

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

73. Jahrgang · Nr. 5 · Seite 153–176 · 7. März 1961

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT · DIE CHEMIE ·

Untersuchungen über die Natur der Antikörper

Von Prof. Dr. F. HAUROWITZ*)

Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA

Antigene, seien es pathogene Erreger oder künstliche chemische Verbindungen, veranlassen im Körper die Bildung von Antikörpern großer Spezifität, welche die Ursache der späteren Immunität sind. Die Spezifität ist u. a. in den räumlichen Formen der beteiligten Moleküle begründet. Antigen und Antikörper passen zueinander wie Matrize und Abguß (Faltung der Peptidketten). Über Einzelheiten der Antikörperbildung wird sich erst Entscheidendes sagen lassen, wenn wir mehr über die Biosynthese der Proteine und besonders der Serumglobuline wissen. Die wesentlichen Anschauungen und Theorien neuerer Zeit leiten sich noch von Ehrlichs Idee der Komplementarität ab.

Unter dem Ausdruck „Immunität“ verstehen wir im allgemeinen die Widerstandsfähigkeit gegen die eine oder andere Art von pathogenen Erregern. Der Organismus bildet nach dem Eindringen dieser Erreger Antikörper, welche die Bakterien immobilisieren oder in anderer Weise schädigen. Man hat die eindringenden Erreger als Antigene bezeichnet und hat dann später ganz allgemein den Ausdruck Antigen auch auf andere Materialien ausgedehnt, die eine Antikörperbildung hervorrufen.

Die Immunologie hatte anfänglich nichts mit Chemie zu tun. Die ersten Antigene waren nicht chemische Substanzen, sondern komplizierte Organismen. Um die Jahrhundertwende wurde es jedoch klar, daß nicht nur Bakterien sondern häufig auch deren Extrakte antigen Wirkung haben und Antikörperbildung hervorrufen können. In vielen Fällen wirken auch Kochextrakte antigen. Solche Antigene waren demnach hitzebeständig. Schließlich erwiesen sich auch kristallisierte Proteine, etwa kristallisiertes Ovalbumin, als antigen. Injiziert man einem Kaninchen ein solches antigenes Protein, so findet man nach wenigen Tagen, daß das Blutserum des Kaninchens mit dem injizierten Protein *in vitro* gemischt einen Niederschlag gibt. Es enthält demnach Antikörper, welche Ovalbumin oder ein anderes injiziertes Protein präzipitieren. Die Reaktion ist außerordentlich spezifisch. Wir nennen die die Präzipitation verursachenden Antikörper Präzipitine. Die Präzipitin-Reaktion ähnelt in ihrer Einfachheit chemischen Fällungsreaktionen. Sie bildet die Grundlage der modernen Immunochemie. Es muß jedoch betont werden, daß im lebenden Organismus andere Immunitätsreaktionen oft eine größere Bedeutung haben.

Die wichtigsten dieser Reaktionen sind die Agglutination oder die Lyse von Bakterien oder anderen Zellen, deren Phagozytose, und die Neutralisation von Toxinen durch Antitoxine. Der diesen Reaktionen zugrunde liegende Vorgang ist jedoch in allen Fällen der gleiche, nämlich die

Bildung einer Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Da dies auch der Vorgang ist, der die Präzipitation von löslichen Antigenen durch Präzipitine verursacht, kann man die an der Präzipitinreaktion gewonnenen Erfahrungen auch auf die anderen Immunitätsreaktionen übertragen.

Die erste Injektion eines löslichen Antigens hat, wenn dieses nicht etwa toxisch ist, keine nachteiligen Wirkungen auf den Organismus. Die nach wenigen Tagen im Blutserum auftretenden Präzipitine verschwinden im Laufe von 1 bis 2 Wochen und das Tier verhält sich in jeder Beziehung normal. Injiziert man jedoch einem solchen Tier das gleiche Antigen ein zweites Mal, dann kommt es häufig zu schweren Störungen. Das Tier wird unruhig, seine Atmung erschwert, und der Tod kann durch Krämpfe der Bronchialmuskulatur eintreten. Es geht aus dieser Beschreibung hervor, daß die Bildung von Antikörpern für ihren Träger nicht immer günstig ist. Sie können im Gegenteil schwere Schädigung hervorrufen. Der Ausdruck Immunität ist für solche Erscheinungen nicht angemessen. Man spricht häufig von Überempfindlichkeit, von Sensibilisierung, oder von Allergie. Es besteht jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen diesen Phänomenen und der Immunität im engeren Sinne, der Schutzwirkung der Antikörper. Beide Prozesse gehen letzten Endes auf den gleichen Vorgang zurück, auf die gegenseitige Bindung von Antigen und Antikörper.

Eine der auffallendsten Folgen der zweiten Injektion ist, daß das sensibilisierte Tier, wenn es die Reinjektion überlebt, einen sehr schnellen Anstieg der Antikörper im Blut aufweist und daß der Antikörpergehalt des Blutes viel höher ist als nach der ersten Injektion. Diese erhöhte Reaktivität ist ganz spezifisch und tritt nur ein, wenn das zweite injizierte Antigen mit dem zuerst injizierten Antigen identisch ist. Es macht fast den Eindruck, daß sich der Organismus an das zuerst injizierte Antigen geradezu erinnern würde. Man spricht deshalb auch von einer „anamnestischen“ Reaktion.

Die erste Erklärung dafür wurde von Ehrlich gegeben, der annahm, daß im Körper für jede Art der injizierten oder eindringenden Antigene spezifische „Rezeptoren“ vorhanden seien. Die Rezeptoren sind nach Ehrlich dem eindringenden Antigen räumlich angepaßt und können sich

*) Erweiterte Fassung eines am 14. März 1960 im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/M. anlässlich der Verleihung des Ludwig-Darmstädter- und Paul-Ehrlich-Preises gehaltenen Vortrages. — Die in diesem Vortrag erwähnten Experimentalarbeiten wurden während der letzten Jahre durch Forschungsstipendien der National Science Foundation und des U.S. Public Health Service und durch Mittel, die der Indiana University von der Atomic Energy Commission und dem Office of Naval Research zur Verfügung gestellt wurden, großzügig unterstützt.

daher mit ihm spezifisch vereinigen. Die Rezeptorentheorie wurde zu einer Zeit vorgeschlagen, als man unter der Bezeichnung „Antigen“ vorwiegend Bakterien oder Zellen anderer Organismen verstand, z.B. artfremde rote Blutkörperchen. *Ehrlich* nahm an, daß gewisse Zellen Rezeptoren für ein Antigen A tragen, andere Zellen Rezeptoren für ein anderes Antigen B, wieder andere für ein Antigen C, und so fort. Wenn nun eines dieser Antigene injiziert wird, wird es vom homologen Rezeptor abgefangen und dieser wird nun überstürzt neugebildet, regeneriert. *Ehrlichs* geniale Rezeptorentheorie war der erste erfolgreiche Versuch zu einer umfassenden Erklärung aller Immunitätserscheinungen.

Die Spezifität der Antigene

Die moderne Immunchemie wurde durch die grundlegenden Arbeiten *Karl Landsteiners*¹⁾ ins Leben gerufen. *Landsteiner* modifizierte Proteinmoleküle durch Kupplung mit einer großen Zahl von aromatischen Aminosäuren. Er zeigte, daß der tierische Organismus imstande ist, gegen jedes dieser künstlich erzeugten Azoproteine Antikörper zu bilden, die sich ganz spezifisch an die *in vitro* erzeugte chemische Gruppe binden und das diese Gruppe tragende Protein präzipitieren. Man kann z.B. Sulfanilsäure diazotieren und die gebildete Diazobenzolsulfonsäure an die Tyrosin- oder Histidin-Reste der Proteine kuppeln. So gebildete Azoproteine sind rotbraun und im allgemeinen in Wasser leicht löslich. Injiziert man einem Kaninchen ein solches Azoprotein, das p-Azophenyl-sulfonsäure-Gruppen enthält, so bildet das Tier Antikörper, die sich ganz spezifisch mit dem injizierten Azoprotein verbinden, aber auch mit Azoproteinen, in denen die p-Azophenyl-sulfonat-Gruppe an andere Proteine gebunden ist. Die Präzipitation dieser Proteine läßt sich durch Zusatz größerer Mengen von p-Azophenyl-sulfonsäure-Derivaten des Tyrosins oder auch von entspr. Derivaten anderer Phenole hemmen, nicht jedoch durch die analogen m- oder o-Azophenylsulfonate. Azoproteine, welche die m- oder o-Azophenylsulfonat-Gruppe tragen, werden durch Antikörper gegen die p-Azophenylsulfonat-Proteine nicht präzipitiert, wohl aber durch Antikörper gegen Azoproteine, welche die m- oder o-Azophenylsulfonat-Gruppe enthalten.

In anderen Versuchen hat *Landsteiner* gezeigt, daß man nicht nur o-, m- und p-Verbindungen serologisch voneinander unterscheiden kann, sondern auch cis- und trans-Verbindungen oder D- und L-Verbindungen. Aus all diesen Beobachtungen geht hervor, daß sich die Spezifität der Antikörper nicht gegen das große Azoproteinmolekül als Ganzes richtet, sondern nur gegen eine bestimmte Gruppe desselben. Wir bezeichnen diese Gruppe als die determinante Gruppe des Antigens. Aus *Landsteiners* Versuchen geht klar hervor, daß die Spezifität der immunologischen Reaktionen eine Chemospezifität ist.

Mit Hilfe der Diazoreaktion kann man viele Substanzen unter milden Bedingungen an Proteine kuppeln. Man arbeitet im allgemeinen in der Kälte bei pH 8 bis 9. Die Azoproteine lassen sich durch Umfällen oder durch Dialyse reinigen. Verbindungen, die sich nicht diazotieren lassen, können in Anilin-Derivate umgewandelt und dann diazotiert werden. So lassen sich die Nitrobenzylester der einfachen Zucker durch Reduktion in Aminobenzylester umwandeln, dann diazotieren und an Eiweiß kuppeln. Man kann auch andere Kupplungsreaktionen anwenden wie etwa die Bindung von Isocyanaten an die freien Amino-Gruppen der Lysin-Reste der Proteine.

Landsteiner fand, daß Azoverbindungen mit sauren Substituenten besonders wirksame Antigene sind, und daß sich die Spezifität der Antikörper vor allem gegen die sauren Gruppen richtet. Er sah daher diese Gruppen als wesentlich

für die determinante Wirkung der Antigene an. In unserem Laboratorium haben wir stark basische Anilin-Derivate wie p-Aminobenzylamin oder m-Aminophenyl-trimethylammoniumchlorid diazotiert und an Eiweiß gekuppelt. Derart erhaltene Azoproteine erwiesen sich als hochwirksame Antigene und ihre basische Gruppe als determinant²⁾. In Übereinstimmung mit *Landsteiner* finden wir nur einen geringen determinanten Effekt in apolaren oder ungeladenen Gruppen. Für die antigene Wirkung der determinanten Gruppen ist offenbar eine gewisse Polarität und eine starre Struktur wesentlich. Paraffin-Ketten, wie sie etwa in den aliphatischen Fettsäuren vorkommen, können nicht determinant sein, da sie keine starre Struktur besitzen; infolge der Flexibilität der Paraffin-Kette haben sie zu verschiedenen Zeiten verschiedene Konformationen. Das Postulat, daß Polarität und starre Struktur notwendige Voraussetzungen für die antigene Determinanz sind, macht es verständlich, daß gerade die aromatischen Verbindungen mit ihren starren Benzolringen so wirksame determinante Gruppen bilden. Die Spezifität der Kohlehydrat-Antigene wird offenbar durch die Pyran- oder Furan-Ringe und deren zahlreiche polare Substituenten bestimmt. Die Blutgruppen-Antigene und zahlreiche Bakterienantigene gehören in diese Gruppe der Polysaccharid-Antigene.

Das wichtigste Ergebnis der Arbeiten *Landsteiners* ist die Erkenntnis, daß chemisch einheitliche Moleküle als Antigene wirksam sind und daß die Immunspezifität dieser Antigene ganz bestimmten determinanten Gruppen des Antigenmoleküls zugeschrieben werden muß. Daraus geht hervor, daß die klassischen „Antigene“, vor allem Bakterien und Zellen, eine Vielzahl verschiedener Antigene enthalten. So findet man in roten Blutkörperchen nicht nur die kohlehydrat-haltigen Blutgruppenantigene, sondern das ebenfalls als Antigen wirksame Hämoglobin und andere. Während die determinanten Gruppen der künstlich erzeugten Azoproteine wohlbekannt sind, wissen wir sehr wenig über die determinanten Gruppen der natürlichen Proteinantigene. Da die serologische Spezifität der Proteine durch Kupplung mit Diazoverbindungen und durch Jodierung vernichtet wird, ist es sehr wahrscheinlich, daß die dabei beteiligten Tyrosin-Reste für die Spezifität besonders wichtig sind. Diese Vermutung wird durch die kürzlich von *Sela* und Mitarbeitern³⁾ nachgewiesene antigene Wirkung von Polytyrosin-Gelatine wesentlich gestützt. Manche der determinanten Gruppen der natürlichen Proteine scheinen im Inneren ihrer globulären Moleküle verborgen zu sein; sie werden durch vorsichtige Verdauung des Protein-Antigens mit proteolytischen Enzymen freigesetzt und reagieren dann mit dem homologen Immunserum (*Lapresle* und Mitarbeiter⁴⁾).

Da die natürlichen Protein-Antigene nur aus Aminosäuren bestehen, ist es klar, daß ihre determinanten Gruppen ebenfalls nur Aminosäuren enthalten können. Vermutlich bilden Gruppen von drei oder vier Aminosäure-Resten einen antigenen Bezirk an der Oberfläche der globulären Antigenmoleküle. Man kann leicht berechnen, daß es nicht mehr als etwa 50000 derartiger Kombinationen der etwa 20 natürlichen L-Aminosäuren geben kann. Die Zahl der determinanten Kombinationen würde viel kleiner sein, wenn nur die aromatischen Aminosäuren determinante Kombinationen bilden könnten. Andererseits würde die Zahl der möglichen determinanten Kombinationen wesentlich ansteigen, wenn nicht nur deren Zusammensetzung,

¹⁾ *F. Haurowitz, M. Vardar u. P. Schwerin, J. Immunology* 43, 327 [1942].

²⁾ *M. Sela u. R. Arnon, Biochem. J.* 75, 91, 103 [1960].

³⁾ *C. Lapresle, M. Kaminski u. C. E. Tanner, J. Immunology* 82, 95 [1959].

⁴⁾ *K. Landsteiner: The Specificity of Serological Reactions, Harvard Univers. Press 1946.*

sondern auch ihre gegenseitige Lagerung im Raum, ihre Konformation, für die Spezifität wesentlich wäre.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, eiweißfreie Antigene zu erzeugen. Tatsächlich findet man Antikörperbildung nach parenteraler Einverleibung gewisser Halogen-Derivate von aromatischen Nitro-Verbindungen. Man hat allen Grund anzunehmen, daß in solchen Fällen Kupplung der Verbindungen mit den Körperproteinen in vivo stattfindet, und daß dann das Kupplungsprodukt als Antigen wirkt. *Harington*⁵⁾ hat derartige Substanzen, die in vivo in Antigene überführt werden, als Proantigene bezeichnet. Die meisten eiweiß-freien Azoverbindungen wirken weder als Antigene, noch als Proantigene. Sie sind aber, wie *Landsteiner* fand, imstande, die Präzipitation der analogen Antigene durch Antikörper zu verhindern, da sie an die spezifische Gruppe des Antikörpers gebunden werden. Man kann diese Bindung direkt durch Gleichgewichtsdialyse (Kompensations-Dialyse) nachweisen⁶⁾. *Landsteiner* hat diese kleinen Moleküle, die so wie das Antigen an den Antikörper gebunden werden, als Haptene bezeichnet. Manche Haptene, vor allem jene mit zwei oder mehr bindenden Gruppen, sind imstande, mit dem Antikörper unlösliche Präzipitate zu bilden. Im Gegensatz zu Antigenen können jedoch Haptene keine Antikörperbildung hervorrufen. Erst durch Bindung an ein Protein werden Haptene in Antigene umgewandelt. Die Rolle des Proteins in dieser Reaktion ist noch nicht ganz klar. Es transportiert vermutlich das Antigen an den Ort seiner Wirkung und verhindert durch sein hohes Molekulargewicht den Verlust des kleinen determinanten Anteils des Antigens durch renale Exkretion. Wir werden bei der Erörterung des Mechanismus der Antikörperentstehung auf dieses Problem zurückkommen.

Da die natürlichen Protein-Antigene aus zahlreichen Aminosäuren bestehen, erhebt sich die Frage, ob ein solches Antigen zur Bildung von mehr als einem einzigen Antikörper führen kann. Wir haben diese Frage in Modellversuchen geprüft, in denen ein Teil der Tyrosin-Reste des Ovalbumin-Moleküls mit Diazobenzol-arsonsäure gekuppelt, ein anderer Teil jodiert wurde. Wenn ein derart substituiertes Ovalbumin einem Kaninchen injiziert wird, bildet das Tier mindestens drei verschiedene Antikörper-Typen: 1. Antikörper, die an die Azophenylarsonat-Gruppen gebunden werden, 2. Antikörper, die sich spezifisch nur mit jodierten Tyrosingruppen verbinden, und 3. Antikörper, deren Spezifität sich gegen die unbekannten artspezifischen Gruppen des Ovalbumins richtet⁷⁾. Man kann die drei Typen leicht voneinander trennen; durch artfremde Azophenylarsonat-Serumproteine werden nur die Antikörper des ersten Typus ausgefällt, durch jodierte artfremde Serumproteine nur jene des zweiten Typus; aus der überstehenden Lösung können die Antikörper der dritten Art durch Ovalbumin ausgefällt werden⁷⁾.

Der Antigen-Antikörperkomplex

Da die Azoproteine rotbraun sind, sind sie besonders geeignet, um den Antigengehalt von unlöslichen Antigen-Antikörperkomplexen zu bestimmen. Die ersten Analysen dieser Art unternahm der chinesische Biochemiker *Hsien Wu*⁸⁾, der den Gehalt spezifischer Präzipitate an Hämoglobin oder an Jodeiweiß bestimmte. Seine Versuche ebenso wie Versuche von *Heidelberger*⁹⁾ und unsere eigenen Ver-

suche¹⁰⁾ zeigten, daß die löslichen Proteinantigene im allgemeinen nur etwa 5 bis 10% des Präzipitates bilden und daß die Hauptmenge des Präzipitates aus Proteinen besteht. Die chemische Natur der Antikörper war um jene Zeit noch ganz ungeklärt. So schrieb *Sachs*¹¹⁾ noch 1929: „*Da Antigene und Antikörper an und für sich nicht chemisch oder physikalisch definierbar sind, ist das Hauptmerkmal für ihre Analyse die biologische Funktion*“. Es war zwar schon lange bekannt, daß sich die Antikörper in der Globulinfraktion der Immunseren befinden, man hielt jedoch die Globuline im allgemeinen für eine Verunreinigung der Antikörper. In gleicher Weise sahen *Willstätter* und andere Enzymchemiker zu jener Zeit den Eiweißgehalt der Enzyme als Verunreinigung an. Die Darstellung reiner Urease durch *Sumner* und reinen Pepsins durch *Northrop* zeigte jedoch einwandfrei, daß diese Enzyme nur aus Eiweiß bestehen. Das gleiche schien nach unseren Versuchen¹²⁾ für die Antikörper zuzutreffen. Wenn wir die unlöslichen Antigen-Antikörperkomplexe analysierten und den Antigengehalt abzogen, fanden wir eine für Proteine typische Zusammensetzung. Der Gehalt an Tyrosin und anderen Aminosäuren war jenem der Serumglobuline sehr ähnlich. Wir schlossen daraus, daß die Antikörper tatsächlich Proteine, und zwar Serumglobuline, sind, und daß man ihren Eiweißgehalt nicht als Verunreinigung ansehen kann. Die Spezifität der Antikörper schrieben wir ihrer räumlichen Anpassung an die determinante Gruppe des Antigens zu¹²⁾. Ähnliche Anschauungen wurden kurze Zeit später, unabhängig von uns, von *J. Alexander*¹³⁾ und von *S. Mudd*¹⁴⁾ veröffentlicht.

Die Struktur der Antikörper

In unserer gemeinsam mit *F. Breinl* publizierten Arbeit¹²⁾ definierten wir Antigene als Substanzen, die die Biosynthese der Serumglobuline derart modifizieren, daß anstatt und neben normalen Globulinen auch solche Globuline entstehen, die der determinanten Gruppe des Antigens räumlich entsprechen. Wir nahmen an, daß die Antigene mit ihren starren polaren Gruppen die zum Globulinmolekül zusammentretenden Aminosäuren derart orientieren, daß das gebildete Antikörper-Globulin der determinanten Gruppe des Antigens komplementär angepaßt ist und einen negativen Abdruck des Antigenmoleküls bildet. Das für die Enzyme häufig herangezogene Bild des Schlüssels und des Schlosses paßt hier nicht, da weder der Schlüssel das Schloß bildet noch das Schloß den Schlüssel. Der Vergleich mit einer Schablone oder einer Gußform liegt näher, da in diesen Beispielen die Schablone bzw. die Gußform tatsächlich zur Bildung eines negativen Abdruckes führt.

Unsere Theorie der Antikörperbildung wurde nicht gleich angenommen. Einige Jahre nach unserer Veröffentlichung stellte *Pascual Jordan*¹⁵⁾ eine neue Hypothese zur Diskussion. Danach würde das Antigen oder eine ihm ähnliche Substanz in das Antikörpermolekül eingebaut werden; die gegenseitige Bindung zwischen Antigen und Antikörper wurde von *Jordan* der Resonanzgleichartiger oder ähnlicher Gruppen zugeschrieben. Durch Versuche mit künstlichen determinanten Gruppen konnten wir jedoch zeigen, daß diese, selbst wenn sie in großer Menge vorhanden sind, nicht in die Antikörpermoleküle eingebaut werden. So sind die gegen Jodeiweiß gebildeten Antikörper, auch wenn man dem immunisierten Tier reichlich Jod zur Verfügung stellt, jod-frei. Ebenso sind Antikörper gegen Phosphoproteine frei von Phosphat-Gruppen⁸⁾.

⁵⁾ G. H. Gell, C. R. Harington u. R. Michel, Brit. J. exp. Pathol. 29, 578 [1948].

⁶⁾ J. Marrack u. F. C. Smith, Brit. J. exp. Pathol. 13, 394 [1932]; F. Haurowitz u. F. Breinl, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 214, 111 [1933].

⁷⁾ F. Haurowitz u. P. Schwerin, J. Immunology 47, 111 [1943].

⁸⁾ H. Wu, L. Cheng u. C. Li, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 25, 853 [1927].

⁹⁾ M. Heidelberger, J. Amer. chem. Soc. 60, 242 [1938].

¹⁰⁾ F. Haurowitz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 245, 23 [1936].

¹¹⁾ H. Sachs, Hdb. d. norm. u. pathol. Physiol. 13, 413 [1929].

¹²⁾ F. Breinl u. F. Haurowitz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 192, 45 [1930].

¹³⁾ J. Alexander, Protoplasma 14, 296 [1931].

¹⁴⁾ S. Mudd, J. Immunology 23, 423 [1932].

¹⁵⁾ P. Jordan, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 97, 330 [1939].

Etwa zehn Jahre nach Aufstellung unserer Theorie der Antikörperbildung wurde diese Theorie von *Pauling*¹⁶⁾ übernommen und modifiziert. Während wir vermutet hatten, daß die determinante Gruppe des Antigens die zum Globulinmolekül zusammentretenden Aminosäuren orientiere und dadurch vielleicht die Aminosäure-Sequenz ändere, nahm *Pauling* an, daß die Anpassung des Antikörpers an das Antigen lediglich durch andersartige Faltung der Peptidkette, durch eine Änderung der tertiären Struktur (Konformation) ohne Änderung der primären Struktur (Reihenfolge und Zahl der Aminosäuren) zustandekomme. Diese Anschauung hat viel für sich. Wir haben, um diese Frage zu klären, Antikörper gegen stark saure und gegen basische determinante Gruppen in Azoproteinen erzeugt und ihre Aminosäure-Zusammensetzung bestimmt. Innerhalb der Fehlergrenzen der analytischen Methode fanden wir keinen Unterschied zwischen den beiden Antikörpern. Papierelektrophorese der gereinigten Antikörper zeigte keinen wesentlichen Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit. All dies stützt die Annahme *Paulings*, daß die gegenseitige Anpassung von Antigen und Antikörper durch eine entsprechende Faltung der Peptidketten zustandekomme. Der endgültige Beweis für oder gegen diese Hypothese kann erst dann erbracht werden, wenn wir die vollkommene Reihenfolge der Aminosäuren in der Peptidkette der Antikörper kennen.

In der erwähnten Arbeit¹⁶⁾ nahm *Pauling* an, daß das Antigen vor allem mit den beiden Enden der Peptidkette des Antikörpers reagiere, so daß jedes Antikörpermolekül zwei Gruppen hätte, die dem Antigen komplementär angepaßt wären. Nach *Pauling* sollte dann die Injektion zweier Antigene A und B zur Bildung von etwa 25% Antikörper mit zwei anti-A-Gruppen, ebensoviel Antikörper mit zwei Anti-B-Gruppen und daneben zur Bildung von etwa 50% „heterobindender“ (*heteroligating*) Antikörper mit zwei verschiedenen Gruppen, einer Anti-A- und einer Anti-B-Gruppe, führen¹⁸⁾. Wir haben nach Injektion zweier verschiedener Antigene im Immunserum niemals Antikörper mit doppelter Spezifität finden können⁷⁾. In *Paulings* Laboratorium haben *Campbell*, *Lanni* und andere Immunchemiker vergleichlich nach *heteroligating*-Antikörpern gefahndet. Es scheint, daß die Antikörper, selbst wenn sie zweiwertig sind, in beiden Gruppen an die gleiche determinante Gruppe des Antigens angepaßt sind.

Die komplizierte Frage der Wertigkeit der Antikörper scheint auch heute noch nicht ganz geklärt zu sein. Es mag ein- und zweiwertige Antikörper geben, d.h. Antikörper mit einer oder mit zwei spezifisch bindenden Gruppen. Viele Immunologen sind geneigt, einwertige Antikörper als unvollkommene oder nicht-präzipitierende Antikörper anzusehen und die zweiwertigen Antikörper den Präzipitinien gleichzusetzen. Dies ist vermutlich auf die bekannte Tatsache zurückzuführen, daß mehrwertige Verbindungen leichter zur Bildung unlöslicher Komplexe und zu Aggregation neigen. Die Identifizierung von nicht-präzipitierenden Antikörpern mit einwertigen Antikörpern ist jedoch nicht zulässig, da man präzipitierende Antikörper durch Änderungen im pH und im Salzgehalt der Lösungen in nichtpräzipitierende Antikörper umwandeln kann¹⁷⁾. Auch der umgekehrte Vorgang ist möglich. Molekulargewichtsbestimmungen des Antigen-Antikörperkomplexes können naturgemäß nur in Lösungen vorgenommen werden, z.B. bei einem großen Überschuß an Antigen. Ursprünglich wurden auf diese Weise bis zu 4 oder 5 Antigenmoleküle pro Antikörpermolekül gefunden. Diese Analysen

haben sich jedoch als irrig erwiesen. Die besten Analysen ergeben Werte zwischen einem und zwei Antigenmolekülen für jedes Antikörpermolekül¹⁸⁾. Demnach wären ein- und zweiwertige Antikörpermoleküle vorhanden. Es ist jedoch fraglich ob die höheren Teilchengewichte nicht durch Adsorption von anderen Proteinen der angewandten Immunseren zustandekommen oder durch unspezifische Bindung des einen der beiden Antikörpermoleküle.

Analysen der unlöslichen Präzipitate ergeben meist mehrere Antikörpermoleküle für jedes Antigenmolekül. Das molare Verhältnis Antikörper/Antigen steigt mit dem Molekulargewicht des Antigens stark an und erreicht beim Thyroglobulin (Mol.-Gew. rd. 700000) Werte von etwa 50⁹⁾. Diese Beobachtungen sind besser mit Einwertigkeit der Antikörper vereinbar als mit Zweiwertigkeit. Selbst wenn die 50 an ein Thyroglobulin-Molekül gebundenen Antikörper zweiwertig wären, ist es klar, daß die meisten dieser Moleküle nur durch eine einzige Bindung an das Thyroglobulin-Molekül gebunden sein können.

Das Problem der Wertigkeit der Antikörper ist kürzlich in ein neues Stadium eingetreten, da *Porter*¹⁹⁾ in England durch vorsichtige Behandlung von Antikörpern mit Papain das Antikörpermolekül in drei große Fragmente zerlegen konnte. Eines dieser Proteine kristallisierte, war aber nicht imstande Antigen zu binden. Die beiden anderen Bruchstücke kristallisierten nicht und waren einander ähnlich; jedes band ein Antigenmolekül. Es scheint danach, daß jedes Antikörpermolekül aus zwei einwertigen kleineren Proteinfragmenten besteht, die durch ein unspezifisches Protein als Kitt zusammengehalten werden. Alle drei Proteinteilchen verhalten sich wie Globuline. Es wird wichtig sein festzustellen, ob die einwertigen Antikörperfragmente Vorstufen des zweiwertigen Antikörpers sind oder ob dieser direkt aus Aminosäuren gebildet wird.

Antikörperbildung wurde bisher nur im lebenden Organismus oder in überlebenden Zellen in der Gewebskultur beobachtet, niemals in leblosen Systemen. 1942 glaubten *Pauling* und *Campbell*²⁰⁾, daß ihnen die Synthese von Antikörper in vitro gelungen sei. Sie mischten ein Azoprotein mit normalem Serumglobulin und setzten das Gemisch leicht denaturierenden Bedingungen aus. Sie hofften, daß sich unter diesen Bedingungen das Serumglobulin entfalten und nach Beseitigung der denaturierenden Agentien in Gegenwart des Azoproteins derart rückfalten würde, daß sich ein dem Azoprotein komplementär angepaßtes Globulin, ein Antikörper, bilden würde. Tatsächlich beobachteten sie Niederschlagsbildung, wenn sie das von ihnen angewandte Azoprotein mit dem renaturierten Globulin mischten. Es war auffallend, daß Präzipitatbildung nur bei saurer Reaktion eintrat, während die übliche Präzipitinreaktion auch bei neutraler Reaktion eintritt. Bei der Nachprüfung fanden wir²¹⁾, daß es sich um die unspezifische Fällung durch Salzbildung zwischen dem sauren Azoprotein und dem renaturierten γ -Globulin handelte. Die gleiche Fällung trat auch mit anderen Azoproteinen ein, nicht nur mit dem als Antigen verwandten Azoprotein. Unsere negativen Ergebnisse wurden inzwischen in *Paulings* Institut bestätigt²²⁾. Der negative Ausfall all dieser Versuche ist heute noch viel verständlicher als früher, denn *Askanas* und *Humphrey*²³⁾ haben inzwischen festgestellt, daß Antikörperbildung nur

¹⁶⁾ S. J. Singer u. D. H. Campbell, J. Amer. chem. Soc. 77, 3499
3504, 4851 [1955]; S. J. Singer, F. A. Pepe u. D. Ilter, ebenda 81,
3887 [1959].

¹⁸⁾ R. R. Porter, Biochem. J. 73, 119 [1959].

²⁰⁾ L. Pauling u. D. H. Campbell, J. exp. Medicine 76, 211 [1942].

²¹⁾ F. Haurowitz, P. Schwerin u. S. Tunc, Arch. Biochem. 11, 515
[1946].

²²⁾ J. L. Morrison, Canad. J. Chem. 31, 216 [1953].

²³⁾ B. A. Askanas u. J. H. Humphrey, Biochem. J. 68, 252 [1958];
70, 212 [1958].

¹⁹⁾ L. Pauling, J. Amer. chem. Soc. 62, 2643 [1940].
²¹⁾ C. G. Pope, Discuss. Faraday Soc. 18, 323 [1954]; R. S. Farr, J.
infect. Diseases 103, 239 [1958].

in unversehrten Zellen sensibilisierter Tiere stattfindet, nicht in Zellhomogenaten oder Zellextrakten. Die Antikörperbildung unterscheidet sich in dieser Hinsicht von anderen Reaktionen, bei denen freie Aminosäuren in Eiweiß eingebaut werden.

Die älteren Arbeiten über Antikörper litten unter dem Umstand, daß es nicht möglich war, reine Antikörper zu isolieren. In den Globulin-Fällungen der Immunseren waren die Antikörper durch andere Globuline verunreinigt. Bessere Reinigung wurde durch Elektrophorese erzielt. Derart erhaltene Antikörper enthalten nur noch andere γ -Globuline, sind jedoch frei von α - und β -Globulinen. Weit aus reinere Präparate erhält man, wenn man die Antikörper durch Fällung mit dem homologen Antigen von allen anderen Proteinen des Immunserums trennt. Aus dem Präzipitat lassen sich die Antikörper unter Umständen abspalten und rein isolieren. Dies ist zuerst Felton²⁴⁾ gelungen, der Antikörper gegen die Polysaccharidantigene der Pneumokokken präzipitierte und aus dem Präzipitat durch Calcium- oder Bariumhydroxyd extrahierte. Die Bariumsalze der Polysaccharidsäuren blieben ungelöst zurück. Heidelberger²⁵⁾ erzielte die gleiche Trennung durch Anwendung konzentrierter Kochsalzlösungen. Antikörper gegen Azoproteine lassen sich, wie wir gefunden haben, aus dem Immunpräzipitat durch eiskalte verdünnte Salzsäure in Gegenwart von 5% NaCl extrahieren²⁶⁾. Es ist erstaunlich, daß die Antikörper trotz der dabei angewandten hohen Azidität ihre Spezifität nicht verlieren. In den letzten Jahren sind Antikörper auch durch spezifische Adsorption an mit Antigen beladenen Adsorptionskolonnen gereinigt worden. Kuppelt man z. B. Serumalbumin durch Diazotierung oder durch andere Verfahren an Cellulose-Pulver oder an andere unlösliche Adsorbentien und läßt man ein gegen Serumalbumin gerichtetes Immunserum durch die mit diesem Adsorbens beschickte Säule laufen, so werden nur die gegen Serumalbumin gerichteten Antikörper adsorbiert, während alle anderen Proteine des Immunserums ausgewaschen werden. Man kann dann durch geeignete Änderung des pH und des Salzgehaltes den adsorbierten Antikörper von der Säule abspalten und rein gewinnen (Isliker²⁷⁾, Gurvich²⁸⁾).

Schicksal und Rolle des injizierten Antigens

Als wir unsere ersten Versuche über Immunitätsreaktionen begannen, war über das Schicksal des Antigens wenig bekannt. Es war zwar schon früher gefunden worden, daß injizierte Partikel, Bakterien und Zellen im Retikuloendothel abgefangen und unter Umständen phagozytiert werden. Aber es blieb fraglich, ob dies auch für die löslichen Antigene und für die in den komplexen partikulären Antigenen vorhandenen Antigenmoleküle gelte. Um über das Schicksal der injizierten Antigene Auskunft zu erhalten, untersuchten wir den Arsen-Gehalt der Organe nach Injektion von einem mit diazotierter Arsanilsäure gekuppelten Protein²⁹⁾. Dies erlaubte uns, die quantitative Verteilung des Antigens während einer Periode von 8 bis 12 Tagen zu bestimmen. Wir fanden wiederum Anreicherung des eiweißgebundenen Arsens in den Organen des retikuloendothelialen Systems, vor allem in Leber, Milz und Knochenmark, weniger in anderen Organen. Diese

²⁴⁾ L. D. Felton, J. Immunology 22, 453 [1932].

²⁵⁾ M. Heidelberger, F. C. Kendall u. T. Theorell, J. exp. Medicine 63, 819 [1936].

²⁶⁾ F. Haurowitz, S. Tekman, M. Bilen u. P. Schwerin, Biochem. J. 41, 304 [1947].

²⁷⁾ H. C. Isliker, Ann. New York Acad. Sci. 57, 225 [1953].

²⁸⁾ A. E. Gurvitsch, R. B. Kapner u. R. S. Nezlin, Biochimia (russ.) 24, 144 [1959].

²⁹⁾ F. Haurowitz u. F. Breinl, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 205, 259 [1932].

Versuche konnten jedoch nicht über längere Zeiträume ausgedehnt werden, da die Empfindlichkeit der analytischen Methoden dann versagte. Als jedoch radioaktive Isotope verfügbar wurden, konnten diese in die Antigenmoleküle eingebaut und derart die Empfindlichkeit des AntigenNachweises erhöht werden³⁰⁾.

Bei einer Methode markieren wir die als Antigene angewandten Proteine äußerlich durch Jodierung mit ^{131}I oder durch Kupplung mit radioaktiven aromatischen Aminen, z. B. mit diazotierter ^{14}C -Anthranilsäure, ^{35}S -Sulfanilsäure oder ^{3}H -Sulfanilsäure. Wir bezeichnen solche Antigene als äußerlich markiert. Im Gegensatz dazu werden die innerlich markierten Antigene biosynthetisch erhalten; wir injizieren, um solche Antigene zu erzeugen, den Versuchstieren radioaktive ^{14}C - oder ^{35}S -Aminosäuren, isolieren aus ihrem Blutserum das radioaktive Serumalbumin und injizieren dieses als Antigen einem Tier einer anderen Tierart. Obwohl die innerlich markierten Antigene den natürlichen Proteinantigenen näherstehen, sind sie in Versuchen über das Schicksal des Antigens weniger brauchbar als die äußerlich mit Jod oder anderen Isotopen markierten Antigene. Denn beim Zerfall der innerlich markierten Antigene werden radioaktive Aminosäuren frei, die wieder verwertet und in andere Proteine eingebaut werden. Dies ist bei den äußerlich markierten Antigenen nicht möglich. Wenn diese abgebaut werden, wird ihr Isotop schnell ausgeschieden, ohne wieder verwertet zu werden.

Was ist nun das Schicksal der äußerlich markierten Proteinantigene im injizierten Organismus? Wir finden, daß die stark substituierten Jodproteine und Azoproteine nach intravenöser Injektion schnell aus der Blutbahn verschwinden und in Milz, Leber und Knochenmark abgelagert werden. Dies ist im Einklang mit unseren früheren Versuchen an arsen-haltigen Azoproteinen. Wenn wir die Leber- oder Milzzellen der Organe der injizierten Kaninchen homogenisieren und durch differentielle Zentrifugierung fraktionieren, finden wir, daß die Hauptmenge des Antigens gleich nach Injektion in der Mikrosomenfraktion, d. h. in den kleinsten Granula des Zytoplasmas, konzentriert ist. Später, nach etwa einer halben Stunde, findet sich das Antigen vor allem in der Mitochondrienfraktion angereichert, d. h. in den größeren Körnchen des Zytoplasmas³¹⁾. Die Konzentration des Antigens in den Zellkernen ist viel geringer als im Zytoplasma.

Um weiteren Einblick in die intrazelluläre Verteilung des Antigens zu gewinnen, haben wir uns der Autoradiographie bedient. Die Autoradiographie bestätigt, daß sich die Hauptmenge des Antigens im Zytoplasma vorfindet und daß die Zellkerne nur kleine Mengen des Antigens enthalten³⁰⁾.

Die erwähnten Versuche wurden mit stark substituierten Jod- oder Azoproteinen ausgeführt. Wenn wir Proteine injizieren, die nur Spuren von Jod oder von radioaktiven Azogruppen enthalten, zirkuliert das Protein viele Tage im Blut und wird erst nach Antikörperbildung, etwa 5 bis 7 Tage nach Injektion, aus dem Blute entfernt, offenbar als unlöslicher Antigen-Antikörperkomplex. Wir finden es dann wieder vorwiegend in der Mitochondrienfraktion. Dort läßt sich das radioaktive Isotop stets viele Monate lang nachweisen. Es ist natürlich wichtig zu wissen, ob die Gegenwart des radioaktiven Jods oder der radioaktiven Atome der aromatischen Azoverbindung tatsächlich unverändertes Antigen anzeigt. Die von uns injizierten Antigene sind lösliche Proteine und sollten sich, wenn unverändert, lediglich im wasserlöslichen Extrakt der Zellen vor-

³⁰⁾ F. Haurowitz: Erg. d. Mikrobiologie, Bd. 34 (im Druck).

³¹⁾ F. Haurowitz u. C. F. Crampton, J. Immunology 68, 73 [1951].

finden. Wir finden sie jedoch vorwiegend in den zytoplasmatischen Granula. Sie sind dort vermutlich an andere Makromoleküle adsorbiert, vor allem an Nucleinsäuren, Polysaccharide, Lipide oder an die unlöslichen Proteine der Zellstruktur. Dies trifft für die ersten Minuten und Stunden nach Injektion zu. Später mag das Antigen zum Teil abgebaut werden und die determinante Gruppe an Ribonucleinsäure (Garvey und Campbell³²) oder an andere Zellbestandteile gebunden werden. Es ist ein Vorteil der äußerlich markierten Antigene, daß die radiochemischen Methoden die serologisch wirksame determinante Gruppe anzeigen. Dies trifft nicht für die innerlich markierten Proteinantigene zu. Deren radioaktive Aminosäuren werden in zahlreiche andere Proteine eingebaut, die mit dem ursprünglichen Antigen nichts zu tun haben.

Man könnte die Frage aufwerfen, ob nicht etwa der radioaktive Schwefel der diazotierten Sulfanilsäure oder der radioaktive Kohlenstoff der diazotierten Anthranilsäure zum Aufbau von Aminosäuren verwendet werden. Wir haben daher die ³⁵S enthaltenden Leberproteine hydrolysiert und auf die Gegenwart von ³⁵S-Cystin und Methionin untersucht³³; die Hauptmenge des radioaktiven Schwefels fand sich in einer Fraktion, die sich wie die aromatischen Sulfonsäuren verhielt. In den Versuchen mit ¹⁴C-Anthraniolazo-eiweiß fanden wir, daß sich durch Kochen des Hydrolysates mit Ninhydrin nur unbeträchtliche Mengen von ¹⁴CO₂ bildeten; die Hauptmenge des ¹⁴C fand sich nach Vakuumdestillation im wasserlöslichen Rückstand des Hydrolysates³⁴). All dies spricht dafür, daß die serologisch determinanten Teile des Antigens lange Zeit im Gewebe erhalten bleiben.

Die Frage nach der Dauer des Vorhandenseins des Antigens oder seiner determinanten Fragmente ist von grundsätzlicher Bedeutung für unsere Anschauungen über die Bildung der Antikörper. Wir finden 9 Monate nach Injektion eines radioaktiven Azoproteins in der Milz des injizierten Kaninchens noch eine Radioaktivität, die etwa 0,3 µg des Antigens entspricht³⁵). Das wären etwa 100 Antigenmoleküle pro Zelle. Da nur gewisse Zellen das Antigen enthalten, während andere davon frei sind, ist die Zahl der Antigenmoleküle in den das Antigen abfangenden Zellen höher als der Durchschnittswert. Andererseits mag ein Teil der nachgewiesenen Radioaktivität in serologisch unwirksamer Form vorliegen. Würden 100 oder auch nur 10 Antigenmoleküle pro Zelle genügen, um die lange Dauer der Antikörperbildung zu erklären? Man kann die Frage derzeit noch nicht entscheiden.

Gegen die Persistenz des Antigens ist häufig eingewendet worden, daß die injizierten Proteine durch die proteolytischen Enzyme der Zellen schnell abgebaut werden müßten. Felton³⁶) hat schon vor Jahren nachgewiesen, daß sich Pneumokokken-Polysaccharide im Organismus der Maus noch viele Monate nach Injektion nachweisen lassen. Dies wird im allgemeinen dem Fehlen von Enzymen, die die Polysaccharidsäuren spalten könnten, zugeschrieben. Bei Beurteilung des Schicksals der Protein-Antigene wird jedoch oft übersehen, daß native Proteine, vor allem natives Serumalbumin und Ovalbumin, von proteolytischen Enzymen kaum angegriffen werden³⁷). Denaturierung der Proteine scheint eine unerlässliche Vorbedingung für die enzy-

matische Proteolyse zu sein. Auch durch Bindung an Ribonucleinsäure oder an andere Makromoleküle kann die Proteolyse des in der Zelle abgefangenen Antigens verhindert werden. Es ist daher sehr wohl möglich, daß auch Protein-Antigene bzw. ihre serologisch wirksamen Fragmente in der Zelle lange Zeit liegen bleiben ohne abgebaut zu werden. Dies bringt uns zum Problem der Antikörperbildung.

Die Bildung der Antikörper

Während die von uns¹²) zuerst entwickelte Anschauung von der komplementären Anpassung der Antikörper an die homologen Antigene ganz allgemein angenommen wurde, ist der Mechanismus der Antikörperbildung noch umstritten. Nach unserer Ansicht greift das Antigen direkt in den Vorgang der Globulin-Bildung ein und ist daher für die Bildung der Antikörper unentbehrlich. In USA wird diese Theorie als „*direct template theory*“ bezeichnet, da das Antigenmolekül direkt als Schablone oder als Matrix wirkt.

Da sich die Aminosäure-Zusammensetzung verschiedener Kaninchenantikörper nicht von einander unterscheidet, nehmen wir in Übereinstimmung mit Pauling¹⁶) an, daß das Antigen nicht in die erste Phase der Protein-Biosynthese, in die Bildung der Peptidkette aus freien oder aktivierte Aminosäuren eingreift, sondern daß es nur die zweite Phase, die Faltung der Peptidkette, beeinflußt³⁸). Dies ist auch gut vereinbar mit der Erfahrung, daß erworbene Immunität nicht vererbbar ist. Nur die Reihenfolge der Aminosäuren in der Peptidkette scheint genetisch determiniert zu sein, während die Faltung von anderen Faktoren modifiziert werden kann. Es muß jedoch betont werden, daß wir es hier mit somatischen Zellen und nicht mit Keimzellen zu tun haben, so daß nicht mit Sicherheit entschieden werden kann, ob die Fähigkeit zur Bildung eines bestimmten Antikörpers auf die Tochtergeneration nach den Gesetzen der Erblehre übertragen wird. Man kann zwar Antikörper bildende Zellen eines sensibilisierten Tieres in Gewebskulturen züchten und während einiger Tage Antikörperbildung beobachten; die dem sensibilisierten Organismus entnommenen Zellen enthalten jedoch noch kleine Mengen des injizierten Antigens. Um die Frage zu entscheiden, ob Gegenwart des Antigens für die Antikörperbildung nötig ist, müßte man die Antikörper bildenden Zellen durch einige Generationen züchten, bis schließlich infolge Anwachsens der Zellzahl weniger als ein Antigenmolekül pro Zelle vorhanden wäre. Bisher haben alle Versuche zur Züchtung mehrerer Generationen von Antikörper bildenden Zellen versagt. Die Zellen verlieren in vitro nach kurzer Zeit die Fähigkeit, Antikörper zu bilden.

Viele Immunologen lehnen die direkte „*template theory*“ als unannehmbar ab, da sie sich nicht vorstellen können, daß die Antigene im Organismus des sensibilisierten Tieres Monate oder gar Jahre lang liegen bleiben sollten. Zum Teil mag die Vorstellung des Antigens als eines organisierten Partikels (Bakterium, Zelle, Virus) eine Rolle spielen. Es muß deshalb betont werden, daß niemand an die Persistenz solcher Partikel glaubt, daß in der *template theory* lediglich die Persistenz von antigen wirkenden Proteinen oder Polysacchariden, die in den Antigenteilchen vorkommen, gefordert wird. Wenn man jedoch Persistenz der Antigenmoleküle als unwahrscheinlich ablehnt, so muß man zu komplizierten Hilfshypothesen greifen. Der australische Virologe Burnet hat zuerst 1941, später mit Fenner³⁹), eine Anschauung über Antikörperbildung zur Diskussion gestellt, die sich an den Vorgang der sogenannten adaptiven

³²) J. S. Garvey u. D. H. Campbell, J. exp. Medicine 105, 361 [1957].
³³) F. Haurowitz u. H. Walter, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 67 [1955].

³⁴) E. L. Gresham u. F. Haurowitz, unveröffentl. Versuche.

³⁵) F. Haurowitz, C. F. Crampton u. R. Sowinski, Federation Proc. 10, 560 [1951].

³⁶) L. D. Felton, J. Immunology 61, 107 [1949].

³⁷) F. Haurowitz, M. Tunca, P. Schwerin u. V. Göksu, J. biol. Chemistry 157, 621 [1945].

³⁸) F. Haurowitz, Quart. Rev. Biol. 24, 93 [1949].

³⁹) F. M. Burnet u. F. Fenner: The Production of Antibodies, Melbourne 1949.

Enzybildung anlehnte. *Burnet* und *Fenner* nahmen ursprünglich an, daß das Antigen ähnlich einem Substrat wirke, die Bildung eines Antikörper erzeugenden Enzyms auslöse, und daß in dem sensibilisierten Organismus dieses Enzym auch nach Eliminierung aller Antigenmoleküle weiter wirke und fortlaufend Antikörper erzeuge. Inzwischen hat es sich jedoch herausgestellt, daß es keine richtige adaptive Enzybildung gibt, daß vielmehr das Substrat oder ihm ähnlich gebaute Substanzen lediglich die Bildung eines ohnedies in kleinen Mengen erzeugten Enzyms anregen. Manche der die Enzybildung anregenden „Induktoren“ sind Substrate des Enzyms, während andere vom Enzym weder umgesetzt werden noch an das Enzym kompetitiv gebunden werden. Wir sprechen daher nicht mehr von adaptiver Enzybildung, sondern von Induktion.

Im Einklang mit diesem Wechsel in unseren Anschauungen hat *Burnet* die ursprünglich vertretene Anschauung durch eine neue Anschauung über Antikörperbildung ersetzt, die sich auf eine Hypothese von *Jerne*⁴⁰⁾ stützt. *Jerne* hat in einer theoretischen Abhandlung die alte Rezeptorentheorie von *Ehrlich* übernommen und modifiziert. Er nimmt an, daß im Organismus stets kleine Mengen aller nur möglichen Typen von Antikörpern gebildet werden, daß das eindringende Antigen sich mit der kleinen Menge des zirkulierenden homologen Antikörpers verbinde und dann an die diesen Antikörper bildenden Zellen transportiert werde. Durch diesen Vorgang werde eine überstürzte Bildung des entsprechenden Antikörpers ausgelöst. Von der alten *Ehrlichschen* Anschauung unterscheidet sich die Hypothese *Jernes* durch die Annahme, daß im Organismus alle nur möglichen Typen von Antikörpern bereits vor Einbringung des Antigens zirkulieren.

Burnet hat *Jernes* Anschauung übernommen und erweitert. Er nimmt an⁴¹⁾, daß der Organismus über eine große Anzahl von Antikörper bildenden Zellen verfüge, und daß jeder dieser Zelltypen nur eine einzige Art von Antikörper bilden könne. Wenn ein Antigen X injiziert wird, so wird es an jene Zellen gebunden, die Anti-X erzeugen können und es kommt danach zu einer starken Vermehrung dieser Zellen, so daß sich in Milz, Knochenmark und anderen Organen des retikuloendothelialen Systems zahlreiche Stämme (Klone) dieser Zellen vorfinden. Die Vermehrung der Anti-X bildenden Zellen geht nach *Burnet* auch noch nach Zerstörung oder Ausscheidung des Antigens fort. *Burnet* nennt seine neue Theorie „*clonal selection theory of antibody formation*“. Was spricht für oder gegen diese Theorie?

Die Frage, ob Gegenwart des Antigens während der Bildung von Antikörper nötig ist, bleibt weiterhin unklar. Sie kann derzeit nicht gelöst werden, denn keine der gegenwärtig verfügbaren Methoden ist genügend empfindlich, um die Gegenwart von einigen wenigen Antigenmolekülen oder determinanten Fragmenten des Antigens in den die Antikörper bildenden Zellen nachzuweisen oder auszuschließen. Wir sind daher lediglich auf mehr oder weniger begründete Vermutungen und Argumente angewiesen.

Eine der stärksten Stützen der „*clonal selection theory*“ ist ihre Fähigkeit, das Phänomen der immunologischen Toleranz zu erklären. Man versteht darunter die Erscheinung, daß Tiere, die als Föten oder kurz nach der Geburt eine Antigeninjektion bekommen, während einer Periode von mehreren Monaten nicht imstande sind, Antikörper gegen das injizierte Antigen zu bilden. Es kann sich nicht um eine Schädigung des Antikörper bildenden Apparates handeln, da andere Antigene so wie bei normalen Tieren zur Bildung

von Antikörpern führen. Nur das Vermögen, Antikörper gegen das zur Zeit der Geburt injizierte Antigen zu erzeugen, ist aufgehoben. *Burnet* führt dies auf eine Schädigung jener Zellen zurück, die die Fähigkeit haben, Antikörper gegen das im Fötalbeben injizierte Antigen zu erzeugen. Es handelt sich jedoch nicht um eine permanente Ausschaltung der Antikörperbildung. Wenige Wochen oder, wenn große Antigenmengen injiziert wurden, Monate nach der ersten Antigeninjektion gewinnt der Organismus wieder das Vermögen, Antikörper gegen dieses Antigen zu erzeugen (*Smith*⁴²⁾). Es scheint daher, daß auch hier Persistenz des Antigens eine Rolle spielt. Da der fötale Organismus nicht imstande ist γ -Globuline zu erzeugen, mag das injizierte Antigen in anderer Weise verankert sein als im erwachsenen Organismus und mag dadurch Toleranz herbeiführen. Weitere Versuche sind nötig, um festzustellen, wie das Antigen im embryonalen Gewebe gebunden ist.

Eine der größten Schwierigkeiten der „*clonal selection theory*“ ist ihr Unvermögen, die Bildung von Antikörpern gegen *Landsteiners* künstliche Azoproteine und gegen all ihre unnatürlichen aromatischen Substituenten befriedigend zu erklären. Es ist kaum glaublich, daß der tierische Organismus Zellen haben sollte, die von vornherein prädestiniert sind, Antikörper gegen Tausende von synthetischen Produkten des chemischen Laboratoriums zu bilden. *Burnet* gibt diese Schwierigkeit zu. In seiner ersten Theorie nahm er an, daß diese Art von Antikörpern durch einen anderen Mechanismus gebildet werden. Man hätte demnach zwei Arten von Antikörperbildung anzunehmen. Dies ist eine unbefriedigende und sehr unwahrscheinliche Annahme, da wir keinen grundsätzlichen Unterschied zwischen den gegen natürliche und künstliche Antigene gerichteten Antikörpern finden. Eine weitere Schwierigkeit für die „*clonal selection theory*“ würde sich ergeben, wenn es mehr als etwa 10^6 verschiedene Antikörper-Typen gäbe. Man müßte dann ebensoviele Klone von Antikörper bildenden Zellen fordern. Dies ist aus histologischen Gründen nicht annehmbar. Wir wissen derzeit nicht, wieviel verschiedene Antikörper-Typen der Organismus erzeugen kann. Deshalb können wir gegenwärtig dieses Kriterium nicht anwenden.

Burnet sieht als eine Hauptstütze für seine Anschauung die hohe Intensität der anamnestischen Reaktion an. Bei der zweiten Injektion seien nicht wie bei der ersten Injektion nur einige wenige Zellen vorhanden, die den entsprechenden Antikörper erzeugen können, sondern ganze Klone dieser Zellen. Tatsächlich kann man bei der anamnestischen Reaktion in der Milz und in Lymphknoten mit Hilfe der Fluoreszenzmethode von *Coons*⁴³⁾ eine viel größere Zahl von Antikörper bildenden Zellen feststellen. Wenn diese durch „*clonal selection*“ und durch Vermehrung nur eines einzigen Typus von Antikörper bildenden Zellen zustande kämen, sollte man nach einer dritten und vierten Injektion eine weitere Zunahme der Zellen dieses Klons finden. Dies trifft nicht zu; die Zahl der Antikörper bildenden Zellen bleibt nach der zweiten Injektion unverändert und nimmt nicht mehr zu (*Coons*⁴⁴⁾).

Um einen näheren Einblick in den Mechanismus der anamnestischen Reaktion zu gewinnen, wurden mit *B. Patras*⁴⁵⁾ den Tieren kurz vor und nach der zweiten Antigeninjektion zwei verschieden markierte Aminosäuren injiziert, eine derselben kurz vor der zweiten die anamnestische Reaktion auslösenden Injektion oder gleichzeitig mit

⁴⁰⁾ N. K. *Jerne*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 41, 849 [1955].

⁴¹⁾ M. *Burnet*: The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, Vanderbilt Univers. Press 1959.

⁴²⁾ R. T. *Smith* u. R. A. *Bridges*, J. exp. Medicine 108, 227 [1958].

⁴³⁾ A. H. *Coons* u. Mitarb., J. exp. Medicine 93, 173 [1951]; 702, 49, 61 [1955].

⁴⁴⁾ A. H. *Coons* u. A. *Fecsik*, Science [Washington] 130, 1427 [1959].

⁴⁵⁾ B. *Patras*, Ph. D. Thesis, Indiana University [1958].

dieser, die andere drei Tage später. Wir haben am fünften Tag, zur Zeit maximaler Antikörperbildung, die Antikörper des Immunserums durch Antigen präzipitiert und ihren Gehalt an den beiden markierten Aminosäuren bestimmt. Wie erwartet, finden wir, daß die Konzentration der am dritten Tag injizierten radioaktiven Aminosäure im Antikörper höher ist als in den nicht präzipitierenden γ -Globulinen des Immunserums. Dies ist dem Umstand zuzuschreiben, daß ein großer Teil der Globuline bereits vor Injektion der radioaktiven Aminosäuren gebildet worden war. Es war jedoch unerwartet, daß sich die gleichzeitig mit der zweiten Antigeninjektion injizierte Aminosäure in Antikörpern und den anderen γ -Globulinen in etwa gleicher Menge vordarf. Wir schließen daraus, daß ein kleiner Teil der Antikörper bereits vor der zweiten Antigeninjektion im Organismus vorhanden war und vermutlich aus den Organen ausgeschwemmt wurde. Derartige Herauslösung von gewebsgebundenen Antikörpermolekülen durch die sekundäre Antigeninjektion wurde auch von Garvey und Campbell⁴⁶⁾ direkt nachgewiesen.

M. Richter⁴⁷⁾ hat dann in unserem Laboratorium festgestellt, daß sich im Blutserum der Tiere, die einige Wochen nach der ersten Antigeninjektion eine negative Präzipitinreaktion geben, tatsächlich kleine Mengen von Antikörpern mit dem viel empfindlicheren Hämaggglutinin-Test nachweisen lassen. Man überzieht bei dieser Methode rote Blutkörperchen mit einer Schicht des betreffenden Antigens und prüft dann durch Zusatz von Antiserum auf Agglutination. Wir wandten in unseren Versuchen Rinderserumalbumin oder Ovalbumin als Antigene an. Sie wurden durch bisdiazotiertes Benzidin an die roten Blutkörperchen gebunden. Setzt man zu diesen Blutkörperchen das Serum der Tiere, die 4 bis 6 Wochen vorher eine einzige Antigeninjektion erhalten hatten und die keine Präzipitinreaktion mehr gaben, so findet man deutliche Agglutination. Wir haben inzwischen diese Versuche auf viel längere Zeiten ausgedehnt und finden auch noch ein Jahr nach Antigeninjektion einen positiven und ganz spezifischen Agglutinin-Test. Dies bedeutet, daß der Organismus auch nach einer einzigen Antigeninjektion fortlaufend Antikörper erzeugt und in kleinen Mengen in das Blutserum sendet.

Unsere Versuche zeigen, daß die zweite Injektion des Antigens in einen Organismus erfolgt, in dem bereits kleine Mengen von Antikörper ständig zirkulieren. Wir konnten auch nachweisen, daß sich bei der zweiten Injektion intravaskulär sofort ein Antigen-Antikörperkomplex bildet, denn der Antikörpertiter sinkt sofort nach der Injektion des Antigens auf Null ab. Wir schreiben die Intensität der anamnestischen Reaktion dieser schnellen Bildung eines großen Antigen-Antikörperkomplexes zu. Es ist bekannt, daß derartige kolloidale Komplexe einen starken Reiz auf die Antikörperbildung ausüben. Sie wirken ähnlich wie künstlich zugesetzte „Adjuvantien“, indem sie zu entzündlichen Erscheinungen und zu Phagozytose führen. Das injizierte Antigen kann auf diese Weise schneller und tiefer in die Antikörper bildenden Zellen eindringen als etwa bei der ersten Injektion, bei der das lösliche Antigen in einem antikörperfreien Serum zirkuliert und ausgeschieden oder zerstört wird, bevor es in jene Zellen eindringen kann, die die Fähigkeit haben Antikörper zu erzeugen. Die eben

entwickelte Anschauung erklärt die hohe Intensität der anamnestischen Reaktion befriedigend und macht es unnötig, andere komplizierte Erklärungen zu suchen.

Burnets Mitarbeiter Nossal hat mit Lederberg⁴⁸⁾ die Burnetsche Anschauung nachgeprüft und Kaninchen mit zwei verschiedenen Typen von *Salmonella* injiziert. Aus den Organen der sensibilisierten Tiere wurden dann einzelne lymphoide Zellen isoliert und auf die Gegenwart von Agglutininen untersucht. Unter 228 untersuchten Zellen wurden 33 gefunden, die nur einen Typus von *Salmonella* agglutinierten, und 29, die nur den anderen Typus agglutinierten. Zellen, die beide Typen agglutinieren, waren nicht nachweisbar. Dies würde andeuten, daß eine Antikörper bildende Zelle tatsächlich nur einen Antikörpertypus erzeugen kann. In einem ähnlichen Versuch, in dem ein Kaninchen mit zwei Typen eines Bakteriophagen injiziert wurde, kamen Lennox und Cohn⁴⁹⁾ zu dem entgegengesetzten Ergebnis. Sie fanden unter 215 Zellen 15 Zellen, die Antikörper gegen beide Antigene erzeugten. Eine Bestätigung dieses Befundes würde bedeuten, daß das Antikörperbildungsvormögen einer Zelle nicht auf einen einzigen Typ von Antikörpern beschränkt ist und würde die von der Burnetschen Theorie geforderte Existenz von zahlreichen Zelltypen, deren jeder nur eine Art von Antikörper erzeugen kann, unnötig machen.

Es geht aus all dem hervor, daß das Problem der Antikörperbildung noch nicht endgültig gelöst ist. Es sind weder die Biologen untereinander einig, noch die Chemiker mit den Biologen. In seinem letzten Buch⁴¹⁾ schreibt Burnet, daß seine „clonal selection theory“ ein Versuch sei, die Annahme biochemischer Prozesse zu vermeiden, für die es noch keinen unabhängigen Beweis gäbe. An einer anderen Stelle desselben Buches sagt er: „Es ist eine Sache meines wissenschaftlichen Glaubens, daß Einfachheit ein wesentlicher Vorzug ist, wenn sie hilft, zu verstehen, ohne den Beobachtungen Gewalt anzutun.“ Damit wird jeder von uns übereinstimmen. Dem Biologen mag die „clonal selection theory“ und die kontinuierliche Antikörperbildung in Abwesenheit von Antigen einfach scheinen. Für den Chemiker ist es schwer, sich Antikörperbildung in Abwesenheit von Antigen vorzustellen. Es ist viel einfacher, langdauernde Ablagerung des Antigens oder seiner serologisch bestimmenden Fragmente anzunehmen und die Antikörperbildung als einen Kopiervorgang anzusehen. Als Chemiker ziehen wir im allgemeinen jene Theorien vor, die es uns erlauben, die biologischen Vorgänge als Reaktionen zwischen Molekülen auszudrücken. Daß der Organismus Zellen enthalten sollte, die prädestiniert sind, Antikörper gegen Kunstprodukte des chemischen Laboratoriums zu bilden, ist für den Chemiker und wohl auch für den Biologen schwer vorstellbar.

Trotz all der Gegensätze zwischen der „direct template theory“ und der „clonal selection theory“ sind beide doch Weiterentwicklungen der von Ehrlich vertretenen Anschauungen. Burnet hat von Ehrlich die Idee übernommen, daß präformierte Antikörper für alle nur möglichen Typen von Antigenen vorhanden sind. Er hat diese Theorie erweitert, indem er für jeden Antikörpertypus einen besonderen Zellklon annimmt. Wir selbst haben mit Breinl Ehrlichs Idee der Komplementarität des Antikörpers übernommen und in die Sprache der Chemie übertragen. Beide Theorien bedienen sich vereinfachender Annahmen. Der wahre Vorgang der Antikörperbildung ist vermutlich komplizierter als wir heute vermuten. Eine endgültige Lösung des Problems der Antikörperbildung wird wohl erst möglich sein, wenn wir über die Bionsynthese anderer Proteine und vor allem der normalen Serumglobuline mehr wissen.

Eingegangen am 7. Juni 1960 [A 97]

⁴⁶⁾ J. S. Garvey u. D. H. Campbell, J. exp. Medicine 110, 355 [1959].

⁴⁷⁾ M. Richter u. F. Haurowitz, J. Immunology 84, 420 [1960].

⁴⁸⁾ G. J. V. Nossal u. J. Lederberg, Nature [London] 180, 1419 [1958].

⁴⁹⁾ E. S. Lennox u. M. Cohn, Science [Washington] 130, 1427 [1959].