypeptiden, wobei Tyrosin oder Phenylalanin als Carboxyl-Gruppen vorliegen müssen, die Synthese von Benzoyl-L-tyrosyl-glycinanilid vom Benzoyl-L-tyrosin und Glycinanilid (Bergmann und Fruton 1937); d) die Hydrolyse von Carbobenzoxy-L-glutaminyl-L-tyrosylglycinamid an der Tyrosyl-carboxyl-peptid-Bindung (Bergmann und Fruton 1941); e) die Hydrolyse von Hydraziden und Hydroxamiden (Neurath und Schwert 1950); f) die Hydrolyse von Methyl- und Äthylestern von  $\alpha$ -Benzoxo-L-arginin und Carbobenzoxy-glycyl-L-tyrosin und Carbobenzoxy-glycyl-DL-phenylalanin (Schwert und Mitarbeiter 1948); g) den Austausch des Carboxyl-Sauerstoffs in Carbobenzoxy-L-phenylalanin mit  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (Sprinson und Rittenberg 1941, Doherty und Vaslow 1952); h) die Spaltung von  $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COO}\cdot\text{C}_2\text{H}_5$  zu  $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$  und  $\text{CH}_3\cdot\text{COO}\cdot\text{C}_2\text{H}_5$  (Doherty und Thomas 1954); i) die Übertragung der Acetyl-Gruppe von Nitrophenylacetat auf aliphatische Alkohole von niedrigem Molekulargewicht (McDonald und Balls 1956) und j) die Synthese von spezifischen Antikörpern (TenBroeck 1934).

Die oben diskutierten multikatalytischen Funktionen von Enzymen können folgende Grundlagen haben:

a) kristalline Enzympräparationen repräsentieren nahverwandte mikroheterogene Molekeln oder

b) Enzyme existieren in tautomeren Formen in Gleichgewichtszuständen; die tautomeren Formen vollziehen verschiedene Typen von katalytischen Funktionen oder

c) jede Enzym-Molekel besitzt verschiedene aktive Positionen, von denen jede für eine besondere Reaktion verantwortlich ist oder

d) jedes Enzym besitzt eine einzige aktive Stelle, welche von verschiedenen Substraten zu verschiedenen Funktionen induziert wird.

### Zusammenfassende Bemerkungen

Es wird die Umwandlung von normalen Globulinen zu stabilen und räumlich spezifischen Strukturen unter dem Einfluß von Fremdproteinen diskutiert. Es wird betont, daß Globuline in so viele spezifische Formen umgewandelt werden können, als es antigen wirksame, molekulare Arten von Proteinen gibt. Die Komplexität, die Anzahl der polaren Gruppen, innere elektrostatische Kräfte, die Möglichkeiten für Wasserstoff-Brückenbindungen und andere, nicht bekannte Möglichkeiten einer Protein-Molekel können für die zahllosen Veränderungen, die sie erfahren kann, verantwortlich gemacht werden. Es wurde außerdem darauf hingewiesen, daß mehrfach kristallisierte Enzyme nach den Angaben der Literatur eine Mikroheterogenität repräsentieren und in der Lage sind, multikatalytische Funktionen auszuüben. Wir wissen nichts über den Ursprung der Mikroheterogenität von kristallisierten Proteinen und Enzymen.

Man darf wohl annehmen, daß die Fähigkeit der Globulin-Molekel zu einer Vielzahl von Abwandlungen nicht eine auf sie beschränkte Eigenart ist. Es ist durchaus anzunehmen, daß auch die anderen Proteine, welche die Strukturen der Gewebszellen, tierischen, mikrobiologischen oder pflanzlichen Ursprungs ausmachen, durch Reaktion mit Fremdstoffen von protein-artiger oder nicht-protein-artiger Natur modifiziert werden können. Eine derartige Vorstellung würde die Stoffwechsel-Veränderungen erklären können, die von der Wirkung von Arzneimitteln herühren, weiter auch die Wirkung von Bestrahlung, von endogenen metabolischen Hemmstoffen und physikalischen Wirkstoffen. Ein anormaler oder verschwenderischer Stoffwechsel bei Mikroorganismen, Überempfindlichkeitszustände, Arzneimittelallergie, narkotische Sucht, anormales Wachstum und andere reversible und irreversible Störungen bei höheren Organismen können auf die räumlichen Modifikationen, Deformierungen oder auf eine „Paralyse“ von funktionellen Proteinen entsprechender Systeme zurückgeführt werden (zur weiteren Diskussion s. Sevag, Reed, Reynolds 1955; Sevag 1946, 1956; Ishii und Sevag 1957; Lam und Sevag 1957).

Die Veränderungen sind nicht immer tödlich oder toxisch. Es gibt Beispiele, bei denen die Wirkung von toxischen Arzneimitteln auf die Dauer die funktionelle Kapazität einer lebenden Zelle gegenüber toxischen Wirkungen der Stoffe potenzieren oder verstärken. Die Weisheit der Enzymsysteme oder des genetischen Zellenapparates ist mit den Möglichkeiten zur progressiven Evolution ausgestattet. Die Chemie, die Biologie und Physik könnten in der Zukunft, wenn sie von tiefem Verständnis und schöpferischer Phantasie geleitet werden, die Geheimnisse der Protein-Molekel aufdecken, mit dem Ziele zweckgerichteter, veränderter Funktionen.

*Professor Stewart Mudd bin ich für seine vielen wertvollen Vorschläge und Kritiken, die er während der Vorbereitung dieser Arbeit gegeben hat sowie für sein immerwährendes Interesse zu Dank verbunden.*

### Summary

The present discussion treats the proteins and nucleic acids, constituents of hereditary units, as possessing the potentialities for numerous alterations resulting from interactions with foreign agents, e. g. toxins, proteins, drugs, radiation, et cetera. These alterations are considered responsible for abnormal metabolism of cells, e. g. disease conditions, hypersensitive states, allergy, narcotic addictions, resistance to drugs, abnormal growth, mutations, genetic blocks, et cetera. The alterations introduced into the synthesis of globulins, yielding antibody molecules, by foreign antigenic natural and artificial proteins are discussed as examples for similar alterations of tissue proteins and unicellular systems. Various theories are considered from the chemical and enzymatic view points and it is concluded that the antigenic substances function as biocatalysts in conjugation with globulin synthesizing cells. Resulting antibody molecules are shown to function as specific inhibitors of the biological functions of responsible antigenic proteins. Since proteins, if functioning as antibody producers in their native cells, would have stimulated the synthesis of specifically inhibitory antibodies and thereby have caused the death of cells, the antigenicity of proteins is considered as an alien behavior. Manifested only in a foreign multicellular living system, antigenicity must, therefore, be considered not a native characteristic but as an extrinsic behavior and an expansion of another genetically determined inherent characteristic of a protein. An-

tigenic and biocatalytic specificities are believed to originate from the same centers. Only thus can we account for equipotent specificities, neutralization of the biological activities of proteins, the competitive antagonism between the specific substrate and antibody and the mechanisms of immune protection against infectious agents.

Highly purified and severalfold crystallized preparations of proteins are reported to consist of microheterogeneous population of molecules. The reason for this is not known. Also several fold crystalline enzymes are reported to manifest multicatalytic functions. Possible reasons for this behavior are advanced.

It is suggested that physics, chemistry and biology directed with deep understanding and creative imagination may in future unravel the secrets of the protein molecule for purposefully altered functions.

Übersetzt von Dr. Benno Hess, Heidelberg

Eingegangen am 11. März 1957 [A 815]

## Literatur

- <sup>1)</sup> M. H. Adams, J. exper. Medicine 76, 175 [1942].
- <sup>2)</sup> J. Alexander, Protoplasma 14, 296 [1931].
- <sup>3)</sup> C. B. Anfinsen, N. F. Harrington, H. Hvedt, K. Linderstrom-Lang, M. Ottesen u. J. Schellmann, Biochim. biophysica Acta 17, 141 [1955].
- <sup>4)</sup> B. A. Askonas, J. H. Humphrey u. R. R. Porter, Biochem. J. 63, 412 [1956].
- <sup>5)</sup> A. Bach u. W. Engelhardt, Biochem. Z. 135, 39 [1922].
- <sup>6)</sup> R. Bentley u. D. Rittenberg, J. Amer. chem. Soc. 76, 4883 [1954].
- <sup>7)</sup> M. Bergmann, Adv. in Enzymol. 2, 49 [1942].
- <sup>8)</sup> M. Bergmann u. J. S. Fruton, J. biol. Chemistry 118, 405 [1937]; 124, 321 [1938].
- <sup>9)</sup> M. Bergmann u. J. S. Fruton, Adv. in Enzymol. 1, 63 [1941].
- <sup>10)</sup> R. E. Billingham, L. Brent u. P. B. Medawar, Nature [London] 172, 603 [1953].
- <sup>11)</sup> F. Binkley, Chem. Engng. News 33, 4033 [1955].
- <sup>12)</sup> W. C. Boyd: The Proteins, Bd. II, Teil B, Academic Press 1954.
- <sup>13)</sup> W. C. Boyd: Fundamentals of Immunology, Interscience Publishers, New York 1956.
- <sup>14)</sup> F. Breinl u. F. Haurowitz, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 192, 45 [1930].
- <sup>15)</sup> G. Brunel-Chapelle, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 236, 2162 [1953].
- <sup>16)</sup> E. Bueding u. J. A. MacKinnon, J. biol. Chemistry 215, 507 [1955].
- <sup>17)</sup> F. M. Burnet u. F. Fenner: The production of Antibodies, 2. Aufl. Macmillan Co., Melbourne 1949.
- <sup>18)</sup> F. M. Burnet, M. Freeman, A. V. Jackson u. D. Lush: The Production of Antibodies, Macmillan Co., Melbourne 1941.
- <sup>19)</sup> B. Cinader, Biological Society Symposia, No. 10, S. 16 [1953].
- <sup>20)</sup> B. Cinader, Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 761 [1955].
- <sup>21)</sup> G. Cohen-Bazire u. M. Jolitt, Ann. Inst. Pasteur 84, 69 [1953].
- <sup>22)</sup> M. Cohn u. J. Monod: Adaptation in Microorganisms, Cambridge University Press, England 1953.
- <sup>23)</sup> M. Cohn u. J. Monod, Biochim. biophysica Acta 7, 153 [1951].
- <sup>24)</sup> J. R. Colvin, D. B. Smith u. W. H. Cook, Chem. Reviews 54, 687 [1954].
- <sup>25)</sup> D. G. Doherty u. F. Vaslow, J. Amer. chem. Soc. 74, 93 [1952].
- <sup>26)</sup> D. G. Doherty u. Lucille Thomas, Feder. Proc. 13, 200 [1954].
- <sup>27)</sup> D. E. Dolbey, D. A. Hall u. F. C. Happold, Brit. J. Exper. Path. 33, 304 [1952].
- <sup>28)</sup> W. L. Duthie u. M. C. Adant, Biochem. J. 28, 1659 [1934].
- <sup>29)</sup> E. S. Duthie, J. Gen. Microbiol. 10, 427 [1954].
- <sup>30)</sup> H. Eagle u. T. H. Harris, J. Gen. Physiol. 20, 543 [1937].
- <sup>31)</sup> K. G. Falk, J. biol. Chemistry 103, 363 [1933].
- <sup>32)</sup> E. Fischer: Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine II. Julius Springer, Berlin, 1923, S. 21.
- <sup>33)</sup> M. C. Gessard, Ann. Inst. Pasteur 15, 593 [1901]; C. R. hebd. Soc. Biol. Paris, 54, 551 [1902]; 55, 227 [1903]; 60, 505 [1906].
- <sup>34)</sup> H. Green u. H. S. Anker, Biochim. biophysica Acta 13, 365 [1954].
- <sup>35)</sup> P. Gross, J. Coursaget u. M. Macheboeuf, Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 1070 [1952].
- <sup>36)</sup> R. Haas, Biochem. Z. 305, 280 [1940].
- <sup>37)</sup> H. C. Halvorson u. S. Spiegelman, J. Bacteriol. 65, 496, 601 [1953].
- <sup>38)</sup> J. Harting u. S. Velick, Feder. Proc. 11, 226 [1952].
- <sup>39)</sup> E. N. Harvey u. J. E. Deitrick, J. Immunol. 18, 65 [1930].
- <sup>40)</sup> F. Haurowitz, Biol. Reviews, Cambridge Phil. Soc. 27, 247 [1952].
- <sup>41)</sup> F. Haurowitz, private Mitteilung, 5. März 1954.
- <sup>42)</sup> F. Haurowitz, M. Vardar u. P. Schwerin, J. Immunol. 43, 327 [1942].
- <sup>43)</sup> M. Heidelberger, Ann. Rev. Biochem. 25, 641 [1956].
- <sup>44)</sup> W. F. Henion, T. E. Mansour u. E. Bueding, Exper. Parasitol. 14, 40 [1955].
- <sup>45)</sup> L. F. Hewitt: Adaptation in Microorganisms, Cambridge University Press, England 1953, S. 198.
- <sup>46)</sup> H. Hildebrandt, Virchows Arch. 131, 5 [1893].
- <sup>47)</sup> E. T. Hinkel jr. u. C. Zippin, Ann. N. Y. Acad. Sciences [New York] 54, 1228 [1951].
- <sup>48)</sup> E. Holiday, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. A. 170, 79 [1939].
- <sup>49)</sup> S. B. Hooker u. W. C. Boyd, J. Immunol. 23, 465 [1932].
- <sup>50)</sup> R. D. Housewright u. R. J. Henry, J. Bacteriol. 53, 241 [1947].
- <sup>51)</sup> A. F. Howe u. H. P. Treffers, Nature [London] 170, 123 [1952].
- <sup>52)</sup> K. Ishii u. M. G. Sevag, Bact. Proceedings (USA), S. 71 [1957].
- <sup>53)</sup> C. F. Jacobson, C. R. trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 25, 325 [1947].
- <sup>54)</sup> H. Kacser: Adaptation in Microorganisms. Cambridge University Press, England, 1953, S. 180.
- <sup>55)</sup> S. M. Kalman, K. Linderstrom-Lang, M. Ottesen u. F. M. Richards, Biochim. biophys. Acta 16, 297 [1955].
- <sup>56)</sup> E. G. Krebs u. V. A. Najjar, J. exper. Medicine 88, 569 [1948].
- <sup>57)</sup> J. Krimsky u. E. Racker, J. biol. Chemistry 198, 721 [1952].
- <sup>58)</sup> M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 22, 207 [1938].
- <sup>59)</sup> F. Kubowitz u. P. Ott, Biochem. Z. 314, 94 [1943].
- <sup>60)</sup> G. T. Lam, R. J. Mandle u. K. Goodner, J. Infect. Diseases 97, 268 [1955].
- <sup>61)</sup> G. T. Lam u. M. G. Sevag, Bact. Proceedings (USA) S. 35 [1957].
- <sup>62)</sup> K. Landsteiner, Exper. Medicine 75, 269 [1942].
- <sup>63)</sup> K. Landsteiner u. W. M. Chase, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 30, 1413 [1933].
- <sup>64)</sup> J. Lederberg: Genetics in the 20th Century, Edited by L. C. Dunn, Macmillan Co., New York, 1951.
- <sup>65)</sup> G. Lester u. D. M. Bonner, J. Bacteriol. 63, 759 [1952].
- <sup>66)</sup> H. Luers u. F. Albrecht, Fermentforsch. 8, 52 [1926].
- <sup>67)</sup> M. McCarty, J. Gen. Physiol. 29, 123 [1946].
- <sup>68)</sup> M. McCarty, J. exper. Medicine 90, 543 [1949].
- <sup>69)</sup> K. MacKawa u. K. Kitozawa, J. Agr. Chem. Soc. [Japan] 28, 363 [1954].
- <sup>70)</sup> D. McClean u. C. W. Hale, Biochem. J. 35, 159 [1941].
- <sup>71)</sup> C. E. McDonald u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 227, 993 [1956].
- <sup>72)</sup> M. G. Macfarlane u. B. C., J. G. Knight, Biochem. J. 35, 884 [1941].
- <sup>73)</sup> P. D. McMaster, H. Kruse, E. Sturm u. J. L. Edwards, J. exp. Medicine 100, 341 [1954].
- <sup>74)</sup> T. E. Mansour, E. Bueding u. A. B. Stavitsky, Brit. J. Pharm. Chemother. 9, 182 [1954].
- <sup>75)</sup> J. R. Marrack: The Chemistry of Antigens and Antibodies, Med. Res. Council, Special Report Series, No. 230, London 1938.
- <sup>76)</sup> E. Maschmann, Biochem. Z. 295, 351 [1937].
- <sup>77)</sup> A. A. Marucci u. M. Mayer, Feder. Proc. 11, 476 [1952].
- <sup>78)</sup> R. E. Miller, V. Z. Pasternak u. M. G. Sevag, J. Bacteriol. 58, 621 [1949].
- <sup>79)</sup> S. Mudd, J. Immunol. 23, 423 [1932].
- <sup>80)</sup> J. H. Northrop, J. Gen. Physiol. 25, 465 [1942].
- <sup>81)</sup> H. Neurath u. G. W. Schwert, Chem. Reviews 46, 69 [1950].
- <sup>82)</sup> K. Ohta, Biochem. Z. 54, 430 [1913].
- <sup>83)</sup> R. D. Owen u. C. L. Markert, J. Immunol. 74, 257 [1955].
- <sup>84)</sup> E. A. Papenoe u. V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 206, 353 [1954].
- <sup>85)</sup> V. Z. Pasternak, M. G. Sevag u. R. E. Miller, J. Bacteriol. 61, 189 [1951].
- <sup>86)</sup> L. Pauling, J. Amer. chem. Soc. 62, 2640 [1940].
- <sup>87)</sup> L. Pauling, Endeavour 7, 43 [1948].
- <sup>88)</sup> L. Pauling in: The Specificity of Serological Reactions, K. Landsteiner: Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1945.
- <sup>89)</sup> G. E. Perlmann, Nature [London] 173, 406 [1954].
- <sup>90)</sup> J. G. Pierce u. V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 199, 929 [1952].
- <sup>91)</sup> M. R. Pollock, J. Gen. Microbiol. 15, 154 [1956].
- <sup>92)</sup> M. R. Pollock: Adaptation in Microorganisms. Cambridge University Press, England 1953.
- <sup>93)</sup> R. R. Porter, Biochem. J. 46, 473 [1950].
- <sup>94)</sup> E. Racker u. J. Krimsky, J. biol. Chemistry 198, 731 [1952].
- <sup>95)</sup> E. A. Roberts u. A. Q. Wells, Quart. J. exp. Physiol. 27, 95 [1937].
- <sup>96)</sup> G. M. Sartory u. J. Meyer, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. Biol. 225, 79 [1947].
- <sup>97)</sup> H. Schade: Physikal. Chemie in der inneren Medizin, S. 211, 1923. Verlag von Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig.
- <sup>98)</sup> G. M. Schwab (mit H. S. Taylor u. R. Spence): Catalysis from the standpoint of Chemical Kinetics, D. Van Nostrand Company, N. Y., 1937.
- <sup>99)</sup> G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufman u. J. E. Snoko, J. biol. Chemistry 172, 221 [1948].
- <sup>100)</sup> A. Seabra u. H. F. Deutsch, J. biol. Chemistry 214, 447 [1955].
- <sup>101)</sup> W. H. Seegers: The Enzymes. Bd. 1, Teil 2. S. 1106, Academic Press, N. Y., 1951.
- <sup>102)</sup> M. G. Sevag, Adv. Enzymol. 6, 33 [1946], Interscience Publishers, New York.
- <sup>103)</sup> M. G. Sevag: Immunocatalysis, Charles C. Thomas Co., Springfield, Illinois, 1945, 1951.
- <sup>104)</sup> M. G. Sevag, Ergebn. d. Hygiene 28, 424 [1954].
- <sup>105)</sup> M. G. Sevag, Ann. Allergy 14, 233 [1956].
- <sup>106)</sup> M. G. Sevag, R. D. Reid u. O. E. Reynolds: Origins of Resistance to Toxic Agents, Academic Press, New York, 1955.
- <sup>107)</sup> G. M. Sickels u. M. Shaw, J. Immunol. 64, 21 [1950].
- <sup>108)</sup> I. W. Sizer, Science [Washington] 116, 275 [1952].
- <sup>109)</sup> E. L. Smith, B. V. Jager, R. Lumry u. R. Glantz, J. biol. Chemistry 199, 789 [1952].
- <sup>110)</sup> J. Smolens u. J. Charney, J. Bacteriol. 54, 101 [1947].
- <sup>111)</sup> J. Smolens u. M. G. Sevag, J. Gen. Physiol. 26, 11 [1942].
- <sup>112)</sup> S. Spiegelman u. H. O. Halvorson: Adaptation in Microorganisms Cambridge University Press, England 1953.
- <sup>113)</sup> D. B. Sprinson u. D. Rittenberg, Nature [London] 167, 484 [1951].
- <sup>114)</sup> E. Soru, persönl. Mitteilg., 1956.
- <sup>115)</sup> J. B. Sumner, Ergebn. Enzymforsch. 6, 201 [1937].
- <sup>116)</sup> A. R. Taborda, L. C. Taborda, J. N. Williams jr. u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 194, 227 [1952]; 195, 207 [1952].
- <sup>117)</sup> M. Tager u. H. B. Hales, J. Immunol. 60, 475 [1948].
- <sup>118)</sup> W. H. Taliaferro u. D. W. Talmadge, J. Infect. Diseases 97, 88 [1955].
- <sup>119)</sup> C. Ten Broeck, J. biol. Chemistry 106, 729 [1934].
- <sup>120)</sup> A. Tiselius u. J. Erickson-Quensel, Biochem. J. 33, 1752 [1939].
- <sup>120a)</sup> H. J. Vogel in: The Chemical Basis of Heredity, Baltimore, Maryland 1957, S. 276.
- <sup>121)</sup> A. J. Weil, J. A. Parfentjev u. K. L. Bowman, J. Immunol. 35, 399 [1938].
- <sup>122)</sup> C. A. Williams, jr. u. P. Grabar, J. Immunol. 74, 155 [1955].
- <sup>123)</sup> R. Willstätter, Naturwissenschaften 1927, 585.
- <sup>124)</sup> J. B. Wilson, Biochim. biophysica Acta 7, 520 [1951].
- <sup>125)</sup> T. Winnick, J. biol. Chemistry 152, 465 [1944].