

Nachweis von individualspezifischen Gewebsantikörpern¹

Gewebe und Organe können im allgemeinen bei Mensch, Hund oder Kaninchen nur autolog, das heisst auf dem gleichen Individuum transplantiert werden. Wird das Organtransplantat auf ein anderes Individuum der gleichen Spezies übertragen, so geht es nach einer gewissen Zeit zugrunde. MEDAWAR und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen über die homologe Transplantation von Haut bei Kaninchen beweisen, dass die erworbene Immunität bei der Zerstörung des homologen Hauttransplantates eine ausschlaggebende Rolle spielt (siehe Übersichtsreferat von MEDAWAR²). BILLINGHAM und SPARROW³ konnten im Serum immunisierter Kaninchen das Vorhandensein von Immunkörpern nachweisen, die *in vitro* das Spendergewebe derart schädigen, dass eine autologe Transplantation solchen Gewebes nicht mehr möglich war. Eine direkte Antikörperbestimmung im Serum von Kaninchen mit homologen Gewebstransplantaten wurde bisher, soweit wir die Literatur überblicken, nie beschrieben. Hingegen fanden AMOS⁴ und Mitarbeiter bei der Transplantation von Hautstücken unter Mäusen aus verschiedenartigen Inzuchtstämmen erworbene Iso-Hämagglutinine und Iso-Leukozytenagglutinine im Serum dieser Tiere.

Kürzlich beschrieben HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK⁵ eine neue nephelometrische Methode zur Erfassung von Sensibilisierungen gegen medikamentöse, Inhalations- oder Nahrungsmittelallergene an Hand von Serum. Mit Hilfe des von diesen Autoren konstruierten Nephelometers konnten wir eine Reihe von Antikörpern nachweisen: Forssmann-Antikörper, species-spezifische Gewebsantikörper, individualspezifische Gewebsantikörper. Forssmann-Antikörper und species-spezifische Gewebsantikörper wurden schon mit den klassischen serologischen Methoden (Präzipitation, Komplementbindung usw.) nachgewiesen. In unserer Versuchsanordnung gelang es erstmals, durch eine diskrete Trübungsreaktion zwischen Serum und Organextrakten auch individualspezifische Gewebsantikörper, wie sie nach der Injektion oder Transplantation von homologem Gewebe entstehen, zu ermitteln. Diese Versuche werden im folgenden kurz wiedergegeben.

Methodik. 6 Kaninchen wurden mit Leberbrei, weitere 6 Tiere mit Nierenbrei von anderen Kaninchen einmalig subkutan injiziert. 6 Kaninchen wurden zellfreie Hautextrakte mehrmals subkutan eingespritzt. 15 Kaninchen wurden Hautstücke von anderen Kaninchen ein- oder zweimalig orthotop transplantiert. Leber- oder Nierenbrei wurde auf folgende Weise hergestellt: 500 mg Leber oder Niere wurden ausgebluteten Kaninchen entnommen, fein zerschnitten und mit 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung im Potterapparat 2 min homogenisiert. Diese Organsuspension wurde Kaninchen einmalig subkutan injiziert. Die zur Injektion verwendeten zellfreien Hautextrakte wurden auf gleiche Weise wie die unten beschriebenen Antigenlösungen zubereitet und in tägli-

chen Portionen von 5 cm³ injiziert. Zur Transplantation verwendeten wir je 2 kreisrunde Hautstücke von 5 cm Durchmesser.

Der Antikörpernachweis erfolgte mit der Methode von HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK⁵. Die Beschreibung des Nephelometers und dessen Bedienung ist aus der Publikation dieser Autoren zu ersehen. Die Antikörper wurden im Serum der sensibilisierten Tiere bestimmt. 0,5 cm³ Serum wurden mit 2 cm³ *Aqua destillata* vermischt und 1,9 cm³ dieser Verdünnung in ein Messgläschen des Nephelometers eingefüllt. Durch Zugabe von Antigenverdünnungen erfolgt beim Vorhandensein von Antikörpern eine Trübungsreaktion in einem bestimmten Verdünnungsbereich. Dies manifestiert sich durch eine fehlende weitere Aufhellung der Trübungsintensität nach der Zugabe von 0,1 cm³ der betreffenden Antigenverdünnung. Die Antigenverdünnungen wurden in einer Zweierreihe in *Aqua destillata* angelegt, wobei gewöhnlich mit einer Antigenverdünnung von 1:512 begonnen und mit unverdünntem Antigen geendet wurde.

Die Antigenlösungen, die wasserklar sein müssen, wurden folgendermassen hergestellt. 2 g eines Organs werden im Mörtel feinst zerquetscht, mit 15 cm³ *Aqua destillata* versetzt und 1 h im Eisschrank bei +4°C stehengelassen. Nach 10 min dauerndem Zentrifugieren bei einer Tourenzahl von 2750 U./min wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Rückstand mit 10 cm³ *Aqua destillata* aufgeschüttelt und wieder zentrifugiert. Das Auswaschen wird so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit möglichst klar ist. Die zentrifugierten Gewebepartikel werden mit 12–15 cm³ *Aqua destillata* aufgeschüttelt und diese grobe Gewebssuspension in den Mixerapparat verbracht. Dieser dient der Desintegration der bisher noch intakten Zellen. Je nach Organ kann ein mehr oder weniger hoher Prozentsatz aller Zellen zertrümmert werden, so dass sich nachher die Zellinhalte in einer feinen Suspension befinden. Bei einer Tourenzahl der rotierenden Klingen von 12000 U./min wird Haut 20–45 min, Muskel 15–20 min und innere Organe wie Leber, Niere, Pankreas, Darm usw. 10 min im Mixerapparat belassen. Das Gemisch von feiner Suspension und groben Gewebspartikeln wird nachher auf 60 cm³ *Aqua destillata* verdünnt. Nach erneutem Zentrifugieren wird die überstehende Suspension durch ein Seitzfilter Nr. 3 filtriert. Das Filtrat ist wasserklar und wird im Deep freezer bei –30°C aufbewahrt. Auch das Serum wird, falls nicht sofort verwendet, bei –30°C aufbewahrt.

Resultate. Mittels der beschriebenen nephelometrischen Methode gelingt es nach Sensibilisierung mit homologem Gewebe, im Serum der sensibilisierten Tiere Trübungsreaktionen mit Extrakten des homologen Gewebes auszulösen. Alle mit Leber- oder Nierenbrei, mit Hauttransplantaten oder zellfreien Hautextrakten sensibilisierten Tiere zeigten eine positive serologische Reaktion mit der entsprechenden Antigenlösung des zur Sensibilisierung verwendeten homologen Gewebes.

Erworbener Antikörper, Dauer des Antikörpernachweises, Titer. Die Antikörper traten nach einmaliger Injektion von Gewebsbrei oder nach einmaliger Hauttransplantation frühestens nach 2 und spätestens nach 13, durchschnittlich nach 7 Tagen auf. Die serologische Reaktion wurde frühestens nach 7, spätestens nach 24, durchschnittlich nach 15 Tagen wieder negativ. Das Maximum des Antikörpertiters wurde zwischen dem 4. und 19. Tag, durchschnittlich am 10. Tag nach der Sensibilisierung erreicht, wobei die Titer bei unserer Versuchsanordnung zwischen 1:5 und 1:40 Serum-

¹ Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

² P. B. MEDAWAR, *General Problems of Immunity in: Preservation and Transplantation of normal Tissues* (J. A. Churchill Ltd., London 1954).

³ R. E. BILLINGHAM und E. M. SPARROW, *J. exper. Biol.* **31**, 16 (1954).

⁴ D. B. AMOS, P. A. GORER, B. M. MIKULSKA, R. E. BILLINGHAM und E. M. SPARROW, *Brit. J. exper. Pathol.* **35**, 203 (1954).

⁵ R. HOIGNÉ, W. GROSSMANN und H. STORCK, *Schweiz. med. Wschr.* **578** (1955).

verdünnung schwankten. Die mit täglichen Hautextraktinjektionen behandelten Tiere erhielten durchschnittlich 8 Injektionen bis zum Positivwerden der serologischen Reaktion.

Anamnestiche Reaktion. Bei 8 transplantierten Kaninchen haben wir nach Negativwerden der Reaktion eine zweite Hauttransplantation durchgeführt. Während bei diesen Tieren nach der ersten Transplantation die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten der Antikörper $6\frac{1}{2}$ Tage betrug, dauerte es nach der zweiten Transplantation durchschnittlich nur $2\frac{1}{2}$ Tage, bis die serologische Reaktion positiv wurde. Bei 2 Tieren konnten schon am Tage nach der zweiten Transplantation Antikörper nachgewiesen werden.

Erworbener, nicht natürlicher, individualspezifischer Antikörper. Die Seren von 6 nichtsensibilisierten Kaninchen gaben mit Hautantigenlösungen von 15 verschiedenen Kaninchen niemals eine Trübungsreaktion. Mit grösster Wahrscheinlichkeit existieren also keine natürlichen Antikörper vom Typ der mit unserer Methode nachgewiesenen Antikörper. Ferner konnten wir im Serum von 10 sensibilisierten Kaninchen, die eine positive Reaktion mit den Gewebsantigenlösungen des sensibilisierenden Kaninchens zeigten, nie Antikörper gegen Gewebe von 10 anderen nicht zur Sensibilisierung verwendeten Kaninchen nachweisen. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der nachgewiesene Antikörper wahrscheinlich individualspezifisch ist. Es ist allerdings nicht mit Sicherheit auszuschliessen, ob nicht doch Fälle von gekreuzter Sensibilisierung vorkommen. Vielleicht besteht eine solche Vielfalt von Antigenen, dass wir bei unseren Versuchen zufällig nie 2 Kaninchen mit gemeinsamen Antigenen angetroffen haben.

Individualspezifisches, in sämtlichen Organen eines Individuums vorkommendes Antigen. Die nach Injektion von Gewebsbrei oder Gewebsextrakt, bzw. nach Hauttransplantation auftretenden Antikörper reagieren nicht nur mit demjenigen Gewebe, mit welchem sensibilisiert wurde, sondern mit sämtlichen übrigen Organen des Spendertieres. In unseren Versuchen erhielten wir positive serologische Reaktionen mit folgenden Organextrakten: Haut, Niere, Leber, Herz, Lunge, Darm, Hoden, Uterus, Pankreas, Muskel. Der von uns nachgewiesene Antikörper scheint mit einem individualspezifischen Antigen, das in sämtlichen Organen eines Individuums vorkommt, in Reaktion zu treten.

Absättigung. Nach Absättigung des Serums mit Gewebsextrakt werden die Trübungsreaktionen negativ. Der Antikörper kann mit jedem Organextrakt abgesättigt werden, sei es mit dem sensibilisierenden Organ oder auch mit einem anderen Organ desselben Spendertieres. Nach Absättigung fällt die Reaktion nicht nur mit dem zur Absättigung verwendeten Organextrakt, sondern auch mit allen anderen Organextrakten des betreffenden Spendertieres negativ aus.

Eigenschaften von Antikörper und Antigen. Der erwähnte Antikörper ist thermolabil. Bei Erhitzen des Serums auf 56°C wird er nach 10–15 min zerstört. Bei 37°C ist der Antikörper nach 1–5 h, bei Zimmertemperatur nach 12–48 h nicht mehr nachweisbar. Die Dialyse mittels Colloidmembran gegen Phosphatpuffer, *Aqua destillata* oder Normalserum während 8–24 h bei 4°C zeigte, dass der Antikörper nicht dialysabel ist.

Das Antigen der Gewebsextrakte, mit dem der Antikörper in Reaktion tritt, wird bei Erhitzen auf 56°C nach 30–90 min zerstört. Bei 37°C ist das Antigen nach 10–24 h, bei Zimmertemperatur nach 1–2 Tagen nicht

mehr nachweisbar. Häufiges Einfrieren auf -30°C und Auftauen zerstört sowohl Antigen wie Antikörper.

W. BOLLAG

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 21. November 1955.

Summary

Injection of homologous tissue or tissue extracts and homologous transplantation of skin in rabbits provoke the production of antibodies. By means of a new nephelometric method, acquired antibodies against homologous tissue circulating in the serum were found. This tissue-antibody seems to be an individual-specific one, reacting with all organs of the donor. The antibody is thermolabile and not dialysable.

Increased Formation of Asparagine in 'Carica-curl' Virus Infected Leaves

A decrease in the content of insoluble leaf protein and a simultaneous increase in asparagine formation due to virus infection has been noted only in few cases. Recently authors have noticed asparagine formation in T.M.V. and Tobacco leaf-curl infected tobacco leaves¹, "yellow vein mosaic" infected leaves of *Abelmoschus esculentus*² and in mosaic infected leaves of *Carica papaya*³. The present study reveals an increased formation of asparagine and a ninhydrin reacting substance having Rf value 0.67 corresponding to β -alanine + α -aminobutyric acid due to 'Carica-curl' virus infection in *Carica papaya* leaves.

The healthy and 'Carica-curl' infected leaves were collected at about 9 a.m., from the fourth and fifth nodes, from the two shoots of the same plant, one of which was severely infected and the other healthy. The free amino acids were extracted by freezing the tissue and extracting with 70% alcohol in cold whereas the insoluble leaf protein was extracted by hydrolyzing the residue with 6N HCl and autoclaved at 20 lbs. pressure for 15 min. The amino acids were assayed using RANJAN's *et al.*⁴ horizontal migration multiple-sector technique of paper chromatography.

The free amino acids of both the leaf blade and the petiole of diseased and healthy leaves do not show any qualitative change, but the content of asparagine shows a remarkable increase in case of the 'carica-curl' infected leaves. The band corresponding to β -alanine + α -aminobutyric acid also shows an increase in the curl infected leaves as compared to healthy ones. The following free amino acids were identified: leucines + phenylalanine (Rf 0.87; I), valine + methionine (Rf 0.74; II), β -alanine + α -aminobutyric acid (Rf 0.67; III—identified by its position *cf.* RADHA KRISHNAN and VAIDYANATHAN⁵), alanine (Rf 0.57, IV), glutamic acid (Rf 0.50; V), aspartic acid (Rf 0.44, VI) and amide asparagine (Rf 0.36, VII). Band nos. I, II, and V were present in such low quantities as not to be detected in the photographs. The absence of threonine and glycine + serine, which give common bands with glutamic acid and aspartic acid respectively,

¹ M. M. LALORAYA and GOVINDJEE, *Nature* 175, 907 (1955).

² GOVINDJEE, M. M. LALORAYA, and T. RAJARAO (unpublished).

³ M. M. LALORAYA, GOVINDJEE, R. VARMA, and T. RAJARAO (unpublished).

⁴ S. RANJAN, GOVINDJEE, and M. M. LALORAYA, *Proc. Nat. Inst. Sci. India*, [B] 21, No. 1, 42 (1955).

⁵ A. N. RADHA KRISHNAN and C. S. VAIDYANATHAN, *Naturwissenschaften* 41, H. 18, 432 (1954).