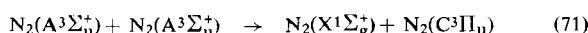


gieren [12a, 17]. Mehreren Autoren ist es kürzlich gelungen, $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Teilchen zu beachtlichen Konzentrationen in Gegenwart nur geringer Konzentrationen von N-Atomen anzureichern [53, 54, 143].

Wie bereits erwähnt [Abschnitt 3, Gl. (5)], ist die wohl wichtigste Reaktion der $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Moleküle die schnelle Reaktion mit $N(^4S)$ -Atomen unter Bildung schwingungsangeregter Moleküle im elektronischen Grundzustand [53]. Es ist interessant anzumerken, daß $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Moleküle in hohen Schwingungsniveaus nicht annähernd so schnell durch N-Atome gelöscht werden ($k = 5 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ molek}\text{ü}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [228a]. Durch den Prozeß



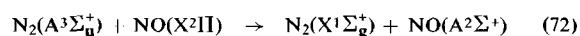
kann Energie gespeichert werden ($k_{71} = 2.1 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ molek}\text{ü}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [228b]. Die anfängliche Bildung von H-Atomen in Reaktionen von aktivem Stickstoff mit organischen Verbindungen könnte durchaus auf Energieübertragung von $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ beruhen. Dieses Molekül mit einer Energie von 142–146 kcal/mol kann auch zur Besetzung von Triplettzuständen verhelfen (triplet sensitizer) [143]. Bei Reaktanden mit niedrig liegenden Triplett niveaus, z.B. $(CN)_2$, SO_2 oder

[228a] M. P. Weinreb u. G. G. Mannella, J. chem. Physics 50, 3129 (1969).

[228b] D. H. Stedman u. D. W. Setser, J. chem. Physics 50, 2256 (1969).

CS_2 , führt die Reaktion mit $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ im allgemeinen zu einer Emission, die auf einem schnellen Triplett-Triplett-Übergang der Reaktanden beruht. Bei anderen Reaktanden, z.B. N_2O und O_2 , bewirken die $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Moleküle eine teilweise Dissoziation [104, 143].

Die Anregung von NO durch $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ erfolgt mit günstigem Wirkungsquerschnitt nach



Ungefähr die Hälfte der energieübertragenden Kollisionen von $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ mit NO führt zu dessen Anregung [229].

Zum Nachweis von $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ ist die 2537-Å-Quecksilberemission vorgeschlagen worden [56, 230–232].

Die Bedeutung der $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Moleküle in aktivem Stickstoff wird allerdings durch ihre relativ geringe Konzentration etwas herabgesetzt: größtenteils kommt auf 1000 N-Atome nur ein $N_2(A^3 \Sigma_u^+)$ -Molekül.

Ein eingegangen am 24. März 1969 [A 744]
Übersetzt von Dr. K. W. Böddeker, Karlsruhe

[229] R. A. Young u. G. A. St. John, J. chem. Physics 48, 898 (1968).

[230] A. Granzow, M. Z. Hoffman, N. N. Lichtin u. S. K. Wason, J. physic. Chem. 72, 3741 (1968).

[231] A. Granzow, M. Z. Hoffman, N. N. Lichtin u. S. K. Wason, J. physic. Chem. 72, 1402 (1968).

[232] R. A. Young u. G. A. St. John, J. chem. Physics 48, 2572 (1968); C. H. Dugan, Canad. J. Chem. 47, 2314 (1969).

Struktur und Immunogenität synthetischer Modellantigene

Von Erwin Rüde [*]

Vollsynthetische Modellantigene werden in der immunologischen Forschung häufig verwendet. In den meisten Fällen handelt es sich um lineare oder verzweigte Polypeptide, die durch Polymerisation von N-Carboxy- α -aminosäureanhydriden oder durch Polymerisation definierter Oligopeptide hergestellt werden. Diese übersichtlich aufgebauten Antigene ermöglichen durch ihre große Variabilität ein systematisches Studium der chemischen und physikalischen Faktoren, die für die Immunogenität, d.h. die Fähigkeit einer Substanz, im höheren Organismus die Bildung von Antikörpern auszulösen, von Bedeutung sind. Die genetische Kontrolle der Immunantwort konnte mit sehr einfachen synthetischen Antigenen erstmals genauer analysiert werden. Die Ergebnisse lassen eine Reihe immunologischer Phänomene besser verstehen und tragen zur Aufklärung der komplexen Vorgänge bei, die unter dem Einfluß eines Antigens zur Bildung spezifischer Antikörper führen.

1. Einleitung

Von sehr vielen Krankheitserregern – Bakterien und Viren – weiß man, daß sie im höheren Organismus nach überstandener Infektion eine spezifische Immunität hinterlassen können. Um 1890 entdeckten von

Behring und Kitasato [1], daß Immunität mit dem Auftreten von Schutzstoffen im Serum – den Antikörpern – verbunden ist, die spezifisch gegen die ursprünglich eingedrungenen Mikroorganismen oder deren Toxine gerichtet sind.

Antikörper sind Serumproteine; sie konnten erst 1938 von Tiselius und Kabat [2] der Klasse der γ -Globuline

[1] Siehe W. Hennessen, Dtsch. med. Wschr. 90, 2181 (1965).

[2] A. Tiselius u. E. A. Kabat, Science (Washington) 87, 372, 416 (1938); E. A. Kabat, J. exp. Medicine 69, 103, 119 (1939).

[*] Dr. E. Rüde

Max-Planck-Institut für Immunbiologie
78 Freiburg-Zähringen, Stübeweg 51

zugeordnet werden. Immunität und Bildung von Antikörpern kann aber nicht nur durch Infektion mit lebenden Bakterien oder Viren ausgelöst werden, sondern auch durch Injektion abgetöteter Mikroorganismen, durch makromolekulare Bestandteile dieser Mikroorganismen und ganz allgemein durch meist makromolekulare Fremdstoffe natürlicher oder synthetischer Herkunft. Man bezeichnet die für die Immunisierung verantwortlichen Substanzen als *Antigene* oder neuerdings auch als *Immunogene* (s.u.). Antigene stimulieren nicht nur die Bildung von Antikörpern, die im Serum zirkulieren, sondern sie lösen auch Abwehrreaktionen aus, die direkt durch bestimmte Zellen vermittelt werden. Ähnlich wie Antikörper sind diese Zellen – vermutlich mit antikörperähnlichen Rezeptoren an der Zelloberfläche – spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichtet. Diese zelluläre Immunität ist für viele immunologische Reaktionen wie die Abstoßung von transplantiertem, fremdem Gewebe oder die Allergiereaktionen vom verzögerten Typ von großer Bedeutung.

Antigene sind für den Organismus im allgemeinen Fremdstoffe. Außer bei gewissen Krankheiten, den Autoimmunerkrankungen, sind körpereigene Substanzen nicht antigen; gegen körpereigene Substanzen ist der Organismus immunologisch *tolerant*. Durch experimentelle Maßnahmen lässt sich allerdings auch gegenüber Fremdsubstanzen, die normalerweise als Antigene wirken, Toleranz erzeugen. Im Zustand der Toleranz ist der Organismus für begrenzte Zeit oder lebenslang nicht imstande, gegen die betreffende Fremdsubstanz Antikörper zu bilden. Die Antikörperbildung gegen andere Fremdsubstanzen ist jedoch nicht beeinträchtigt. Toleranz ist also – ähnlich wie Immunität – sehr spezifisch.

Es ist von großem theoretischem und auch praktischem Interesse, die zellulären und biochemischen Grundlagen dieser Vorgänge aufzuklären. Eines der faszinierendsten Phänomene ist dabei die hohe Spezifität aller Reaktionen, die in der Struktur der Antigene und Antikörper (oder der postulierten antikörperähnlichen Zellrezeptoren) begründet sein muß.

Als zu Anfang dieses Jahrhunderts *Karl Landsteiner* [3] die Frage der immunologischen Spezifität und ihrer chemischen Grundlagen zu bearbeiten begann, war es unmöglich, die Struktur natürlicher Antigene – meist makromolekulare Substanzen – oder die der Antikörper aufzuklären. Er verwendete daher erstmals *künstliche Antigene*, die durch Verknüpfen (z.B. durch Azokupplung) niedermolekularer Verbindungen mit natürlichen Antigenen, meist Proteinen, hergestellt wurden (vgl. auch [4, 5]). Nach Injektion derart modifizierter Proteine bilden Versuchstiere neben Antikörpern, die gegen den Proteinträger selbst gerichtet sind, auch Antikörper, die spezifisch mit den eingeführten, niedermolekularen Gruppen reagieren. Man konnte nun die Struktur dieser künstlich in ein Anti-

[3] K. Landsteiner: The Specificity of Serological Reactions, 2. Aufl., Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1945.

[4] O. Westphal in E. Lehnartz u. B. Flaschenträger: Physiologische Chemie. Springer, Heidelberg 1957, Bd. II/2b, S. 894.

[5] O. Westphal, Naturwissenschaften 46, 50 (1959).

gen eingeführten Gruppen variieren und die Änderung der Spezifität der jeweils gebildeten Antikörper studieren. Aus derartigen Versuchen ergab sich die wichtige Erkenntnis, daß Antikörper nicht gegen das makromolekulare Antigen als Ganzes gerichtet sind, sondern gegen definierte Strukturuntereinheiten, die *determinanten Gruppen*. Nach neueren Untersuchungen ist der wirksame Bezirk der Antikörpermoleküle auf Strukturen oder determinante Gruppen eingestellt, die maximal die Größe etwa eines Hexasaccharids oder eines Tetra- bis Hexapeptids haben [6, 8].

Aus den umfangreichen Untersuchungen mit künstlichen Antigenen entwickelte sich die Vorstellung, daß Antigene aus zwei sich funktionell unterscheidenden Anteilen bestehen: *Der hochmolekulare Träger* ist verantwortlich für die Antigenität, d.h. für die Stimulierung der Antikörperbildung, während *die determinanten Gruppen* die Spezifität der Antikörper bestimmen. Niedermolekulare Verbindungen, die am intakten makromolekularen Antigen als determinante Gruppen fungieren können, sind per se nicht in der Lage, nach Injektion die Bildung von Antikörpern auszulösen. Die niedermolekularen Verbindungen können aber von bereits vorhandenen homologen Antikörpern spezifisch gebunden werden. Das gleiche gilt auch für viele höhermolekulare Bruchstücke von Antigenen. Man bezeichnet solche serologisch aktiven, aber selbst nicht antigenen Substanzen als *Haptene*.

Auf dieser Grundlage wurden die Strukturen der determinanten Gruppen natürlicher Antigene während der letzten Jahrzehnte in großem Umfang untersucht. Besonders erfolgreich war man dabei in der Aufklärung von Polysaccharid-Antigenen wie Bakterienpolysacchariden [4–7] und Blutgruppensubstanzen [9]. Bei Proteinen erwies sich diese Aufgabe als sehr viel komplizierter, da die Struktur der determinanten Gruppen in vielen Fällen durch die räumliche Faltung der Polypeptidketten bestimmt wird [10].

Der Begriff „Antigen“ wurde während dieser Untersuchungen, die sich fast ausschließlich mit der serologischen Spezifität von Antigenen befaßten, zeitweilig ganz allgemein auf Substanzen ausgedehnt, die mit Antikörpern spezifisch – z.B. unter Ausfällung – reagieren. Die primäre Eigenschaft eines Antigens, *in vivo* die Bildung von Antikörpern oder zelluläre Immunität auszulösen, trat demgegenüber oft völlig in den Hintergrund. Erst neuerdings gilt das Interesse wieder mehr der Fragestellung, welche chemischen und physikalischen Eigenschaften eine Substanz haben muß, um im Sinne der ursprünglichen Definition antigen zu sein. Um diese Eigenschaft deutlich von der „Antigenität“ im Sinne der serologischen Spezifität abzuheben, führte man den Begriff „Immunogenität“ ein.

[6] E. A. Kabat, J. Immunology 97, 1 (1966).

[7] O. Lüderitz, A. M. Staub u. O. Westphal, Bacteriological Reviews 30, 192 (1966).

[8] J. W. Goodman, D. E. Nitecki u. J. M. Stoltenberg, Biochemistry 7, 706 (1968); J. Haimovich, I. Schechter u. M. Sela, Europ. J. Biochemistry 7, 537 (1969).

[9] W. M. Watkins, Science (Washington) 152, 172 (1966).

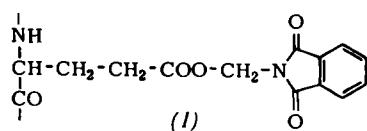
[10] J. W. Goodman, Immunochemistry 6, 139 (1969).

Aus der Erfahrung mit natürlichen Antigenen ist schon lange bekannt, daß die Immunogenität einer Substanz in charakteristischer Weise von ihrer Zusammensetzung und dem Molekulargewicht abhängen kann [11]. Während sich beispielsweise artfremde Proteine allgemein als sehr wirksame Immunogene erweisen, sind manche hochgereinigte Polysaccharide – besonders für das Kaninchen – nicht immunogen. Neben chemisch modifizierten und partiell abgebauten Antigenen natürlichen Ursprungs werden seit 1960 zunehmend vollsynthetische Polypeptid-Antigene zum systematischen Studium der Immunogenität eingesetzt [12]. Synthetische Polypeptide haben eine relativ einfache, definierte und zudem leicht zu verändernde Struktur und erleichtern dadurch die Interpretation immunologischer Ergebnisse.

2. Synthese von Modellantigenen

Synthetische Modellantigene wurden bisher fast ausschließlich aus Aminosäuren aufgebaut. In den meisten Fällen handelt es sich dabei nicht um schrittweise synthetisierte Polypeptide mit definierter Aminosäuresequenz, sondern um Homopolymere oder Copolymeren mit statistischem Aufbau, die relativ einfach auch mit hohen Molekulargewichten hergestellt werden können. Die Synthese derartiger Poly- α -amino-säuren wurde von Katchalski und Sela zusammenfassend beschrieben [13] und wird hier deshalb nur an einigen Beispielen erläutert.

Als monomere Ausgangsprodukte dienen *N*-Carboxy- α -amino-säure-anhydride (Leuchssche Anhydride) (2), die man heute meist durch Umsetzung von Aminosäuren mit Phosgen in wasserfreien, inerten Lösungsmitteln herstellt (Fuchs-Farthing-Methode). Funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren werden dabei im allgemeinen durch Schutzgruppen blockiert. Lediglich Tyrosin wird gewöhnlich in freier Form eingesetzt. In der Mehrzahl der Fälle genügen als Schutzgruppen Benzyl-(Benzylester, Benzyläther) und Benzyloxycarbonyl-Reste, die nach der Polymerisation durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig abgespalten werden. Bei der Synthese von Polypeptid-Derivaten von Proteinen (s. Abschnitt 2.3) müssen allerdings Schutzgruppen verwendet werden, die sich unter milder Bedingungen entfernen lassen. Zum Schutz der ϵ -Aminogruppe von Lysin und der γ -Carboxylgruppe von Glutaminsäure wurden der Trifluoracetyl- [14] bzw. der Phthalimid-



[11] E. A. Kabat u. M. M. Mayer: Experimental Immunology. 2. Aufl., Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1961, S. 7.

[12] M. Sela, Advances Immunol. 5, 29 (1966).

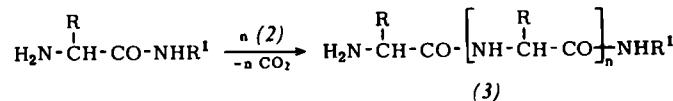
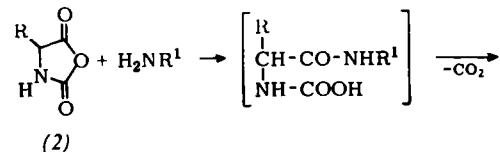
[13] E. Katchalski u. M. Sela, Advances Protein Chem. 13, 243 (1958).

[14] M. Sela, R. Arnon u. I. Jacobson, Biopolymers 1, 517 (1963).

methyl-Rest [15] [vgl. (1)] verwendet, die beide oberhalb pH = 10 (z. B. durch Behandlung mit Piperidin in wässriger Lösung bei 0 °C) wieder abgespalten werden können.

2.1. Lineare Polymere aus Aminosäuren

N-Carboxy- α -amino-säure-anhydride (2) haben die Eigenschaft, in inerten Lösungsmitteln in Gegenwart basischer Katalysatoren unter Abspaltung von Kohlendioxid zu polymerisieren. Es entstehen lineare Poly- α -amino-säuren (3) [13].



Weder bei der Herstellung der Anhydride noch während der Polymerisation findet Racemisierung statt. Der durchschnittliche Polymerisationsgrad kann durch Menge und Art des basischen Starters weitgehend variiert werden. Tertiäre Amine und Natriummethanolat geben im allgemeinen hohe Molekulargewichte (20000–1000000), sekundäre und primäre Amine niedrigere (1000–20000). Primäre und sekundäre Amine werden dabei als Amide am C-terminalen Ende in die Peptidkette eingebaut.

Durch Copolymerisation verschiedener *N*-Carboxy-amino-säure-anhydride erhält man Polymere mit einer annähernd statistischen Verteilung der einzelnen Aminosäurereste über die Polypeptidkette. Die für Modellantigene besonders interessierende Löslichkeit linearer Polymerer und Copolymerer in Wasser ist weitgehend abhängig von der Aminosäurezusammensetzung (hydrophile oder hydrophobe Seitenketten), der Sekundärstruktur (statistische Knäuelform, α -Helix oder durch intermolekulare Wasserstoffbrücken „quervernetzte“ β -Form) und dem Molekulargewicht [13, 22]. Hochgeordnete Homopolymere sind im allgemeinen schwerer löslich als Copolymeren. Beispielsweise lösen sich Poly-L-alanin und Poly-D-alanin nicht in Wasser, während das „Copolymer“ Poly-D,L-alanin sehr gut wasserlöslich ist.

2.2. Verzweigte Polymere aus Aminosäuren

Die Synthese verzweigter Poly- α -amino-säuren für immunologische Untersuchungen wurde hauptsächlich von Sela und Mitarbeitern [16] entwickelt. Als Rückgrat dieser Substanzen wählt man meist Poly-L-lysin [(4) in Abb. 1] oder ein lineares, lysinhaltiges Copolymeres. Die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste dienen als Starter für die Polymerisation von *N*-Carboxy-amino-säure-anhydriden. Dabei werden an das lineare Rückgrat Peptidseitenketten anpolymeri-

[15] M. Wilchek, A. Frensdorff u. M. Sela, Arch. Biochem. Biophys. 113, 742 (1966).

[16] M. Sela, E. Katchalski u. M. Gehatia, J. Amer. chem. Soc. 78, 746 (1956).

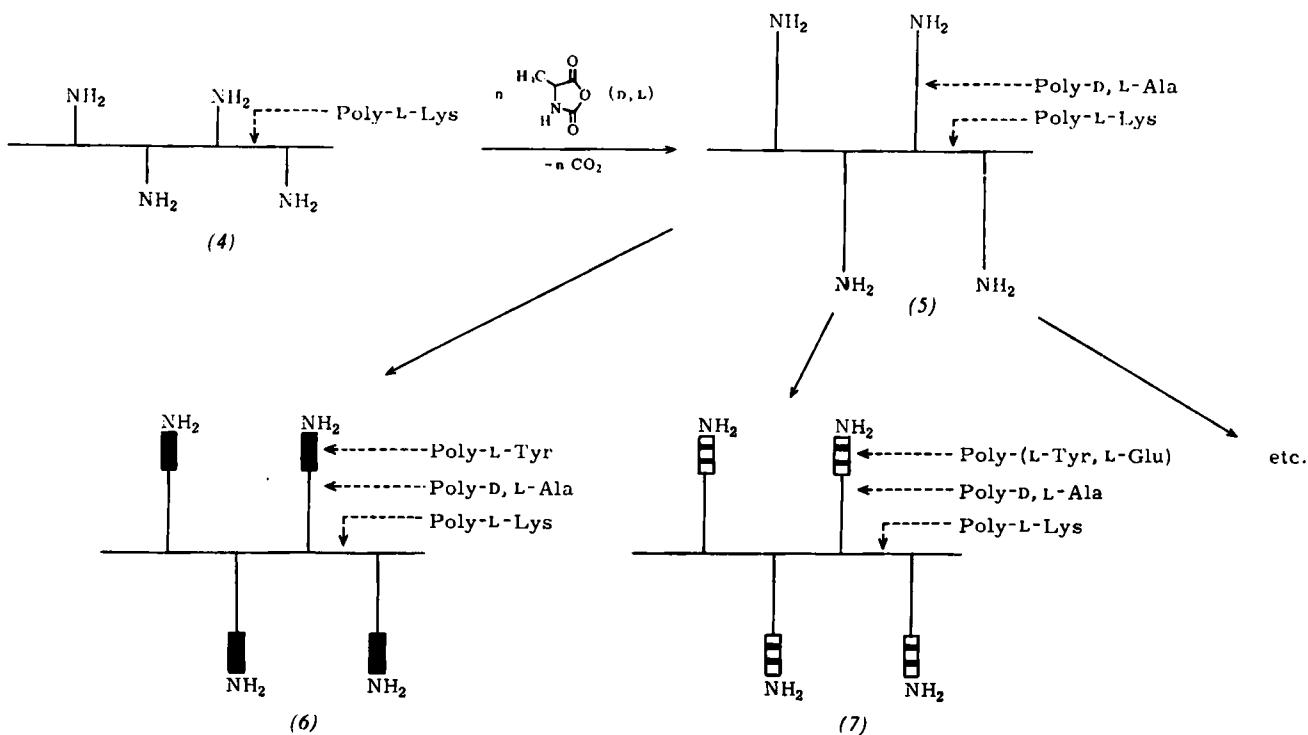


Abb. 1. Herstellung verzweigter Poly- α -aminoäuren nach Sela [12], schematisch.

siert, deren Länge in weiten Grenzen variiert werden kann. Diese Umsetzung kann auch in wäßrigem Medium durchgeführt werden, da die Polymerisation schneller abläuft als die Hydrolyse der Anhydride. Als Nebenprodukte auftretende lineare Polymere von etwa gleicher Länge wie die Seitenketten werden durch Dialyse oder Gel-Filtration vom sehr viel höhermolekularen verzweigten Polymeren abgetrennt. Für die Synthese von Modellantigenen wurde häufig ein verzweigtes Grundpolymeres benutzt, das aus einem Poly-L-lysin-Rückgrat und Seitenketten aus Poly-D,L-alanin (durchschnittlich 15–20 Alaninreste) aufgebaut ist^[17]. Dieses Polymere (5) wird im folgenden als verzweigtes Poly-D,L-alanin bezeichnet. Seitenketten aus Poly-D,L-alanin vermitteln im Gegensatz

Die Seitenketten dieser verzweigten Poly- α -aminoäuren enden jeweils wieder mit einer Aminogruppe, an die beliebige weitere Aminosäuren, z.B. Tyrosin oder kurze Copolymere aus Tyrosin und Glutaminsäure [vgl. (6) und (7) in Abb. 1] anpolymerisiert werden können^[17–19]. Insgesamt ergeben sich sehr viele Variationsmöglichkeiten.

2.3. Polypeptidderivate von Proteinen

Auch die ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste und die N-terminalen Aminogruppen von Proteinen [(8) in Abb. 2] können als Starter für die Polymerisation von *N*-Carboxy-aminoäureanhydriden dienen. Unter

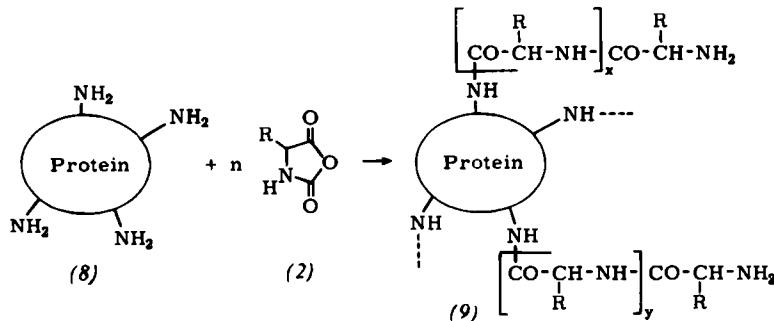


Abb. 2. Herstellung von Polypeptidyl-Proteinen, schematisch.

zu Seitenketten aus Poly-L- oder Poly-D-alanin wasserlöslichkeit. Neuerdings wurden analoge Polymere mit Polyprolin-Seitenketten synthetisiert, die ähnlich wie lineares Poly-L- oder Poly-D-prolin auch bei Verwendung der reinen Antipoden wasserlöslich sind^[18].

[17] M. Sela, S. Fuchs u. R. Arnon, Biochem. J. 85, 223 (1962).
 [18] J. Jaton u. M. Sela, J. biol. Chemistry 243, 5616 (1968).

sehr milden Bedingungen in wäßriger Lösung bei $\text{pH} = 7$ werden an diese Aminogruppen Polypeptidketten anpolymerisiert^[20]. Native Proteine setzen sich jedoch nicht unbedingt an allen Aminogruppen mit

[19] S. Fuchs u. M. Sela, Biochem. J. 93, 566 (1964).

[20] M. A. Stahmann u. R. R. Becker, J. Amer. chem. Soc. 74, 2695 (1952); R. R. Becker u. M. A. Stahmann, J. biol. Chemistry 204, 745 (1953).

dem Anhydrid um, da die Reaktivität einzelner Aminogruppen sehr stark von der Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins abhängt [21]. Die Eigenschaften und die biologische Aktivität von Polypeptid-Derivaten des Typs (9) von Enzymen, Hormonen [22, 23] und Antikörpern [24] sind naturgemäß von großem Interesse. Für immunologische Untersuchungen sind derart modifizierte Proteine oft wertvoller als solche, die nur relativ kleine determinante Gruppen wie Dinitrophenyl- oder Arsanilsäure-Reste enthalten [25, 26].

2.4. Regelmäßig aufgebaute Polypeptide

Die bisher beschriebenen vollsynthetischen Poly- α -aminoäuren sind einfach und übersichtlich aufgebaut, haben aber – bedingt durch die Synthesemethode – eine statistische Sequenz der Aminoäure-Reste. Bei vielen Untersuchungen ist es jedoch notwendig, die genaue Sequenz der Aminoäuren zu kennen. Die schrittweise Synthese eines hochmolekularen Antigens von definierter Aminoäuresequenz ist sehr aufwendig. Man geht daher von *vorfabrizierten, definierten Oligopeptiden* aus, die man entweder durch Kondensation mit einem linearen Rückgratpolymeren in verzweigte Makromoleküle überführt oder zu linearen Polymeren von sich periodisch wiederholender Aminoäuresequenz polymerisiert.

Nach der ersten Methode wurden von *E. Haber* und Mitarbeitern die Oligopeptidhormone Angiotensin (Oktapeptid) und Bradykinin (Nonapeptid) als Seiten-

ketten an Poly-L-lysin kondensiert [27]. Die Verknüpfung mit Poly-L-lysin erfolgte durchschnittlich an jeder 33. bzw. 5. Lysineinheit über das C-terminale Ende von Angiotensin mit Carbodiimid oder über die N-terminale Aminogruppe von Bradykinin mittels 1,2-Diisocyanato-4-methyl-benzol.

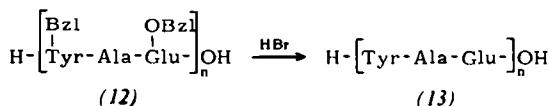
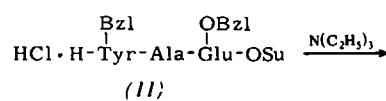
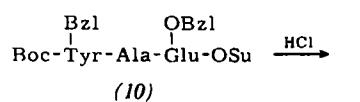
Die Synthese eines Modellantigens (13) nach der zweiten Methode geht z.B. von einem Oligopeptid aus, dessen N-terminale Aminogruppe durch den tert.-Butyloxycarbonyl(Boc)-Rest blockiert und dessen C-terminales Ende als *N*-Hydroxysuccinimidester (OSu) aktiviert ist (10). Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mit Salzsäure wird die Polymerisation des als Hydrochlorid noch geschützten Oligopeptids (11) zu (12) durch Freisetzen der N-terminalen Aminogruppe mit Triäthylamin eingeleitet [28]; aus (12) wird (13) durch Behandlung mit Bromwasserstoff erhalten.

3. Immunologische Methoden

3.1. Immunisierung

Die Immunogenität einer Substanz wird fast ausschließlich durch das Tierexperiment nachgewiesen. Nur in besonderen Fällen ist es bis jetzt gelungen, Kulturen lymphoider Zellen oder kleine Gewebestückchen aus der Milz [29] *in vitro* durch zelluläre Antigene, z.B. Erythrocyten, zur Antikörperbildung zu stimulieren. Um festzustellen, ob eine Substanz überhaupt immunogen ist, wird man natürlich die nach den bisherigen Kenntnissen und Erfahrungen wirksamste Immunisierungsmethode anwenden [30]. Synthetische Modellantigene werden deshalb fast immer zusammen mit einem *Adjuvant*, meist dem kompletten „Freundschen Adjuvant“, injiziert.

Adjuvantien steigern die Immunogenität von Antigenen in unspezifischer Weise; über ihre Wirkungsweise ist noch nichts Endgültiges bekannt. Die Erfahrung hat gezeigt, daß es eine generell gültige, optimale Immunisierungsmethode nicht gibt. Antigene können ein- oder mehrmals, in verschiedenen zeitlichen Abständen und in verschiedener Dosierung injiziert werden. Der Erfolg eines bestimmten Immunisierungsganges hängt unter anderem entscheidend von der Natur des Antigens und der verwendeten Tierart ab. Aussagen über die Immunogenität einer Substanz gelten daher nur für die jeweiligen experimentellen Bedingungen. Besonders der Befund, daß eine Substanz nicht immunogen ist, darf nicht ohne weiteres verallgemeinert werden, denn eine andere Immunisie-



Boc = tert.-Butyloxycarbonyl, BzI = Benzyl, OSu = Succinimidoxyl.

[21] C. B. Anfinsen, M. Sela u. J. P. Cooke, J. biol. Chemistry 237, 1825 (1962).

[22] E. Katchalski, M. Sela, H. I. Silman u. A. Berger in H. Neurath: The Proteins. 2. Aufl., Academic Press, New York 1964, Bd. 2, S. 405.

[23] A. Frensdorff u. M. Sela, Europ. J. Biochemistry 1, 267 (1967); A. Frensdorff, M. Wilchek u. M. Sela, Europ. J. Biochemistry 1, 281 (1967).

[24] S. Fuchs u. M. Sela, J. biol. Chemistry 240, 3558 (1965); M. H. Freedman u. M. Sela, J. biol. Chemistry 241, 2383, 5225 (1966); F. Karush u. M. Sela, Immunochemistry 4, 259 (1967); K. J. Dorrington, M. H. Zarlengo u. C. Tanford, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 996 (1967).

[25] H. J. Sage, G. F. Deutsch, G. D. Fasman u. L. Levine, Immunochemistry 1, 133 (1964); R. Arnon, M. Sela, A. Yaron u. H. A. Sober, Biochemistry 4, 948 (1965); I. Schechter, B. Schechter u. M. Sela, Biochim. biophysica Acta 127, 438 (1966); I. Schechter u. M. Sela, Biochemistry 6, 897 (1967).

[26] I. Schechter, J. exp. Medicine 127, 237 (1968).

[27] E. Haber, F. F. Richards, J. Spragg, K. F. Austen, M. Valotton u. L. B. Page, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 32, 299 (1967).

[28] M. Sela, B. Schechter, I. Schechter u. F. Borek, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 32, 537 (1967).

[29] Siehe z.B. A. Globerson u. R. Auerbach, J. exp. Medicine 124, 1001 (1966); W. P. McArthur, A. J. Hutchinson u. M. J. Freeman, Nature (London) 222, 84 (1969).

[30] Siehe z.B. C. A. Chase u. M. W. Chase: Methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press, New York 1967, Bd. 1.

rungsmethode oder allein schon eine andere Dosierung des Antigens könnte bei einer anderen Tierart oder bei einem anderen Stamm der gleichen Spezies sehr wohl zur Antikörperbildung führen.

Verzweigtes Poly-D,L-alanin (5) wurde beispielsweise lange Zeit für nicht immunogen gehalten. Nachdem man aber das Polymere statt wie ursprünglich intramuskulär über viele Stellen verteilt intracutan injizierte, konnte man bei etwa 80% der Tiere (Kaninchen) die Bildung von Antikörpern nachweisen [31].

3.2. Nachweis von Antikörpern

Von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der Immunogenität einer Substanz ist neben der Immunisierungsmethode die Empfindlichkeit des Antikörpernachweises. Bei Untersuchungen mit synthetischen Antigenen werden allgemein gebräuchliche Nachweisverfahren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* angewandt [11, 32]. Zu den *in-vitro*-Verfahren gehören der Präzipitationstest, die passive Hämagglutination, die Komplementbindungsreaktion und Bindungsteste mit radioaktiv markierten Antigenen. Zum Nachweis von Antikörpern *in vivo* und zum Nachweis der zellulären Immunität dienen unter anderem Hautteste. Dabei werden dem behandelten Tier kleine Mengen Antigen intracutan injiziert, und es kommt bei Anwesenheit zirkulierender Antikörper nach 15–20 min zu einer allergischen Hautreaktion, die nach etwa 5–6 Stunden das typische Bild der „Arthus-Reaktion“ zeigen kann. Tritt eine Hautreaktion dagegen erst nach 1–2 Tagen auf (verzögter Typ der Allergie; Beispiel: Tuberkulintest), so wird diese nicht durch zirkulierende Antikörper, sondern unmittelbar durch spezifisch reaktive Zellen vermittelt.

Der passive cutane Anaphylaxietest (PCA-Test) wird dagegen nicht am immunisierten Tier selbst durchgeführt; vielmehr wird die auf Antikörper zu testende Serumprobe durch intracutane Injektion auf ein Normaltier übertragen. Das Antigen wird anschließend zusammen mit einem Farbstoff, der die lokale Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar macht, intravenös injiziert.

4. Immunologische Untersuchungen mit synthetischen Modellantigenen

4.1. Strukturelle Aspekte

Poly- α -aminoäuren wurden ursprünglich als einfache Modelle der Polypeptidketten von Proteinen hauptsächlich für physikalisch-chemische Untersuchungen herangezogen [22]. Die ersten Beobachtungen, daß derartige vollsynthetische Makromoleküle auch als Immunogene wirksam sein können, stammen von Stahmann und Mitarbeitern (1955) [33]. 1960 synthetisierten Sela und Arnon [34] ein verzweigtes Polymeres und Gill und Doty [35] ein lineares Copolymeres aus Aminoäuren, die sich beide eindeutig als immunogen erwiesen. In weiteren Untersuchungen sind von vielen Arbeitsgruppen (Gill, Sela, Maurer, Benacerraf und andere) zahlreiche analoge Substanzen auf ihre Immunogenität geprüft worden [12].

4.1.1. Aminoäurezusammensetzung

Zunächst war die Frage zu stellen, wie die Immunogenität synthetischer Polypeptide von ihrer Aminoäurezusammensetzung abhängt. Die ersten systematischen Studien dazu wurden allerdings nicht mit synthetischen Polypeptiden, sondern mit Polypeptid-Derivaten von Gelatine, also halbsynthetischen Makromolekülen, durchgeführt [19, 36]. Gelatine selbst ist nur sehr schwach immunogen, d.h. Versuchstiere bilden beim Versuch der Immunisierung nur sehr geringe Mengen spezifischer Antikörper. Durch Anpolymerisieren von Peptidketten verschiedener Zusammensetzung (Abb. 2) ließ sich dann prüfen, ob und durch welche Aminoäuren die Immunogenität gesteigert werden kann (Erhöhung der Antikörpertiter). Dies ist vor allem bei einigen aromatischen Aminoäuren (Tyrosin, Phenylalanin), aber auch bei Cyclohexylalanin – dem nicht-aromatischen Analogon von Phenylalanin – der Fall, während Aminoäuren wie Serin, Glutaminsäure und Lysin ohne Wirkung bleiben. Bemerkenswerterweise führt eine Kombination dieser nicht wirksamen Aminoäuren in Form von Copolymeren, z.B. aus Glutaminsäure und Lysin, zu einer deutlichen Steigerung der Immunogenität.

Die einfachsten vollsynthetischen Polypeptide, also lineare Homopolymeren (3) aus nur einer Art von Aminoäure-Resten, scheinen mit wenigen Ausnahmen nicht immunogen zu sein. Lediglich nach Behandlung von Kaninchen oder Meerschweinchen mit Polyprolin [37], Polylysin [38, 81] und Polyglutaminsäure [81] konnte bisher in sehr geringem Umfang Antikörperbildung oder eine Allergiereaktion vom verzögerten Typ (s. Abschnitt 3.2) nachgewiesen werden.

Die mangelnde Immunogenität vieler Homopolymerer ist aber nicht darauf zurückzuführen, daß keine Antikörper entsprechender Spezifität synthetisiert werden könnten. Polymerisiert man Aminoäuren in Form kurzer Homopolymerer an einen Proteinträger (Abb. 2), so lassen sich nach Injektion dieser künstlichen Antigene Antikörper nachweisen, die gegen die als determinante Gruppen fungierenden Homopolymeren gerichtet sind [25]. Homopolymeren verhalten sich dem-

[34] M. Sela u. R. Arnon, *Biochim. biophysica Acta* 40, 382 (1960).

[35] T. J. Gill III u. P. Doty, *J. molecular Biol.* 2, 65 (1960).

[36] M. Sela u. R. Arnon, *Biochem. J.* 75, 91 (1960); 77, 394 (1960); R. Arnon u. M. Sela, *Biochem. J.* 75, 103 (1960).

[37] H. E. Jasin u. L. E. Glynn, *Immunology* 8, 95 (1965).

[38] I. Green, W. E. Paul u. B. Benacerraf, *J. exp. Medicine* 123, 859 (1966).

[31] A. Rimon, D. Teitelbaum, S. Bauminger u. M. Sela, *Immunology* 4, 505 (1967).

[32] D. M. Weir: *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1967.

[33] M. A. Stahmann, H. Tsuyuki, K. Weinke, C. Lapresle u. P. Grabar, *C. R. hebdo. Séances Acad. Sci.* 241, 1528 (1955).

nach meist wie Haptene; sie sind nur in Kombination mit einem immunogenen Träger imstande, die Antikörperbildung auszulösen.

Die Bindung von linearen Homopolymeren an den Proteinträger muß nicht unbedingt kovalent sein. Die nicht immunogene, negativ geladene Polyglutaminsäure bildet mit dem überwiegend positiv geladenen Methylester von Serumalbumin einen schwerlöslichen Komplex. Injiziert man diesen Komplex, so erhält man Antikörper, die spezifisch gegen Polyglutaminsäure gerichtet sind. Analog verhält sich auch Polylysin nach Komplexbildung mit sauren Trägerproteinen^[39]. Auf dieser Basis kann man auch Antikörper gegen Nucleinsäuren und gegen in reiner Form nicht immunogene, saure Polysaccharide gewinnen^[40].

Im Gegensatz zu Homopolymeren sind lineare, aus zwei Aminosäuren aufgebaute Copolymeren in bestimmten Fällen – je nach der Aminosäurezusammensetzung und der untersuchten Tierspezies – immunogen, jedoch meist nicht für alle Individuen einer Spezies (genetische Kontrolle, s. Abschnitt 4.2). Copolymeren aus drei und besonders aus vier Aminosäuren schließlich sind fast immer wirksame Immunogene^[12, 41].

Verzweigte synthetische Polypeptide wurden hauptsächlich von Sela und Mitarbeitern für Immunisierungsversuche verwendet. Als Ausgangspolymeres diente meist verzweigtes Poly-D,L-alanin (5), das, wie bereits erwähnt, unter den von diesen Autoren üblicherweise angewendeten experimentellen Bedingungen nicht immunogen ist. Es wurde nun untersucht, welche Aminosäuren beim Anpolymerisieren an die Enden der D,L-Alanin-Seitenketten (Abb. 1) Immunogenität hervorrufen^[12, 17, 19, 42]. Das war bei Tyrosin der Fall, und zwar genügten dazu – vgl. (6) – schon durchschnittlich 1.7 Tyrosin-Reste pro Seitenkette. Besonders wirksame Immunogene erhielt man durch Verlängern der D,L-Alanin-Seitenketten mit kurzen Copolymeren (etwa 6–7 Aminosäurereste) aus Tyrosin, Histidin oder Phenylalanin, jeweils kombiniert mit Glutaminsäure [vgl. (7) in Abb. 1]. Auch eine Kombination von Glutaminsäure mit Lysin führte, ähnlich wie bei Gelatine, zu einem immunogenen Polymeren, während eine Verlängerung der Seitenketten mit kurzen Homopolymeren nur aus Glutaminsäure oder Lysin ohne Wirkung blieb.

Aus all diesen Versuchen lassen sich jedoch keine strengen Gesetzmäßigkeiten über den Zusammenhang zwischen Aminosäurezusammensetzung und Immunogenität synthetischer Polypeptide ableiten. Vielleicht liegt dies an der Vielfalt der Faktoren, die *in vivo* für die Antikörperbildung von Bedeutung sind. Immerhin kann man folgende Erfahrungsregeln zusammenfassen:

[39] H. van Vunakis, J. Kaplan, H. Lehrer u. L. Levine, *Immunochemistry* 3, 393 (1966); T. J. Gill III u. H. W. Kunz, *Biochim. biophysica Acta* 124, 374 (1966).

[40] O. J. Plescia, W. Braun u. N. C. Palczuk, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 52, 279 (1964).

[41] Siehe z.B. T. J. Gill III u. P. Doty, *J. biol. Chemistry* 236, 2677 (1961); P. H. Maurer, B. F. Gerulat u. P. Pinchuck, *J. biol. Chemistry* 239, 922 (1964); J. exp. Medicine 119, 1005 (1964); P. Pinchuck u. P. H. Maurer, J. exp. Medicine 122, 665 (1965); J. Immunology 100, 384 (1968).

[42] S. Fuchs u. M. Sela, *Biochem. J.* 87, 70 (1963).

1. Aromatische Aminosäuren scheinen besonders immunogenitätssteigernd zu wirken; sie sind allerdings für die Immunogenität eines Polymeren nicht notwendig, denn auch Polypeptide, die keine aromatischen Aminosäuren enthalten, können wirksame Immunogene sein.

2. Wichtig für die Immunogenität einer Substanz scheint eine gewisse Vielfalt der Strukturelemente zu sein. Wie sich aus den angeführten Beispielen ergibt, ist die Wahrscheinlichkeit, daß synthetische Polypeptide immunogen sind, um so größer, je mehr Arten von Aminosäuren sie enthalten und je größer damit bei Copolymeren die Zahl der statistisch möglichen Aminosäuresequenzen wird.

Diese Tatsache hängt möglicherweise mit einem genetisch kontrollierten „Erkennungsvorgang“ (s. Abschnitt 4.2) durch zelluläre Rezeptoren zusammen, der vor der eigentlichen Antikörperbildung über die Immunogenität einer Substanz entscheidet. Nach einer neueren Hypothese muß das Antigen dazu verschiedene Strukturen oder determinante Gruppen enthalten, die bei der „Erkennung“ durch den Immunapparat zusammenwirken (kooperativer Effekt)^[43, 44]. Ein komplexer Aufbau würde sich daher günstig auf die Immunogenität einer Substanz auswirken. Insgesamt stimmen die Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Erfahrungsregeln für Polypeptid-Derivate von Gelatine sowie für lineare und stark verzweigte synthetische Poly- α -amino-säuren weitgehend überein. Die Gestalt eines Makromoleküls spielt demnach für die Immunogenität keine entscheidende Rolle.

4.1.2. Sterische Zugänglichkeit determinanter Gruppen

Außer in der Aminosäurezusammensetzung können verzweigte Polypeptid-Antigene auch in der Anordnung der Aminosäure-Reste so variiert werden, daß man den Einfluß der räumlichen Zugänglichkeit determinanter Gruppen auf die Immunogenität relativ einfach untersuchen kann. Dazu wurden folgende Polymere synthetisiert und auf ihre Fähigkeit, die Antikörperbildung auszulösen, untersucht^[17]: An eine Grundkette aus Poly-L-lysin wurden kurze Copolymeren aus Tyrosin und Glutaminsäure anpolymerisiert, ohne wie zuvor beschrieben D,L-Alaninketten dazwischen zu schalten. Ein derartiges verzweigtes Polymeres (14) erwies sich als immunogen. Wurden nun die kurzen Seitenketten durch etwa 20 D,L-Alanin-Reste verlängert, so entstand ein Produkt (15), das im Molekulargewicht und in der Zusammensetzung dem oben beschriebenen (7) entspricht. Die Tyrosin-Glutaminsäure-Sequenzen befinden sich jetzt lediglich

[43] N. A. Mitchison, *Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol.* 32, 431 (1967).

[44] K. Rajewsky, V. Schirrmacher, S. Nase u. N. K. Jerne, *J. exp. Medicine* 129, 1131 (1969).

[45] F. S. Kantor, A. Ojeda u. B. Benacerraf, *J. exp. Medicine* 117, 55 (1963).

[46] B. B. Levine, A. Ojeda u. B. Benacerraf, *J. exp. Medicine* 118, 953 (1963).

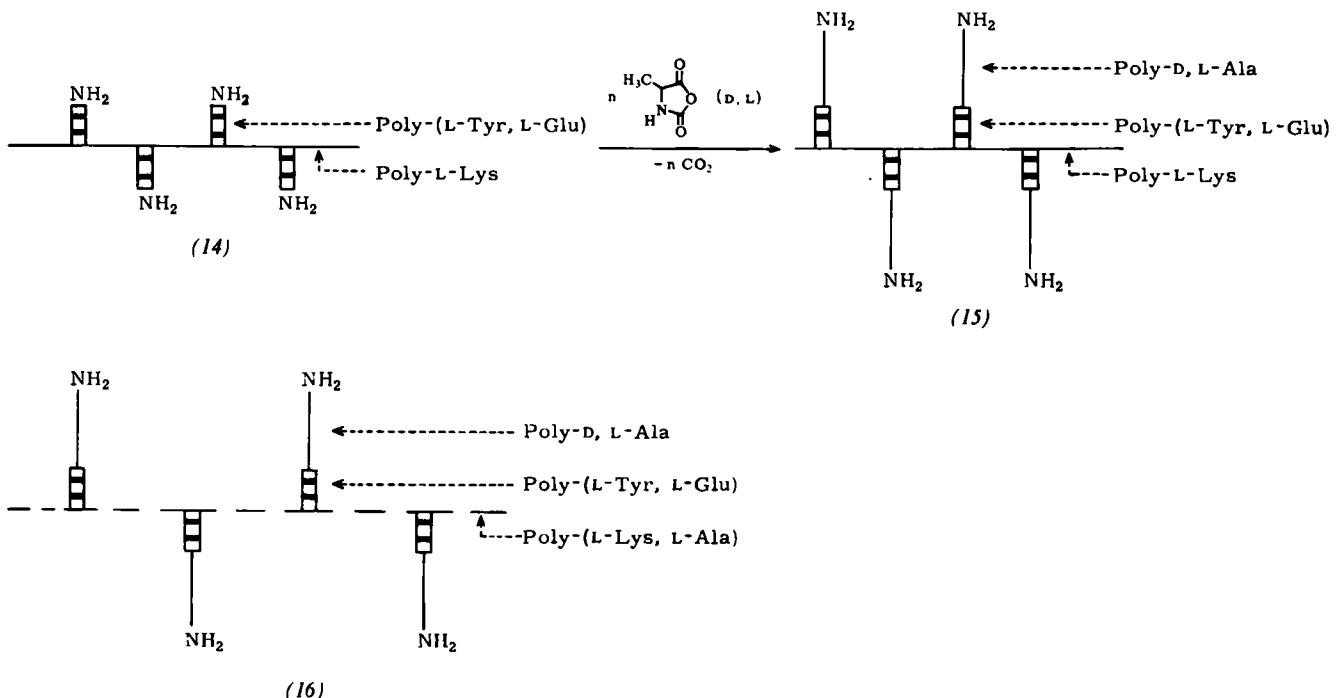


Abb. 3. Aufbau verzweigter Poly- α -aminoäuren nach Sela [12], schematisch. Erläuterungen s. Text.

im Innern des Moleküls statt außen. Dieses Polypeptid (15) war nicht immunogen, wohl aber eine verwandte Struktur mit größeren durchschnittlichen Abständen der Seitenketten. Man erhielt eine solche Struktur (16), indem man als Rückgrat kein reines Poly-L-lysin, sondern ein Copolymeres aus Lysin und Alanin verwendet.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die für die Immunogenität einer Substanz wichtigen Strukturteile sterisch zugänglich sein müssen, damit die Antikörperbildung ausgelöst werden kann. Ist diese Voraussetzung erfüllt, so scheint es gleichgültig zu sein, ob die wichtigen Bereiche (z.B. die Tyr-Glu-Sequenzen) an den Enden oder innerhalb der Seitenketten angeordnet sind.

4.1.3. Chemische Substitution

Synthetische Antigene müssen keine reinen Polypeptide sein, vielmehr können die funktionellen Gruppen der Aminosäure-Reste verändert werden [12]. Vor allem die Kupplungsprodukte mit einfachen aromatischen Hapteten wie 2,4-Dinitrofluorbenzol [45, 46], Arsanilsäure [47, 48] mit Penicillin [49], Coenzymen [50], Nucleosiden [51], Zuckern [52] und Glykolipiden [52a]

[47] S. Leskowitz, J. exp. Medicine 117, 909 (1963); Nature (London) 199, 85, 291 (1963).

[48] F. Borek u. Y. Stupp, Immunochemistry 3, 339 (1966).

[49] C. W. Parker, A. L. deWeck, M. Kern u. H. N. Eisen, J. exp. Medicine 115, 803 (1962); B. B. Levine, Immunology 7, 527 (1964).

[50] H. Ungar-Waron u. M. Sela, Biochim. biophysica Acta 124, 147 (1966); J. C. Jaton u. H. Ungar-Waron, Arch. Biochem. Biophysics 122, 157 (1967).

[51] H. Ungar-Waron, E. Hurwitz, J. C. Jaton u. M. Sela, Biochim. biophysica Acta 138, 513 (1967).

[52] E. Rüde, O. Westphal, E. Hurwitz, S. Fuchs u. M. Sela, Immunochemistry 3, 137 (1966).

[52a] R. Arnon, M. Sela, E. S. Rachaman u. D. Shapiro, Europ. J. Biochemistry 2, 79 (1967).

fanden als Modellantigene Verwendung. Je nach Ziel der Untersuchungen stand dabei entweder die Immunogenität der Substitutionsprodukte oder die Spezifität der gebildeten Antikörper im Vordergrund des Interesses.

Lineare Homopolymere wie Poly-L-tyrosin oder Poly-L-lysin sind, wie schon erwähnt, im allgemeinen nicht oder nur sehr schwach immunogen. Durch Einführen von Arsanilsäure-Resten oder von Dinitrophenyl-, *p*-Toluolsulfonyl(Tosyl)- oder 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl(Dansyl)-Gruppen wurde die Immunogenität der beiden Polymeren teilweise beträchtlich gesteigert. Produkte mit einem Hapten-Rest auf etwa 20 Aminosäure-Reste waren dabei wirksamer als höher substituierte, die zum Teil nicht immunogen waren [45, 48].

Zucker sind als Träger der serologischen Spezifität vieler natürlicher Antigene von großer Bedeutung [4, 5, 7, 9] und fungieren auch in künstlichen Antigenen als determinante Gruppen [52-56]. Reine Polysaccharide zeigen im Vergleich zu Protein- und Polypeptid-Antigenen dagegen sehr oft ein besonderes immunologisches Verhalten. Sie sind beispielsweise für das Kaninchen im allgemeinen nicht immunogen [11], sondern verhalten sich vielmehr wie Haptene, die nur in Verbindung mit einem immunogenen Träger (z.B. einem Protein) die Synthese polysaccharid-spezifischer Antikörper stimulieren können (s. Abschnitt 4.1.1). Die Immunisierung von Mäusen mit

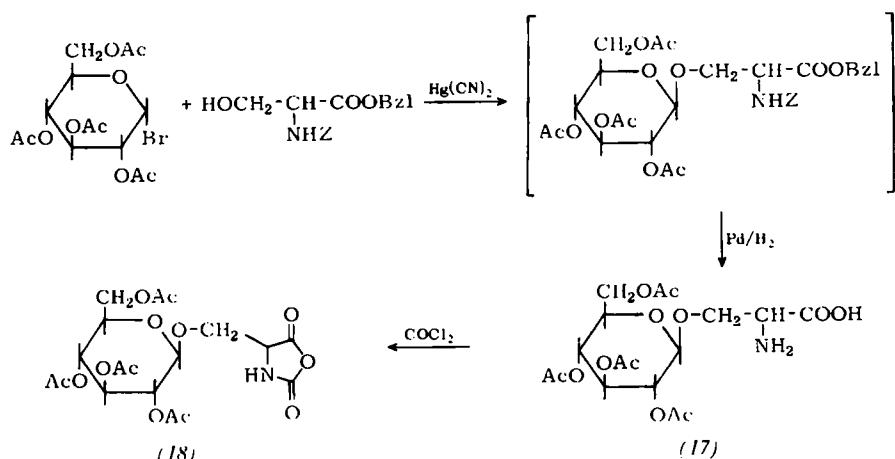
[53] W. F. Goebel u. O. T. Avery, J. exp. Medicine 50, 521 (1929).
 [54] W. F. Goebel, J. exp. Medicine 68, 469 (1938); Nature (London) 143, 77 (1939); J. exp. Medicine 72, 33 (1940).

[55] O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub u. L. Le Minor, Nature (London) 188, 556 (1960); A. M. Staub, S. Stirm, L. Le Minor, O. Lüderitz u. O. Westphal, Ann. Inst. Pasteur (Suppl. III) 47 (1966).

[56] K. Himmelpach, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 350, 5 (1969).

Kapselpolysaccharide von Pneumokokken führt – ebenfalls im Gegensatz zu der mit Protein-Antigenen – nur bei sehr niedriger Dosierung zur Bildung von Antikörpern, während bei Anwendung der sonst üblichen höheren Dosen zumindest im Serum der Tiere keine Antikörper nachweisbar sind.

Da aromatische Ringe unter Umständen allein schon genügen, um Immunogenität zu vermitteln, mußte eine Methode entwickelt werden, um Zucker ohne Verwendung aromatischer Zwischenglieder – im Gegensatz zu gebräuchlichen klassischen Verfahren [53, 55] – an synthetische Polypeptide zu binden.



Durch höhere Dosen Polysaccharid werden die Tiere im Gegenteil sehr leicht immunologisch „paralysiert“. Ähnlich wie im Zustand der experimentell erzeugten immunologischen Toleranz sind sie dann längere Zeit anscheinend nicht imstande, gegen das betreffende Polysaccharid Antikörper zu bilden. Nach neueren Untersuchungen ist der Zustand der immunologischen Paralyse mit dem der Toleranz jedoch nicht unbedingt identisch (s. Abschnitt 4.1.5) [57, 58].

Im Hinblick auf die Sonderstellung der Polysaccharide war es naheliegend, den Einfluß von Zuckern auf die Immunogenität synthetischer Polypeptide zu untersuchen. Ist es etwa möglich, verzweigtes Poly-D,L-alanin (5), das je nach den Immunisierungsbedingungen nicht oder nur schwach immunogen ist (s. Ab-

Die Kupplung der Zucker an Polypeptide gelang über O-Glykoside des Serins, die auch in vielen Glycoproteinen die Peptidkette mit dem Kohlehydratanteil verbinden. Von mehreren Mono- und Disacchariden wurde, wie am Beispiel von Glucose dargestellt, das O-acetylierte Seringlykosid (17) synthetisiert und mit Phosgen zum N-Carboxyaminosäureanhydrid (18) umgesetzt [59]. Mit diesen Anhydriden können Seringlykoside wie andere Aminosäuren an die Seitenketten von verzweigtem Poly-D,L-alanin (5) anpolymerisiert werden (durchschnittlich 1.5–2.5 Glykosylserin-Reste pro Seitenkette) [52].

Die resultierenden Zucker-Polypeptid-Konjugate [(19) in Abb. 4] wurden an Kaninchen getestet. Unter den angewandten Bedingungen erwies sich verzweig-

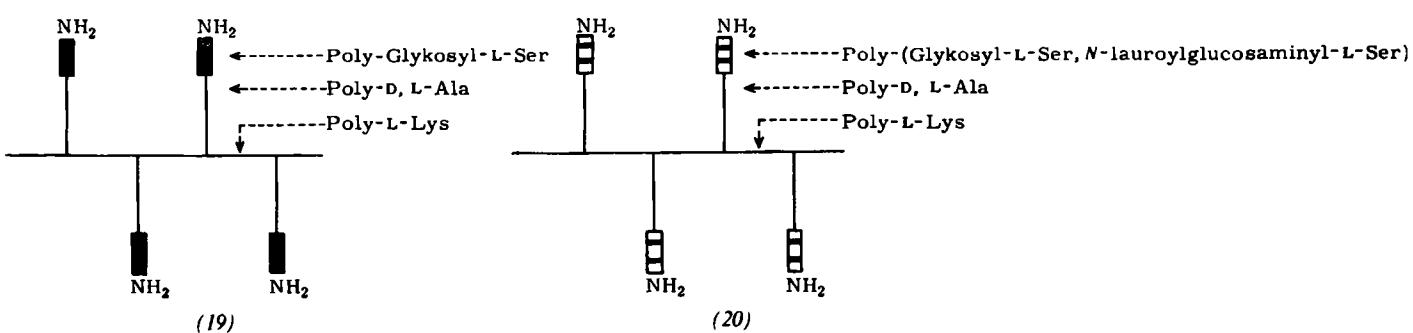


Abb. 4. Aufbau verzweigter Zucker-Polypeptid-Konjugate, schematisch. Glykosyl = β -D-Glucosyl, β -D-Galaktosyl, α -L-Rhamnosyl, β -D-N-Acetylglucosaminyl, β -D-Lactosyl oder β -D-Cellobiosyl.

schnitt 3.1), ähnlich wie durch Anpolymerisieren von Tyrosinpeptiden auch durch Zucker in ein wirksames Immunogen zu verwandeln?

[57] L. D. Felton, G. Kauffmann, B. Prescott u. B. Ottinger, J. Immunology 74, 17 (1955).

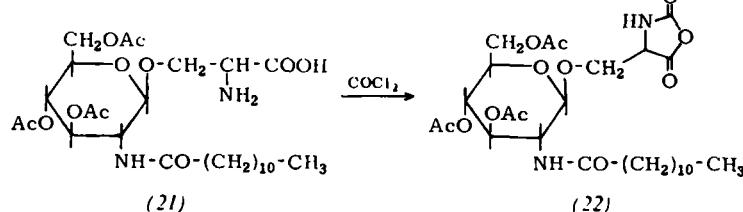
[58] J. G. Howard u. G. W. Siskind, Clinical exp. Immunology 4, 29 (1969), J. G. Howard, J. Elson, G. H. Christie u. R. G. Kinsky, Clinical exp. Immunology 4, 41 (1969).

tes Poly-D,L-alanin (5) selbst für etwa 50 % der Tiere als schwach immunogen. Demgegenüber ergab sich nach Injektion der Glucose, N-Acetylglucosamin oder Lactose enthaltenden Polymeren praktisch keine Antikörperbildung. Ungefähr gleiche oder leicht erhöhte Antikörpertiter wie mit dem Grundpolymeren (5)

[59] E. Rüde u. M. Meyer-Delius, Carbohydrate Res. 8, 219 (1968).

wurden nach Immunisierung mit den Galaktose, Rhamnose oder Cellobiose enthaltenden Polymeren erzielt [60]. In Übereinstimmung mit dem Verhalten von Polysacchariden scheinen die untersuchten Zucker demnach nicht – wie aromatische Aminosäuren oder auch Nucleoside [51] – imstande zu sein, die Immunogenität des Grundpolymeren wesentlich zu steigern.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob sich die Immunogenität von Zucker-Polypeptid-Konjugaten durch den zusätzlichen Einbau langkettiger Fettsäuren – gewissermaßen als interne Adjuvantien – steigern lässt. Fettsäuren in Form von Glykolipiden sind wichtige Bestandteile natürlicher Adjuvantien, z. B. bestimmter Wachsfraktionen aus Tuberkelbazillen [61] oder der Endotoxine gram-negativer Bakterien [62]. In Nachahmung solcher natürlicher Glykolipide wurde Laurinsäure, gebunden an die Aminogruppe von Glucosamin, mit synthetischen Antigenen verknüpft [1/20] in Abb. 4]. Dazu wurde *O*-peracetyliertes *N*-Lauroyl-glucosaminyl-serin (21) synthetisiert



und über sein *N*-Carboxy-aminosäureanhydrid (22) zusammen mit jeweils einem der oben erwähnten Seringlykoside in Form kurzer Copolymerer an die Seitenketten von verzweigtem Poly-D,L-alanin anpolymerisiert (z. B. 0.6 *N*-Lauroyl-glucosaminyl-serin- und 2.0 Glucosylserin-Reste pro Seitenkette).

Die fettsäurehaltigen Polymeren (20) waren in den meisten Fällen wirksamere Immunogene als die Polymeren (19), die nur einfache Seringlykoside enthielten [60]. Wahrscheinlich beruht die gesteigerte Immunogenität dieser Polymeren (20) auf ihrer starken Aggregation; sie sind bei einem Gehalt von etwa 0.7 *N*-Lauroyl-glucosaminyl-Resten pro Seitenkette in Wasser nicht mehr löslich, sondern nur noch quellbar. (Bedeutung des Aggregationszustandes für die Immunogenität einer Substanz s. Abschnitt 4.1.4.) Die Spezifität der gebildeten Antikörper wird, wie durch Hemmungsexperimente gezeigt werden konnte, sowohl durch die jeweiligen Glycosylserin-Reste als auch durch *N*-Lauroyl-glucosaminylserin bestimmt. Im letztgenannten Fall scheint – ähnlich wie bei Cytolipin-H-Polypeptid-Konjugaten [52a] – der Fettsäure-Rest für die Spezifität der determinanten Gruppe eine wichtige Rolle zu spielen.

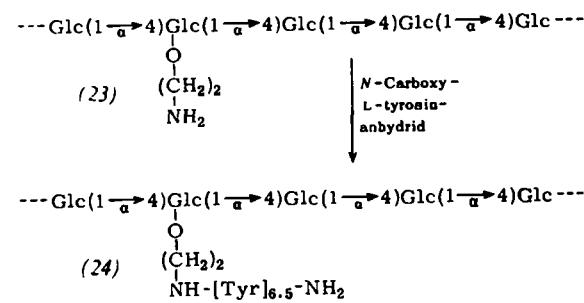
Für weitere Untersuchungen wurden Modellantigene synthetisiert, die anstelle linearer Poly- α -aminosäuren Polysaccharide als „Rückgrat“ enthielten. Insbesondere sollten einfache Peptidseitenketten in Polysaccharide eingeführt werden, um zu prüfen, unter welchen

[60] E. Rüde u. M. Meyer-Delius, noch nicht veröffentlicht.

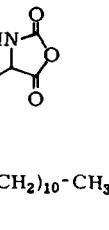
[61] H. Finger, Klin. Wschr. 44, 1105 (1966).

[62] O. Lüderitz, K. Jann u. R. Wheat in: Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1968, Bd. 26A, S. 105.

Minimalbedingungen ein nicht immunogenes Polysaccharid immunogen wird. Dazu wurden Dextran und Amylose, die beide für das Kaninchen nicht immunogen sind, mit Äthylenimin aminoäthyliert (jeder 7. bis 40. Glucose-Rest wird substituiert) [s. (23)].



Wie beim Aufbau verzweigter Polypeptide wurden an die primären Aminogruppen mit *N*-Carboxy-L-tyrosin-anhydrid Seitenketten aus jeweils 6–7 Tyrosin-Resten zu (24) anpolymerisiert [63].



Nach Behandlung von Kaninchen sowohl mit niedrig als auch mit höher substituierten Poly-L-tyrosyl-polysacchariden (24) konnten im Serum spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Schon relativ wenige Tyrosinseitenketten genügen demnach, um Immunogenität zu vermitteln. Unter Umständen spielen dabei Aggregation und Schwerlöslichkeit dieser tyrosinhaltigen Polymeren eine Rolle. Die gebildeten Antikörper richten sich beim Dextran-Derivat *sowohl gegen die Tyrosinseitenketten als auch gegen Dextran selbst*, beim Amylose-Derivat *nur gegen die Tyrosinseitenketten*. Möglicherweise hängt dies mit einer natürlichen Toleranz der Tiere gegen Glykogen zusammen, das in seiner Grundstruktur, den $(1\rightarrow 4)$ - α -gebundenen Glucose-Resten, mit Amylose übereinstimmt. Schließlich wurde auch nach Behandlung von Kaninchen mit Polymeren, deren Tyrosinseitenketten an ein Rückgrat aus Polyvinylalkohol gebunden waren, eine geringfügige Bildung von Antikörpern nachgewiesen, die allerdings nur gegen die Tyrosinseitenketten gerichtet waren [64]. Reine Vinylpolymere sind nach Gill und Kunz [86] ebenfalls immunogen, wenn sie in Dosen von 1 bis höchstens 100 μg injiziert werden (s. Abschnitt 4.1.5).

4.1.4. Molekulargewicht und Aggregationszustand

Seit langem gilt ein hohes Molekulargewicht als Voraussetzung dafür, daß eine Substanz überhaupt immunogen sein kann. Über das notwendige Mindest-

[63] C. Sorg, Diplomarbeit, Universität Freiburg 1967.

[64] C. Sorg, Dissertation, Universität Freiburg 1969.

molekulargewicht lassen sich keine generellen Angaben machen; es kann offenbar von Substanz zu Substanz sehr verschieden sein. Bei Dextran fanden *Kabat* und *Bezer* einen scharfen Abfall der Immunogenität (beim Menschen) bei einer Verminderung des durchschnittlichen Molekulargewichts von 90000 auf 50000^[65]. Bei der Untersuchung synthetischer Polypeptide dagegen ergab sich, daß das Molekulargewicht für die Immunogenität oft eine erstaunlich geringe Rolle spielt. Lineare Copolymeren aus Alanin, Tyrosin und Glutaminsäure vom durchschnittlichen Molekulargewicht 4000 sind z. B. ähnlich wirksam wie höhermolekulare Polymere^[17,66]. Von den Oligotyrosinpeptiden erwiesen sich das Hexa- und Tripeptid, ja sogar einfaches *N*-Acetyltyrosin nach Kupplung mit dem Arsanilsäure-Rest als immunogen^[67].

Bei Oligolysinen, die an der terminalen α -Aminogruppe einen 2,4-Dinitrophenylrest tragen, konnte eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Immunogenität von der Zahl der Lysinreste nachgewiesen werden^[68,69]: Alle substituierten Oligomeren bis zum Hexapeptid sind nicht immunogen, während α -Dinitrophenyl-heptalysin und alle höheren Homologen beim Meerschweinchen sowohl die Bildung von Antikörpern als auch den verzögerten Typ der Allergie auslösen können.

Überraschend ist ferner, daß die Immunogenität von α -Dinitrophenyl-nonalysin verlorengeht, wenn ein L-Lysin-Rest in der Mitte der Peptidkette durch einen D-Lysin-Rest ersetzt wird^[70]. Besonders eindeutig konnte bei diesen Versuchen auch gezeigt werden, daß die Hautreaktion vom Typ der verzögerten Allergie als zelluläre Immunreaktion bei sensibilisierten Tieren nur durch solche Substanzen ausgelöst werden kann, die für sich selbst immunogen sind, nicht aber durch Haptene^[69].

Man kann bei Versuchen mit niedermolekularen Substanzen natürlich nie mit Sicherheit ausschließen, daß die Immunogenität dieser Verbindungen nur durch Bindung an körpereigene Proteine oder Zellen zustandekommt, vor allem, da man aus der Komplexbildung von Polyglutaminsäure weiß, daß die Bindung von Hapteten und Träger nicht kovalent zu sein braucht. Doch wenn auch eine solche Komplexbildung stattfindet, genügt sie nicht, um beispielsweise die sehr scharfe Abhängigkeit der Immunogenität von der Kettenlänge im Falle der Oligolysinpeptide zu erklären.

Wie schon am Beispiel synthetischer, fettsäurehaltiger Zucker-Polypeptid-Konjugate diskutiert wurde, kann

[65] E. A. Kabat u. A. E. Bezer, Arch. Biochem. Biophysics 78, 306 (1958).

[66] P. H. Maurer, J. Immunology 90, 493 (1963).

[67] F. Borek, Y. Stupp u. M. Sela, Science (Washington) 150, 1177 (1965); J. Immunology 98, 739 (1967); S. Leskowitz, V. E. Jones u. S. J. Zak, J. exp. Medicine 123, 229 (1966).

[68] S. F. Schlossmann, A. Yaron, S. Ben Efraim u. H. A. Sober, Biochemistry 4, 1638 (1965).

[69] S. F. Schlossman, S. Ben Efraim, A. Yaron u. H. A. Sober, J. exp. Medicine 123, 1083 (1966); J. R. David u. S. F. Schlossman, J. exp. Medicine 128, 1451 (1968).

[70] A. Yaron u. S. F. Schlossman, Biochemistry 7, 2673 (1968).

[71] D. W. Dresser, Nature (London) 191, 1169 (1961); Immunology 5, 378 (1962).

auch die Zusammenlagerung von Molekülen zu großen Aggregaten einen beträchtlichen Einfluß auf die Immunogenität haben. Dies konnte besonders deutlich in Versuchen über die Immunogenität von Immunglobulin G (IgG) demonstriert werden^[71]. Normale Präparationen von Rinder-IgG enthalten meist neben monomolekular gelösten Anteilen geringe Mengen aggregiertes Material und führen – ohne Adjuvans injiziert – als artfremdes Eiweiß bei Mäusen zur Bildung von Antikörpern. Nach Abtrennung der aggregierten Anteile durch Zentrifugieren sind die aggregatfreien Überstände nicht mehr immunogen, sondern führen im Gegenteil nach Injektion zu partieller Toleranz gegen Rinder-IgG.

Diese und andere Versuche bestätigen die schon lange bekannte Erfahrungsregel, daß Partikeln wie Viren, Flagellen und Bakterien usw. viel wirksamere Immunogene sind als etwa monomolekular gelöste Proteine^[72,73]. Da Partikeln durch phagocytierende Zellen (Makrophagen) leichter aufgenommen werden als gelöste Substanzen, wertet man diese Befunde oft als Argument für die Beteiligung von Makrophagen bei der immunologischen Stimulierung^[74].

4.1.5. Optische Konfiguration der Aminosäuren

Wie zuerst *Landsteiner* und *van der Scheer* am Beispiel von Weinsäure nachweisen konnten, vermögen Antikörper zwischen enantiomeren Hapteten sehr scharf zu unterscheiden^[75]. Antiseren beispielsweise, die gegen ein aus L-Aminosäuren bestehendes Peptid gerichtet sind, zeigen keine Kreuzreaktion mit dem Peptid aus D-Aminosäuren und umgekehrt.

In der gegenwärtigen Betrachtung interessiert aber nicht so sehr die serologische Spezifität eines aus L- oder D-Aminosäuren aufgebauten Polypeptids als vielmehr seine Immunogenität, und in diesem Zusammenhang sind die folgenden Ergebnisse von Bedeutung.

Wie oben beschrieben, gelingt es, die Immunogenität von Gelatine oder von verzweigtem Poly-D,L-alanin (5) durch Anpolymerisieren kurzer Peptidketten aus L-Tyrosin beträchtlich zu steigern. Die gleiche Wirkung zeigen auch die entsprechenden Peptide aus D-Tyrosin, wenn sie an diese schwach immunogenen Träger anpolymerisiert werden, die allerdings selbst überwiegend aus L-Aminosäuren bestehen^[76].

[72] F. A. Anderer u. H. D. Schlumberger, Immunochemistry 6, 1 (1969); R. N. Pinckard, D. M. Weir u. W. H. McBride, Clinical exp. Immunology 2, 331 (1967); R. Gallily u. J. S. Garvey, J. Immunology 101, 924 (1968).

[73] G. L. Ada, C. R. Parish, G. J. V. Nossal u. A. Abbot, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 32, 382 (1967); G. L. Ada, G. J. V. Nossal, J. Pye u. A. Abbot, Nature (London) 199, 1257 (1963); C. R. Parish, P. G. Lang u. G. L. Ada, ibid. 215, 1202 (1967); G. L. Ada u. C. R. Parish, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 559 (1968).

[74] Siehe z. B. E. R. Unanue u. B. A. Askonas, Immunology 15, 287 (1968); E. Kölisch u. N. A. Mitchison, J. exp. Medicine 128, 1059 (1968); D. Rowley, Experientia 22, 1 (1966).

[75] K. Landsteiner u. J. van der Scheer, J. exp. Medicine 50, 407 (1929).

[76] M. Sela u. S. Fuchs: Proc. Sympos. on Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation, Prague. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences 1965, S. 43.

Demgegenüber stellten mehrere Autoren zunächst fest, daß *vollständig* aus *D*-Aminosäuren aufgebaute Polypeptide unter den üblichen Immunisierungsbedingungen (etwa 1–10 mg Polypeptid pro Injektion beim Kaninchen) nicht immunogen waren [76–78]. Der Einbau von 3% *L*-Aminosäuren in reine *D*-Polymere genügte allerdings, um diese in schwache Immunogene zu verwandeln, während ein höherer Gehalt an *L*-Aminosäuren die Immunogenität weiter steigerte [79]. *Gill* und Mitarbeitern [80] gelang dann der – inzwischen bestätigte [79, 81] – Nachweis, daß auch *vollständig* aus *D*-Aminosäuren bestehende Polymere immunogen sind, wenn sie in sehr kleiner Menge injiziert werden. Untersuchungen mit analog zusammengesetzten *L*- und *D*-Polymeren an Mäusen ergaben die in Abbildung 5 dargestellte Abhängigkeit der Antikörpertiter von der Immunisierungsdosis [82].

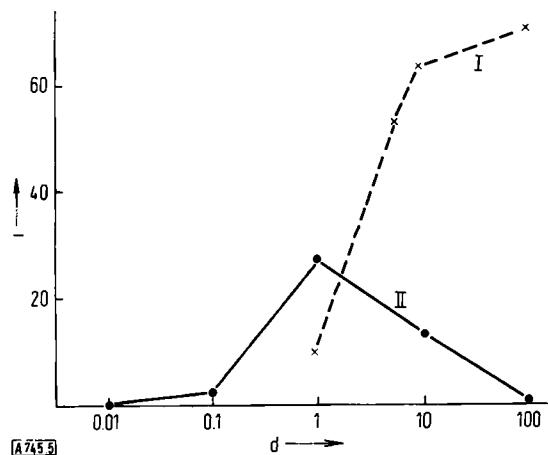


Abb. 5. Immunogenität analog zusammengesetzter Copolymeren aus *L*- und *D*-Aminosäuren in Abhängigkeit von der Immunisierungsdosis, nach *Janeway* und *Sela* [82]. I: *L*-Polymeres; II: *D*-Polymeres; d: Immunisierungsdosis in μg Polymeres pro Maus; i: Antikörpertiter in % antikörpergebundenes, radioaktiv markiertes Antigen aus $5\mu\text{g}$ pro ml Serum.

Während beim *L*-Polymeren die Antikörpertiter mit steigender Dosierung zunehmen und bei etwa $10\mu\text{g}$ pro Maus ein Plateau erreichen, zeigen die nach Immunisieren mit dem *D*-Polymeren erzielten Antikörpertiter schon bei etwa $1\mu\text{g}$ pro Maus ein Maximum und sinken bei höherer Dosierung rasch wieder ab. Ohne Adjuvans injiziert, führt das *D*-Polymer – ebenfalls im Gegensatz zum *L*-Polymeren – schon in sehr niedrigen Dosen zu immunologischer Paralyse oder Toleranz. Ähnliche Versuche am Kaninchen ergaben darüberhinaus, daß Polymere aus *D*-Aminosäuren bei einer Zweitinjektion keine nennenswerte „booster“-Reaktion [81] hervorrufen [81]. Polymere aus *D*-Aminosäuren verhalten sich damit fast in jeder Be-

[77] *T. J. Gill III, H. J. Gould u. P. Doty, Nature (London)* 197, 746 (1963); *P. H. Maurer, Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 113, 553 (1963).

[78] *F. Borek, Y. Stupp, S. Fuchs u. M. Sela, Biochem. J.* 96, 577 (1965).

[79] *Y. Stupp u. M. Sela, Biochim. biophysica Acta* 140, 349 (1967).

[80] *T. J. Gill III, H. W. Kunz, H. J. Gould u. P. Doty, J. biol. Chemistry* 239, 1107 (1964).

[81] *T. J. Gill III, H. W. Kunz u. D. S. Papermaster, J. biol. Chemistry* 242, 3308 (1967).

[82] *C. A. Janeway jr. u. M. Sela, Immunology* 13, 29 (1967).

ziehung wie bestimmte Polysaccharide (s. Abschnitt 4.1.3). Es ist naheliegend, dies mit dem erwiesenermaßen *sehr langsam enzymatischen Abbau* dieser Polysaccharide und Polymerer aus *D*-Aminosäuren in Beziehung zu bringen [83–85].

Verzweigte Polymere aus einem linearen Poly-*L*-lysin-Rückgrat, längeren Seitenketten aus *L*-Prolin und daran angehängten kurzen Copolymeren aus *D*-Tyrosin und *D*-Glutaminsäure [vgl. (7)] wirken trotz des hohen Gehaltes an *L*-Aminosäuren (etwa 90%) wie Polymere, die *vollständig* aus *D*-Aminosäuren bestehen. Da bisher noch keine Endopeptidasen nachgewiesen werden konnten, die imstande sind, die Peptidbindung zwischen *L*-Prolin-Resten zu spalten, wird dieser Befund verständlich, denn derartige Polymere verhalten sich hinsichtlich ihres enzymatischen Abbaus wie *D*-Polymere [18].

Selbst reine Vinylpolymere wie Polyvinylamin, Polymethacrylsäure und Polyvinylpyrrolidon, die sicher kaum enzymatisch abgebaut werden können, sind für Kaninchen schwach immunogen, wenn sie ähnlich wie Polymere aus *D*-Aminosäuren in sehr kleinen Mengen injiziert werden [86].

Die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus ist demnach für das immunologische Verhalten einer Substanz von großer Bedeutung. Nicht oder schwer abbaubare Antigene, die vom Organismus nur sehr langsam wieder ausgeschieden werden, führen – besonders nach Injektion höherer Dosen – leicht zu immunologischer Paralyse. Paralysierte Tiere scheinen ähnlich wie tolerante Tiere (s. Abschnitt 1) – auch nach weiteren Antigeninjektionen mit Adjuvans – nicht imstande zu sein, zirkulierende Antikörper gegen das betreffende Antigen zu produzieren. Neu zugeführtes Antigen verlängert eher den Zustand der Paralyse.

Neuere Versuche mit Polysaccharid-Antigenen ergaben – im Gegensatz zu früheren Befunden – daß paralysierte Mäuse über eine etwa gleich große Zahl antikörperbildender Zellen verfügen wie immunisierte Tiere, obwohl im Serum der paralysierten Mäuse keine Antikörper nachweisbar sind [88]. Die Antikörperbildung als solche scheint demnach nicht blockiert zu sein. Man vermutet deshalb, daß die synthetisierten Antikörper sofort vom Antigen abgefangen und dann enzymatisch abgebaut werden, während das Antigen unverändert in den Kreislauf zurückkehrt. Ob diese Deutung des Phänomens der immunologischen Paralyse generell auch für andere Antigene wie Polymere aus *D*-Aminosäuren zutrifft, oder ob doch die echte Blockierung der Antikörperbildung und damit eher ein Zustand der Toleranz überwiegt, muß vorerst noch offen bleiben.

[*] Unter booster-Reaktion versteht man die gegenüber der Erstinjektion eines Antigens gesteigerte Antikörperproduktion nach einer Zweitinjektion (auch Sekundärantwort).

[83] *T. J. Gill III, D. S. Papermaster u. J. F. Mowbray, J. Immunology* 95, 794 (1965); *C. B. Carpenter, T. J. Gill III u. L. T. Mann jr., J. Immunology* 98, 236 (1967); *G. Zubay, Nature (London)* 200, 483 (1964).

[84] *C. A. Janeway jr. u. J. H. Humphrey, Immunology* 14, 225 (1968).

[85] Siehe z. B. *F. J. Dixon, P. H. Maurer u. W. O. Weigle, J. Immunology* 74, 188 (1955); *D. Gitlin, F. Monckelberg u. C. A. Janeway, J. Immunology* 86, 627 (1961); *G. W. Siskind u. P. Y. Paterson, J. Immunology* 93, 489 (1964); *G. W. Siskind u. J. G. Howard, J. exp. Medicine* 124, 417 (1966).

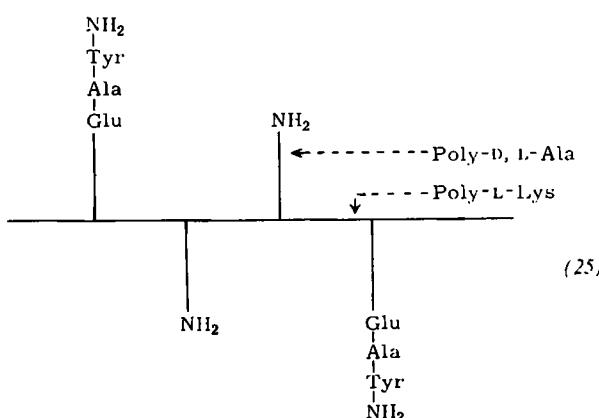
[86] *T. J. Gill III u. H. W. Kunz, Proc. nat. Acad. Sci. USA* 61, 490 (1968).

4.1.6. Sekundärstruktur und serologische Spezifität

Neben Modellantigenen, die durch Polymerisation oder Copolymerisation verschiedener Aminosäuren hergestellt werden, verwendet man in neuerer Zeit zunehmend Polypeptid-Antigene von definierter Aminosäuresequenz, die vor allem hinsichtlich der Spezifität der gebildeten Antikörper eine genauere Interpretation der immunologischen Ergebnisse zulassen.

Die Struktur der determinanten Gruppen nativer Proteine wird, wie schon eingangs erwähnt, in vielen Fällen nicht direkt durch die lineare Sequenz der Aminosäuren, sondern durch die räumliche Faltung der Peptidketten bestimmt. Mit einem definierten synthetischen Antigen (13) aus sich wiederholenden Tripeptideinheiten (Tyr-Ala-Glu)_n (s. Abschnitt 2.4) konnten Sela und Mitarbeiter besonders deutlich den Einfluß der Sekundärstruktur auf die serologische Spezifität einer Polypeptidkette demonstrieren [28]. Das lineare Polymere (13) liegt unter physiologischen Bedingungen als α -Helix vor und ist für Kaninchen immunogen. Die Präzipitation der gebildeten Antikörper mit dem helicalen Polymeren wird durch das Tripeptid Tyr-Ala-Glu oder das Hexapeptid (Tyr-Ala-Glu)₂ nicht gehemmt. Ferner zeigen diese Antiseren keine Kreuzreaktion mit einem verzweigten Polymeren, welches an den Enden der Seitenketten dieselbe Sequenz Tyr-Ala-Glu enthält (25).

Umgekehrt reagieren Antikörper, die man durch Immunisierung mit diesem verzweigten Polymeren erhalten hatte, praktisch nicht mit dem linearen helicalen Polymeren (13). Die Spezifität der Antikörper



wird also im ersten Fall ausschließlich von der Konformation der Peptidkette (α -Helix) bestimmt (konformativ Determinante) und nicht einfach durch die lineare Sequenz der Aminosäuren (Sequenzdeterminante) wie beim verzweigten Polymeren.

Ein als Modell für Collagen synthetisiertes Polymeres der sich wiederholenden Sequenz (Pro-Gly-Pro)_n liegt wie Kollagen in Lösung wahrscheinlich als dreisträngige Helix vor [28]. Auf dieser Ähnlichkeit der Sekundärstruktur beruht vermutlich der positive Ausfall der Kreuzreaktion der gegen dieses Polymere gebildeten Antikörper mit Kollagen verschiedener Herkunft.

Aus diesen Befunden ergibt sich zwangsläufig, daß die oft diskutierte „Verarbeitung“ (processing) eines

Antigens [87, 90] bei der Induktion der Antikörperbildung nicht in einem weitgehenden enzymatischen Abbau zu kleinen Bruchstücken – jedenfalls nicht vor Erkennung der Spezifität der jeweiligen determinanten Gruppen – bestehen kann. Bei einem solchen Abbau gehen Tertiär- und Sekundärstruktur von Proteinen oder Polypeptiden verloren, gegen die aber gerade in vielen Fällen die Antikörper gerichtet sind [10]. Auch die unter geeigneten Bedingungen nachweisbare Immunogenität von Vinylpolymeren läßt darauf schließen, daß für die spezifische Stimulierung der Antikörperbildung an sich kein Abbau des Antigens notwendig ist. Wohl aber scheint nach den (s. Abschnitt 4.1.5) geschilderten Ergebnissen der enzymatische Abbau sehr wichtig zu sein, um längere Zeit im Organismus zirkulierendes Antigen zu entfernen, da dieses sonst zu immunologischer Paralyse oder Toleranz führen kann.

4.2. Genetische Aspekte

Individuen der gleichen Spezies zeigen oft beträchtliche Unterschiede in der Fähigkeit, gegen bestimmte Substanzen Antikörper zu bilden. Untersuchungen mit Protein-Antigenen ergaben, daß diese Eigenschaft auf die Nachkommen vererbt werden kann [88]. Die Zusammenhänge konnten zunächst nicht genauer analysiert werden, da die verwendeten Proteine eine größere Zahl meist unbekannter determinanter Gruppen enthalten und vermutlich mehrere Gene die Antikörperbildung gegen derart komplexe Moleküle steuern. Eine wesentliche Vereinfachung ergab sich jedoch durch die Verwendung synthetischer Antigene, die sich für derartige Untersuchungen als besonders nützlich erwiesen.

Die Arbeiten über die genetische Kontrolle der Antikörperbildung gegen synthetische Antigene gingen von der Beobachtung aus, daß nur etwa 40 % der Meerschweinchen des Hartley-Stammes gegen ein lineares Copolymeres aus L-Lysin und L-Glutaminsäure [66] und auch gegen Derivate von Poly-L-lysin wie 2,4-Dinitrophenyl-, p-Toluolsulfonyl- und Benzylpenicillloyl-polylysin Antikörper bildeten [45, 89]. Es ließ sich dann zeigen, daß für einzelne Tiere entweder alle oder keines dieser Hapten-Polylysin-Konjugate immunogen sind und daß die Fähigkeit, diese Gruppe von Makromolekülen als immunogen zu erkennen, durch ein dominantes, autosomales Gen bestimmt wird [46].

Das Ausbleiben der Immunantwort bei der Gruppe von Tieren, die dieses „Polylysin-Gen“ nicht besitzen, ist aber nicht darauf zurückzuführen, daß diese Tiere keine Antikörper entsprechender Spezifität synthetisieren könnten. Die Bildung von Antikörpern ist ohne weiteres möglich, wenn diese Haptene statt an Polylysin an einen anderen Träger gebunden werden, oder wenn beispielsweise Dinitrophenyl-polylysin in Form

[87] B. Benacerraf, A. Ojeda u. P. H. Maurer, J. exp. Medicine 118, 945 (1963).

[88] E. Carlini, J. Immunology 59, 1 (1948); J. H. Sang u. W. R. Sobey, J. Immunology 72, 52 (1954).

[89] B. B. Levine, A. Ojeda u. B. Benacerraf, Nature (London) 200, 544 (1963).

eines schwerlöslichen Komplexes mit Eialbumin injiziert wird^[38]. Dabei wirkt Eialbumin als „Schlepper“ oder Träger für das makromolekulare Hapten (s. Abschnitt 4.1.1), und die Tiere bilden Antikörper von gleicher Spezifität wie Tiere, für die Dinitrophenyl-polylysin selbst immunogen ist. Damit kann sicher ausgeschlossen werden, daß die Funktion des „Polylysin-Gens“ direkt in der Bildung des spezifischen Bindungsbezirkes der Antikörpermoleküle besteht. Auch in der Fähigkeit, Polylysin-Derivate enzymatisch abzubauen, scheinen sich beide Gruppen von Tieren nicht wesentlich zu unterscheiden^[90].

Die nicht durch zirkulierende Antikörper, sondern durch Zellen vermittelte Allergiereaktion vom verzögerten Typ kann nach vorhergegangener Immunisierung ebenfalls nur bei solchen Tieren durch intradermale Injektion von Dinitrophenyl-polylysin ausgelöst werden, für die Dinitrophenyl-polylysin immunogen ist. Sie bleibt aus bei den Tieren, die das „Polylysin-Gen“ nicht besitzen und bei denen Dinitrophenyl-polylysin nur als Hapten fungiert^[38]. Auch nach passiver Übertragung von Zellen immunisierter, positiv reagierender Tiere auf polylysin-negative Tiere ist die Auslösung dieser Allergiereaktion durch Dinitrophenyl-polylysin nicht möglich. Wohl aber gelingt die passive Sensibilisierung durch übertragene Zellen bei anderen Antigenen. Die Anwesenheit sensibilisierter Zellen allein genügt demnach nicht, um in einem polylysin-negativen Empfängertier die Allergiereaktion auszulösen. Vielmehr scheint beim Empfängertier zusätzlich ein noch unbekannter Prozeß notwendig zu sein, der durch das „Polylysin-Gen“ gesteuert wird^[91, 91a].

Genetische Unterschiede wurden auch bei der Immunisierung von Mäusen verschiedener Inzuchttämme mit linearen und verzweigten Polypeptiden beobachtet^[92, 93]. Im letzteren Falle bestehen Unterschiede hinsichtlich der Menge der gebildeten Antikörper (Tabelle 1)^[94]. Die verwendeten Antigene wurden jeweils aus verzweigtem Poly-D,L-alanin (5) synthetisiert, dessen Seitenketten entweder mit kurzen Polymeren aus L-Glutaminsäure oder mit kurzen Copolymeren aus L-Phenylalanin und L-Glutaminsäure, aus L-Tyrosin und L-Glutaminsäure [vgl. (7)] oder aus L-Histidin und L-Glutaminsäure verlängert wurden.

Die ersten beiden Polymeren verhielten sich bei den Mäusestämmen CBA und C 57 gleich: Das erste war jeweils nicht, das zweite stark immunogen. Sehr unter-

schiedlich aber waren die Antikörpertiter, die nach Immunisierung beider Stämme mit dem Tyrosin enthaltenden Polymeren (7) beobachtet wurden. Sie erreichten bei Mäusen des Stammes CBA nur etwa 10% der Werte, die bei Tieren des Stammes C 57 gefunden wurden. Umgekehrt waren die Resultate nach Injektion des Histidin enthaltenden Polymeren: Jetzt waren es die C 57-Mäuse, die nur sehr wenig Antikörper produzierten.

Tabelle 1. Immunogenität verzweigter Poly- α -aminoäuren für zwei Inzucht-Mäusestämme, nach McDevitt und Sela [94].

Synthetisches Polypeptid	Immunogenität [a] für Mäuse vom Stamm	
	CBA	C 57
Poly-L-Glu-(5)	—	—
Poly-(L-Phe, L-Glu)-(5)	++	++
Poly-(L-Tyr, L-Glu)-(5) \equiv (7)	+	++
Poly-(L-His, L-Glu)-(5)	++	+

[a] — Nicht immunogen; + schwach immunogen; ++ stark immunogen.

Aus Kreuzungsexperimenten ergab sich, daß wahrscheinlich mehrere Gene für dieses Verhalten verantwortlich sind. Bemerkenswerterweise wird die Bildung von Antikörpern gegen verschiedene determinante Gruppen, die an den gleichen Träger (5) gebunden sind, durch verschiedene Gene gesteuert. Dabei spricht der genetische Apparat ähnlich scharf wie die Antikörper auf die Aminosäurezusammensetzung der Polymeren an. Neuerdings wurden die Immunisierungsversuche mit ähnlichen Resultaten auf andere Mäusestämme ausgedehnt^[95]. Dabei wurde festgestellt, daß die Befähigung zur Antikörperbildung gegen die verzweigten Polypeptide mit der Bildung der Histo-compatibilitäts-Antigene des H2-Locus genetisch gekoppelt ist.

In den letzten Jahren wurde auch der Einfluß genetischer Faktoren auf die Immunogenität natürlicher Antigene wie Insulin^[96], Rinderserumalbumin^[97] und Lactat-Dehydrogenase genauer untersucht. Lactat-Dehydrogenase verhielt sich dabei ähnlich wie die Komplexe von Dinitrophenyl-polylysin mit Eialbumin^[98]. Das Enzym kommt in Varianten (Isozytmen) vor, die jeweils aus Viererkombinationen der Untereinheiten A oder B aufgebaut sind (A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, B₄). Die Untereinheit B entspricht in ihrer Wirkung dem Dinitrophenyl-polylysin in den oben erwähnten Versuchen mit Meerschweinchen; sie ist selbst (als Isozym B₄) nur für einen Teil der Tiere (Kaninchen) immunogen, für andere Tiere dagegen nicht. Bei den letzteren verhält sich B wie ein Hapten; in Kombination mit A als Träger (Isozym A₂B₂) bilden auch diese Tiere B-spezifische Antikörper.

[95] H. O. McDevitt u. M. L. Tyan, *J. exp. Medicine* 128, 1 (1968); H. O. McDevitt u. A. Chinitz, *Science (Washington)* 163, 1207 (1969).

[96] E. R. Arquila u. J. Finn, *J. exp. Medicine* 122, 771 (1965).

[97] W. R. Sobey, J. M. McGrath u. A. H. Reisner, *Immunology* 11, 511 (1966); D. Hardy u. D. Rowley, *Immunology* 14, 401 (1968).

[98] K. Rajewsky, E. Rottländer, G. Peltre u. B. Müller, *J. exp. Medicine* 126, 581 (1967); K. Rajewsky u. E. Rottländer, *Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol.* 32, 547 (1967).

Über den Mechanismus der genetischen Kontrolle der Antikörperbildung ist nichts Näheres bekannt. Experimentelle Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, daß die Erkennung des Antigens wesentlich ist; die nötige Information zur Synthese der entsprechenden Antikörper scheint latent vorhanden zu sein.

5. Schluß

Die Art der Immunantwort, die durch einen antigenen Reiz im höheren Organismus ausgelöst wird, hängt zunächst von biologischen Faktoren ab, von denen hier nur die genetische Konstitution erwähnt wurde. Daneben spielen aber auch die chemische und physikalische Natur des Antigens, seine Dosierung und die Art der Verabreichung eine wichtige Rolle. Diese Faktoren, deren Zusammenwirken noch nicht klar durchschaubar ist, führen entweder zur bevorzugten Bildung zirkulierender Antikörper und zur Stimulierung der zellulären Immunität oder aber zu spezifischer Toleranz. An ausgewählten Beispielen wurde in diesem Aufsatz gezeigt, daß neben der Erforschung der biologischen Grundlagen auch das Studium der Antigene selbst – besonders mit Hilfe synthetischer Antigene – zu einem besseren Verständnis dieser Vorgänge beitragen kann. Dabei wurde hauptsächlich der Aspekt der Antikörperbildung berücksichtigt. Auf die Verwendung synthetischer Polypeptid-Antigene und Polypeptid-Derivate von Proteinen zum Studium der immunologischen Toleranz^[99], der Konkurrenz deter-

[99] I. Schechter, S. Bauminger, M. Sela, D. Nachrigal u. M. Feldman, *Immunochemistry* 1, 249 (1964); S. Bauminger, I. Schechter u. M. Sela, *Immunochemistry* 4, 169 (1967); S. Bauminger u. M. Sela, *Israel J. Med. Sci.* 5, 183 (1969); G. A. Theis, I. Green, B. Benacerraf u. G. W. Siskind, *J. Immunology* 102, 513 (1969).

minanter Gruppen^[26] und der Lokalisation radioaktiv markierter Antigene im lymphatischen Gewebe^[84, 100] sei noch ergänzend hingewiesen.

Die weite Anwendung *synthetischer Antigene* bei der Bearbeitung immunologischer Probleme beruht in erster Linie auf ihrer Eignung als Modellsubstanzen. Letztlich gilt das Interesse jedoch der Funktion *natürlicher Antigene*. Nur in Ausnahmefällen wurde bisher eine serologische Verwandtschaft synthetischer Polypeptid-Antigene mit natürlichen Antigenen nachgewiesen (s. Abschnitt 4.1.6). Mit genauerer Kenntnis der Struktur natürlicher Antigene wird es jedoch in zunehmendem Maße möglich werden, Antigene synthetisch so aufzubauen, daß sie bestimmte Determinanten mit den Naturprodukten gemeinsam haben. Während dieses Ziel bei Polysacchariden schon 1939 durch *Goebel*^[54] erreicht wurde, führten entsprechende Versuche bei Protein-Antigenen erst neuerdings zum Erfolg. So gelang die Herstellung von Antigenen, welche die serologisch wichtige C-terminale Hexapeptidsequenz des Hüllproteins von Tabakmosaikvirus^[101] und eine größere Peptidschleife von Lysozym enthalten^[102]. Derartige Antigene erlauben es, gezielte Immunisierungen gegen bestimmte Teilstrukturen natürlicher Antigene durchzuführen, was für die Zukunft auf nützliche Anwendungen in der Praxis hoffen läßt.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Herrn Prof. Dr. O. Westphal und Herrn Dipl.-Chem. D. Haustein.

Eingegangen am 9. Juni 1969 [A 745]

[100] J. H. Humphrey, B. A. Askonas, I. Auzins, I. Schechter u. M. Sela, *Immunology* 13, 71 (1967).

[101] F. A. Anderer u. H. D. Schlumberger, *Biochim. biophysica Acta* 97, 503 (1965).

[102] R. Arnon u. M. Sela, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 62, 163 (1969).

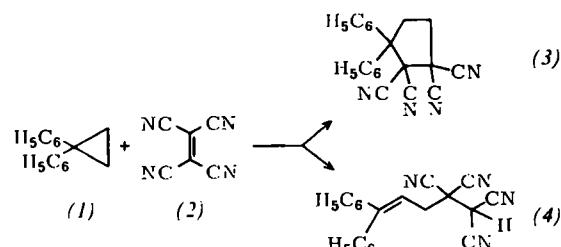
ZUSCHRIFTEN

Umsetzung von 1,1-Diphenylcyclopropan mit Tetracyanäthylen^[**]

Von Th. Martini und J. A. Kampmeier^[*]

Thermische Reaktionen zwischen elektronenarmen π -Systemen und C–C- σ -Bindungen waren bisher nur bei hochgespannten Cyclopropanverbindungen^[1] wie Bicyclo[2.1.0]pentanen, Bicyclo[1.1.0]butanen und Quadricyclen bekannt^[2, 3]. Außerdem bilden Dispiro[2.4.2.0]decan und Tetracyanäthylen ein 1 : 1-Cycloaddukt^[4]. Uns gelang die Umsetzung von 1,1-Diphenylcyclopropan (1) [5] mit Tetracyanäthylen (2).

Erhitzt man in einer Ampulle 4.4 g (1) (0.023 mol), 6.0 g (2) (0.047 mol) und 100 ml Benzol 5 Tage auf 125 °C, so wird die blutrote Lösung tiefbraun. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 150 ml CCl_4 zum Sieden gebracht und von ungelöstem (2) abfiltriert. Das Filtrat wird mehrere Stunden bei 0 °C aufbewahrt, wieder erhitzt und nochmals filtriert. Nach Zugabe von 10 ml $CHCl_3$ läßt man das Filtrat 2 Tage bei 0 °C stehen und erhält 4.5 g (62% bezogen auf ein 1 : 1-Addukt) eines braunen, kristallinen Produktes, welches laut NMR-Spektrum ausschließlich aus (3) und (4) im Verhältnis 1 : 1.3 besteht. Weitere Reaktionsprodukte konnten durch NMR-Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.



Eine Trennung des Gemisches gelang durch Kristallisation aus wasserfreiem Alkohol. Die von (3), $F_p = 202\text{--}203$ °C, befreite Lösung wird eingeeignet, der Rückstand mit Cyclohexan aufgenommen und das nach eintägigem Stehen erhaltene kristalline (4) nochmals aus Cyclohexan umkristallisiert ($F_p = 123\text{--}125$ °C). 1 g des Reaktionsgemisches liefert 0.35 g (3) und 0.3 g (4). Beide Verbindungen geben korrekte C, H, N -Analysen und Molekulargewichte (massenspektrometrisch).

Aufgrund des NMR-Spektrums von (3) [in $CDCl_3$ (60 und 100 MHz): $\tau = 2.70$ (10 aromat. H); 6.88 (4 aliphat. H/s); in C_6D_6 (60 MHz): $\tau = 3.15$ (10 aromat. H/m); 7.97 (4 aliphat. H/m^[6])] ist eine symmetrische Struktur (1,1,2,2-Tetracyan-4,4-diphenylcyclopentan) ausgeschlossen. Auch das