ing protein and NA synthesis in poliovirus infected cells. Protein determinations and ultraviolet spectrophotometry was a routine in our assays determined mainly on total cell lysates^{1, 20}. In agreement with others^{47, 48} a decrease of protein and nucleic acid content (in average about 10%) was observed at the end stage. However there have been some findings of an increase in 4 to 8 hours p. i.³⁰, which data would be in agreement with ACKERMANN's results^{37, 49} not confirmed by others^{47, 48, 50, 35}. A yet unexplained periodical fluctuation in enzyme activities was observed during earlier^{4-6, 36}, or the present work and demonstrated recently by others for protein and nucleic acids in *uninfected* HeLa cells⁵¹. Thus the reinvestigation of similar questions has to be carried out with *reproducible* and strictly controlled experiments³⁰. Further, eventually radio-biological work is needed to prove the penetration of the substrates through the cell membrane¹; the fate of phosphorus in phosphate-free milieu, glycolysis, respiration and phosphorylation in simple substrate-media will be studied also³⁰. Various cell-lines displayed greatly varying enzyme activities in normal and infected TCs. These observations suggest the use of only one cell-type for one definit study; further considera-

tions on the cause of similar findings were outside of the scope of the present work.

The well-preserved state of the normal controls^{1, 2} the low enzyme levels in the supernatant (especially when $1/2$ concentration of balanced salt solution was added) the high virus yield² prove that the changes described, explored in over 60 experiments (about 220 individual assays) are *characteristic* and due to the pathochemical process of virus *infection*. The role of RN-ases in the biosynthesis of poliovirus was described in precedent papers^{52, 3, 5}. Application of improved technical methods to test the activity of other enzymes or special problems connected with viral infections will be reported³⁰.

The kind interest of Priv. Doz. Dr. G. POETSCHKE, the help of Miss G. MÜLLER-NEUDORF and Mr. E. SOIDERER is gratefully acknowledged.

⁴⁷ N. P. SALZMAN, R. Z. LOCKART, Jr. and E. D. SEBRING, *Virology* **9**, 244 [1959].

⁴⁸ E. L. ROTHSTEIN and L. A. MANSON, *Virology* **9**, 141 [1959].

⁴⁹ W. W. ACKERMANN, P. C. LOH and F. E. PAYNE, *Virology* **7**, 170 [1959].

⁵⁰ H. GOLDFINE, KOPPELMAN and E. A. EVANS, Jr., *J. biol. Chemistry* **232**, 577 [1958].

⁵¹ N. P. SALZMAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **31**, 158 [1959].

⁵² E. KOVÁCS, G. MALATT, *Infett. Parasit.* **10**, 190 [1958].

Vergleichende Untersuchungen über die antigene Wirksamkeit verschiedener gereinigter Serumprotein-Fractionen*

I. Mitt.: Humanalbumin sowie γ -Globulin vom Rind als Antigene. Zum Antikörperrnachweis OUCHTERLONY-Technik und Immunoelktrophorese nach GRABAR und WILLIAMS

Von F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ und A. DUTSCHKE

(Z. Naturforschg. **15 b**, 517—525 [1960]; eingegangen am 6. Februar 1960)

In vorliegender Arbeit wurde in tierexperimentellen Studien der antikörper-produzierende Effekt von Albumin und γ -Globulin geprüft. Bei gleicher Versuchsanordnung und gleichem Sensibilisierungs-Modus ergab sich ein zeitlicher und quantitativer Unterschied der Antikörper-Produktion. Die Untersuchungen wurden unter Verwendung von Geltechniken (Ouchterlony-Technik und Immuno-Elektrophorese nach Grabar und Williams) und der Papierelektrophorese ausgeführt.

Zur Frage der Spezifität von Präzipitinen** sind bereits in den dreißiger Jahren unseres Jahrhunderts umfangreiche, vorwiegend tierexperimentelle

Untersuchungen angestellt worden¹⁻⁷. Unabhängig von der Art der verwendeten Antigene, des Sensibilisierungs-Modus sowie der für die Immunisierung

* Unter Verwendung verschiedener Antikörper-Nachweismethoden, insbesondere neuerer Geltechniken sowie der Präzipitat-N-Bestimmung nach Heidelberger-Kendall.

** Präzipitierenden Antikörpern.

¹ A. K. BOOR u. L. HEKTOEN, *J. infect. Diseases* **46**, 1 [1930]; R. DOERR, *Die Immunitätsforschung*, Bd. 1, Antikörper, 1. Teil, S. 141, Wien 1947.

² M. HEIDELBERGER u. F. E. KENDALL, *J. exp. Medicine* **62**, 697 [1935].

³ L. HEKTOEN u. A. K. BOOR, *J. infect. Diseases* **49**, 29 [1931].

⁴ S. B. HOOKER u. W. C. BODY, *J. Immunology* **26**, 469 [1934].

⁵ E. NICOLAS, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales **109**, 1249 [1932].

⁶ T. SATOH, *Z. Immunitätsforsch. exp. Therap.* **79**, 117 [1933].

⁷ H. R. WOLFE, a) *Proc. exp. Biol. Med.* **27**, 146 [1929]; b) *Physiol. Zool.* **6**, 55 [1933]; c) *J. Immunology* **29**, 1 [1935].

verwendeten Tierspezies, sind die verschiedenen Untersucher übereinstimmend unter anderem zu dem Schluß gekommen, daß die mehrfache Injektion eines Antigens eine Verminderung der Spezifität des gegen dieses Antigen gebildeten Antikörpers bedingt. Insbesondere haben HEIDELBERGER und KENDALL² beobachtet, daß bei fortgesetzter Immunisierung — auch bei Verwendung eines reinen Proteins als Antigen — immer mehr Antikörper produziert werden, die mit einer größeren Anzahl immunologischer Determinanten des Antigens zu reagieren vermögen.

In der vorliegenden Arbeit soll mit neueren Präzipitin-Nachweismethoden, insbesondere Geltechniken, dieses Problem noch einmal aufgegriffen und geprüft werden: Am Beispiel zweier rein dargestellter Proteinfractionen, nämlich Albumin und γ -Globulin als definierte Antigene, soll im Tierexperiment die Antikörperbildung in quantitativer und qualitativer Hinsicht verfolgt werden, wobei in diesem ersten Abschnitt die qualitativ faßbaren Besonderheiten mitgeteilt werden.

Tiermaterial, Versuchsanordnung und Methoden

Tiermaterial

Es wurden insgesamt 10 Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2000 und 3000 g in Versuch genommen.

Versuchsanordnung und Sensibilisierungsmodus

Als Antigene kamen Humanalbumin sowie γ -Globulin vom Rind, beide als Trockensubstanz der Behringwerke, zur Anwendung. Von jedem Antigen wurde eine 4-proz. Suspension in physiol. Kochsalzlösung hergestellt.

Von den oben genannten 10 Kaninchen wurden 5 Tiere als Gruppe I (K_1 bis K_5) mit der 4-proz. Humanalbuminlösung, die anderen 5 Tiere als Gruppe II (K_6 bis K_{10}) mit der 4-proz. Rinder- γ -Globulinlösung nach folgendem Schema sensibilisiert: Jedes Kaninchen erhielt in zweitägigen Abständen je 0,5 ml der jeweiligen Antigenlösung intravenös in eine der Ohrvenen appliziert. Insgesamt waren es 12 Injektionen, das sind 6,0 ml pro Tier und Sensibilisierungsserie.

Vor Versuchsbeginn wurde das Serum jedes Kaninchens

1. auf seinen Gesamteiweißgehalt,
 2. auf die relative Zusammensetzung der Serumeiweißkörper sowie
 3. auf seinen Gehalt an Präzipitinen untersucht.
- In gleicher Weise wurde jedes Kaninchen während des Versuches in Abständen von 10 Tagen kontrolliert. Insgesamt ergaben sich hiermit ein Ausgangswert, zwei Kontrollen während und eine letzte Kontrolle 6 Tage nach Abschluß der Sensibilisierungsserie. Für die einzelnen Kontrollen wurden jedem Tier 12 bis 15 ml Blut entnommen. Die daraus gewonnenen Seren wurden mit Merfen, einem bakteriziden Quecksilberpräparat (4‰ige wäßrige Lösung)*, versetzt. Hämolytische sowie stark lipämische Seren wurden nicht verwendet.

Methoden

1. Gesamteiweißbestimmung

Die Gesamteiweißbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode nach WEICHSELBAUM⁸.

2. Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese wurde nach den Angaben von GRASSMANN und HANNIG ausgeführt⁹.

3. Gelmethoden

a) Ouchterlony-Diffusionsverfahren

Zum Nachweis von gebildeten Präzipitinen im Serum sensibilisierter Kaninchen wurde als Vorversuch zunächst der Ouchterlony-Schalentest herangezogen. Methodische Einzelheiten sind dem einschlägigen Schrifttum zu entnehmen¹⁰. Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden Antigen bzw. Immunserum vom Kaninchen in folgender Weise aufbereitet:

Antigen (4-proz. Albumin- bzw. 4-proz. γ -Globulinlösung)

0,2 ml Antigen,
0,1 ml dest. Wasser,
0,3 ml Agar-Agar.

Immunserum: Das Immunserum wurde jeweils im Verhältnis 1 : 1 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt.

Von jeder Suspension wurden in die eigens dafür vorgesehenen runden Aussparungen in der Ouchterlony-Agar-Platte je 0,2 ml gegeben.

b) Immuno-Elektrophorese nach Grabar und Williams

Die Immuno-Elektrophorese wurde zum Zwecke der Differenzierung der mit der Agar-Diffusionstechnik beobachteten Präzipitate vorgenommen (methodische Grundlagen s. einschlägiges Schrifttum)^{10 a-15}.

c) Statistik

Die Statistik wurde zur Auswertung der papier-elek-

* Fa. Zyma-Blaes, München.

⁸ T. E. WEICHSELBAUM, Amer. J. clin. Pathol. **10**, 40 [1946].

⁹ W. GRASSMANN, K. HANNIG u. M. KNEDEL, Dtsch. med. Wschr. **1951**, 333.

¹⁰ Ö. OUCHTERLONY, Acta pathol. microbiol. scand. **25**, 186 [1948]; **32**, 231 [1953].

^{10a} H. GÖTZ, G. BERG u. F. SCHEIFFARTH, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **114**, 72 [1957].

¹¹ F. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 65 [1954]; Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **164**, 15 [1955].

¹² P. GRABAR u. C. A. WILLIAMS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **10**, 193 [1953]; **17**, 67 [1955].

¹³ J. J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergie **7**, 103 [1957].

¹⁴ F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ u. B. FRENGER, Ärztl. Wschr. **1956**, 573.

¹⁵ J. URIEL u. J. J. SCHEIDEGGER, Bull. Soc. Chim. biol. **37**, 165 [1955].

¹⁶ A. LINDER, Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, Basel 1951.

trophoretischen Ergebnisse angewandt, wobei im wesentlichen die Ausführungen von LINDER¹⁶ maßgebend waren.

Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Fragestellung, inwieweit die unter Verwendung verschiedener Eiweißantigene induzierte Antikörperbildung gleichfalls Unterschiede aufzeigt, nach den Befunden der verschiedenen Untersuchungsmethoden bewertet.

1. Ergebnisse mit der Ouchterlony-Technik

Die Seren der noch unbehandelten Tiere (Aus-

Abb. 1 a. Gruppe I: als Antigen Humanalbumin.

Abb. 1. Versuchsanordnung im Ouchterlony-Diffusions-Verfahren bei der ersten Kontrolle für die mit Humanalbumin (Abb. 1 a) sowie für die mit Rinder- γ -Globulin sensibilisierten Kaninchen (Abb. 1 b): Bei den mit Albumin sensibilisierten Tieren konnten keine Präzipitations-Linien nachgewiesen werden; dagegen zeigten alle mit γ -Globulin sensibilisierten Kaninchen gegen das spezifische Antigen je eine Präzipitations-Linie (vgl. auch Text S. 519!).

Abb. 1 b. Gruppe II: als Antigen Rinder- γ -Globulin.

gangswerte) sowie die Seren bei erster, zweiter und dritter Kontrolle wurden zunächst in der Petrischale getestet. Es handelte sich hierbei um eine orientierende Versuchsanordnung, bei der lediglich festgestellt werden sollte, ob und in welchem Ausmaße Präzipitations-Reaktionen mit den verschiedenen Kaninchenserum und den korrespondierenden Antigenen auftreten würden. Insbesondere interessierte die Frage, inwieweit unter Berücksichtigung der als Antigen verwendeten einheitlichen und relativ reinen * Proteinfraktionen des normalen Menschen- bzw. Rinderserums, auch die Antikörperbildung eine streng spezifische und einheitliche ist. Gleichzeitig sollte auch die Bildung von Nebenpräzipitinen nach wiederholter Antigeninjektion beachtet und beurteilt werden.

Die Seren der unbehandelten Kaninchen ergaben bei Diffusion gegen Humanalbumin (K_1 bis K_5) sowie gegen Rinder- γ -Globulin (K_6 bis K_{10}) in keinem Falle eine Reaktion.

Bei der ersten Kontrolle konnten bei den mit Albumin sensibilisierten Tieren wiederum in keinem Falle Präzipitations-Linien nachgewiesen werden (Abb. 1 a). Jedoch traten bei Diffusion der Immunsere von K_6 bis K_{10} gegen Rinder- γ -Globulin bei Tier K_6 und K_7 je eine sehr schwache, bei den Kaninchen K_8 bis K_{10} je eine deutlich ausgeprägte Präzipitations-Linie auf (Abb. 1 b).

Bei der zweiten Kontrolle wurden in Gruppe I lediglich bei Tier K_1 und K_3 je eine flüchtige, bei Tier K_5 eine permanente, deutliche Präzipitations-Linie sichtbar (Abb. 2 a); in Gruppe II präzipitierten die Immunsere sämtlicher Tiere gegen das hier verwendete γ -Globulin aus, jedoch ergaben sich gegenüber der ersten Kontrolle merkliche Unterschiede in der Intensität der gebildeten Präzipitate. Wie aus Abb. 2 b zu ersehen ist, sind diesmal vor allem die Linien bei K_8 und K_9 schwächer, bei K_{10} offensichtlich etwas stärker ausgeprägt.

Bei der letzten Kontrolle, eine Woche nach Beendigung der Sensibilisierungs-Serie, waren für beide Gruppen in etwa die gleichen Befunde zu erheben wie bei der zweiten Kontrolle.

2. Ergebnisse der Immuno-Elektrophorese

Die mit der Ouchterlony-Technik nachgewiesenen Präzipitate wurden durch die Immuno-

* Reinheitsprüfungen konnten nur für das Humanalbumin der Behringwerke (Humanalbumin „reinst“) vorgenommen werden. Dieses Protein hat sich im immunologischen Versuch als hochgereinigte, einheitliche Fraktion erwiesen.

Elektrophorese einer weiteren Differenzierung bzw. Lokalisierung unterzogen, d. h. es wurden alle diejenigen Immunsere, welche mit den entsprechenden Antigenen im Ouchterlony-Vorversuch Präzipitate zeigten, anschließend immuno-elektrophoretisch analysiert.

Demnach konnte die Immuno-Elektrophorese der Kaninchensere vor Versuchsbeginn vernachlässigt werden.

Abb. 2 a.

Abb. 2. Sie zeigt die Versuchsanordnung im Ouchterlony-Diffusions-Verfahren bei der zweiten Kontrolle für die mit Humanalbumin (Abb. 2 a) sowie für die mit Rinder- γ -Globulin sensibilisierten Kaninchen (Abb. 2 b). Vgl. hierzu Text S. 519.

Abb. 2 b.

Bei der ersten Kontrolle wurden die Immunsere der Tiere K_6 bis K_{10} immuno-elektrophoretisch aufgeschlossen. Dabei zeigten sich in Übereinstimmung mit der Ouchterlony-Technik je eine Präzipitations-Linie mit unterschiedlicher Intensität bei den

Kaninchen K_8 , K_9 sowie K_{10} . Sie gehörten eindeutig dem γ -Bereich an und stellten sich als langgezogene, feine Präzipitations-Linien dar. Die Sere der mit Albumin sensibilisierten Kaninchen ergaben im Vorversuch keine Reaktion, es wurde deshalb die Immuno-Elektrophorese nicht durchgeführt.

Bei der zweiten Kontrolle wurden, den Ergebnissen der Ouchterlony-Voruntersuchung entsprechend, sämtliche Immunsere elektrophoretisch analysiert. Es ergab sich hierbei für Tier K_1 sowie K_5 je eine Präzipitations-Linie im Bereich der γ -Globulinfraktion, desgleichen für die Kaninchen K_6 , K_7 , K_8 , K_9 sowie K_{10} . Die Präzipitations-Linien stellten sich in jedem Falle als einheitliche, d. h. weder gedoppelte noch ungleichmäßig geschwungene Linien dar. Die Präzipitations-Linien von Tier K_9 und K_{10} waren besonders stark ausgebildet.

Abb. 3 a.

Abb. 3 b.

Präzipitationslinien mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

Abb. 3. Die Abb. 3 a und 3 b zeigen die Immuno-Elektrophoresen der als Antigene verwendeten Serumfraktionen (3 a Albumin, 3 b γ -Globulin) gegen welche nach Abschluß des Elektrophorese-Vorganges jeweils geeignete Kaninchen-Immunsere von den Kanälen in den Agar zur Diffusion gelangten. — Abb. 3 a zeigt Albumin gegen K_1 und K_5 , Abb. 3 b Rinder- γ -Globulin gegen K_6 und K_9 .

Bei der letzten Kontrolle konnten, wie bei vorhergehender Kontrolle, und in Übereinstimmung mit den Testversuchen nach Ouchterlony, bei Kaninchen K_1 sowie K_5 im γ -Globulinbereich Anti-Albumin, bei den Kaninchen K_6 , K_7 , K_8 , K_9 und K_{10} ebenfalls im γ -Globulinbereich Anti-Rinder- γ -

Globulin nachgewiesen werden. Die Immunseren der Kaninchen K₂, K₃ sowie K₄ präzipitierten auch diesmal gegen das zur Sensibilisierung verwendete Antigen nicht aus. — Auffällig war bei dieser letzten Kontrolle, daß bei den Tieren K₇, K₉ und K₁₀ neben der mehr oder weniger stark auspräzipitierten γ -Linie eine weitere Präzipitationslinie mit kleinerem Radius und im Anfangsbereich der γ -Globulinfraktion gelegen, sichtbar wurde. Hierbei handelt es sich um zwei unterschiedliche Komponenten im γ -Globulinbereich der entsprechenden Kaninchen-Immunseren.

Im Umkehrversuch, d. h. bei elektrophoretischer Trennung der Antigene und anschließender seitlicher Diffusion der Immunseren konnten in den geeigneten Fällen die Präzipitations-Linien an typischer Stelle nachgewiesen werden (Abb. 3). Kreuzreaktionen waren in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachzuweisen.

3. Ergebnisse der papierelektrophoretischen Untersuchungen

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen der Kaninchenserum wurden vorgenommen, um eine weitere, wenn auch relativ grobe Methode des Antikörpernachweises zur Kontrolle der mit anderen Ver-

fahren gewonnenen Ergebnisse in vorliegende Untersuchungen mit einzubeziehen. Vor allem sollte erfaßt werden, inwieweit unter der Sensibilisierung die γ -Globulinfraktion als Trägerprotein der Immunglobuline eine Zunahme erfährt.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tab. 1 summarisch wiedergegeben. Überblickt man die Verlaufskontrollen, so zeigt sich für Gruppe I im wesentlichen folgendes: Kontinuierlicher Abfall der Albumine, leichter Anstieg sämtlicher Globulinfraktionen bei der ersten Kontrolle; leichter Abfall der α_1 -, β_1 - und β_2 -Globuline, leichter Anstieg der α_2 - und deutlicher Anstieg der γ -Globulinfraktion bei der zweiten Kontrolle; erneuter Anstieg der α_1 -, β_1 - und β_2 -Fraktionen bei der letzten Kontrolle; das γ -Globulin bleibt, verglichen mit der vorhergehenden Kontrolle, auf praktisch demselben Niveau. Statistisch gesichert werden konnten bei einer Sicherung von $P=0,05$ ein Abfall der Albumine und ein Anstieg der γ -Globuline bei der zweiten und dritten Kontrolle, jeweils gegenüber dem Ausgangswert.

Der Verlauf für die einzelnen Proteinfractionen bei Gruppe II tendiert in ungefähr der gleichen Richtung wie bei Gruppe I. Abweichend von Gruppe I

Ausgangswerte bzw. Kontrollen	Eiweiß- Fraktionen	Gruppe I			Gruppe II		
		<i>M</i>	σ	<i>t</i>	<i>M</i>	σ	<i>t</i>
Ausgangswerte 7. 10. 57	Albumin	65,60	4,28		61,59	3,44	
	α_1 -	7,69	1,32		8,30	1,62	
	α_2 -	4,71	1,02		4,52	0,27	
	β_1 -	7,93	1,10		7,19	0,83	
	β_2 -	2,35	0,57		2,73	0,92	
	γ -Globulin	12,28	0,28		15,42	2,14	
1. Kontrolle 16. 10. 57	Albumin	60,95	3,46	1,89	55,72	5,44	2,04
	α_1 -	8,54	2,10	0,77	9,77	2,23	1,20
	α_2 -	4,99	1,22	0,00	7,27	4,41	1,40
	β_1 -	9,69	1,71	1,93	7,92	1,93	0,78
	β_2 -	3,19	0,92	1,71	3,01	0,53	0,58
	γ -Globulin	12,64	1,48	0,54	16,35	3,43	0,52
2. Kontrolle 26. 10. 57	Albumin	58,59	4,43	2,55	51,21	6,25	3,25
	α_1 -	7,76	1,43	0,08	8,71	2,94	0,55
	α_2 -	6,19	1,26	2,03	5,17	0,65	2,10
	β_1 -	7,52	1,74	0,45	8,04	1,04	1,47
	β_2 -	2,69	0,69	0,85	3,40	0,86	1,18
	γ -Globulin	16,74	3,15	3,16	23,41	3,01	4,84
3. Kontrolle 5. 11. 57	Albumin	53,89	8,75	2,69	57,02	1,85	2,61
	α_1 -	9,54	2,05	1,70	8,95	1,69	0,43
	α_2 -	5,62	1,80	0,98	4,71	0,34	0,95
	β_1 -	9,48	2,42	1,33	8,72	1,05	2,55
	β_2 -	4,26	1,90	2,15	3,41	0,37	1,55
	γ -Globulin	17,19	4,10	3,61	17,19	2,19	1,29

Tab. 1. Statistische Auswertung der papierelektrophoretisch ermittelten relativen Prozente der Serumeiweißkörper der beiden mit verschiedenen Antigenen sensibilisierten Tiergruppen (vgl. hierzu auch Text S. 521 und 522!).

	Lfd. Nr.	Ausgangswert 7. 10. 57	1. Kontrolle 16. 10. 57	2. Kontrolle 26. 10. 57	3. Kontrolle 5. 11. 57
Gruppe I	1	6,1	5,4	5,8	5,8
	2	6,3	5,4	5,9	5,9
	3	6,0	5,4	5,4	5,2
	4	5,9	5,4	5,6	5,3
	5	6,6	5,9	6,1	6,3
Gruppe II	6	6,0	5,4	5,8	6,3
	7	6,1	5,6	6,1	5,9
	8	5,9	5,4	5,8	6,3
	9	6,6	5,9	6,5	7,2
	10	7,2	6,9	6,6	6,1

Tab. 2. Einzelergebnisse der Gesamteiweiß-Bestimmungen in den verschiedenen Tierseren und zu verschiedenen Untersuchungs-Terminen.

Ausgangswerte bzw. Kontrollen	Eiweiß- Fraktionen	Gruppe I			Gruppe II		
		<i>M</i>	σ	<i>t</i>	<i>M</i>	σ	<i>t</i>
Ausgangswerte 7. 10. 57	Albumin	4,01	0,10		3,91	0,20	
	γ -Globulin	0,68	0,20		0,89	0,41	
1. Kontrolle 16. 10. 57	Albumin	3,31	0,26	0,77	3,23	0,14	6,18
	γ -Globulin	0,70	0,20	0,15	0,96	0,32	0,30
2. Kontrolle 26. 10. 57	Albumin	3,37	0,20	0,40	3,32	0,26	3,93
	γ -Globulin	0,97	0,20	2,23	1,45	0,26	2,54
3. Kontrolle 5. 11. 57	Albumin	3,04	0,30	0,50	3,62	0,20	2,23
	γ -Globulin	0,99	0,29	2,58	1,10	0,20	1,05

Tab. 3. Ermittelte Durchschnittswerte der absoluten Prozente für Albumin und γ -Globulin mit statistischer Auswertung unter Berücksichtigung der verschiedenen Kontrolluntersuchungen sowie der mit verschiedenen Antigenen sensibilisierten Tiergruppen.

erscheint jedoch das Verhalten der Albumin- und Globulinfraktionen bei der letzten Kontrolle, bei welcher die Albumine gegenüber der Vorkontrolle wieder ansteigen, die γ -Globuline dagegen abfallen. Insgesamt zeigt sich der Anstieg der γ -Globuline bis zur zweiten Kontrolle steiler als in Gruppe I. Statistische Sicherungen liegen bei einer Sicherungsgrenze von $P=0,05$ für Albumin (Abfall!) und γ -Globulin (Anstieg!) bei der zweiten und für Albumin (weiterer Abfall!) bei der dritten Kontrolle gegenüber den Ausgangswerten vor. Bei einer Sicherungsgrenze von $P=0,01$ bzw. $0,02$ konnte für das γ -Globulin der Gruppe II bei der zweiten Kontrolle eine signifikante Abweichung im Sinne einer γ -Globulinvermehrung nachgewiesen werden. Von den Einzelelektrophoresen imponieren als typische Vertreter ihrer Gruppe die der Tiere K_1 sowie K_9 .

4. Ergebnisse der Gesamteiweiß-Bestimmungen

Die Ergebnisse der Gesamteiweiß-Bestimmung sind aus Tab. 2 zu ersehen.

Auf die jeweiligen Gesamteiweißwerte bezogen, wurden weiterhin die absoluten Prozente der Albumin- und γ -Globulinfraktionen für die Ausgangswerte und die drei Kontrollen errechnet. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich hier aber nur in drei Fällen signifikante Unterschiede: Für Gruppe I ein Anstieg der γ -Globuline gegenüber dem Ausgangswert bei der letzten Kontrolle, für Gruppe II ein Albuminabfall gegenüber dem Ausgangswert bei der ersten und zweiten Kontrolle (Tab. 3). Dabei sollte untersucht werden, ob im Verlaufe der Sensibilisierung eine echte, d.h. absolute γ -(Immun)-Globulinbildung erfolgt ist.

Diskussion

Bei Vergleich der Ergebnisse von Gruppe I und Gruppe II kann festgestellt werden, daß bei Anwendung von Albumin einerseits und von γ -Globulin andererseits als Antigen eine unterschiedliche Antikörperbildung erfolgt. Die mit Albumin sensibilisierten Tiere zeigten gegenüber den mit γ -Globulin

behandelten Kaninchen eine *später* einsetzende sowie eine relativ *schwächere* Antikörperbildung. Diese Tatsache stützt sich im wesentlichen auf die übereinstimmenden Untersuchungs-Ergebnisse mit verschiedenen Antikörper-Nachweismethoden, d. h. sowohl mit Gel-Techniken als auch mit der Papier-elektrophorese. Hiermit konnte, gemessen an der Ausbildung von Präzipitations-Linien bzw. dem Anstieg der γ -Globuline, in Gruppe I erst bei der zweiten Kontrolle und hier nur bei zwei von den fünf sensibilisierten Tieren der Nachweis von Antikörpern erbracht werden. Auch bei der letzten Kontrolle konnten lediglich bei denselben zwei Kaninchen eine Antikörper-Produktion festgestellt werden.

Ganz anders verhielt sich die Gruppe II. Hier zeigten bereits bei der ersten Kontrolle drei Tiere, bei der zweiten und dritten Kontrolle sämtliche anderen Tiere Antikörper. Mit den Gelmethode-ergaben sich jeweils eine, in einzelnen Fällen zwei Präzipitations-Linien. Diese, sowohl zeitliche als auch quantitativ unterschiedliche Antikörperbildung ist insofern bemerkenswert, als es sich in beiden Fällen um isolierte Serumeiweiß-Fractionen gehandelt hat, die in der gleichen Konzentration und der gleichen Gesamtmenge zur Sensibilisierung appliziert wurden.

Möglicherweise könnten artspezifische Besonderheiten der einzelnen Eiweißantigene zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Diese Frage ist aber hier zu vernachlässigen, da nach den Versuchsergebnissen von TREFFERS, MOORE und HEIDELBERGER¹⁷ die Determinante für die Sonderspezifität von Albumin bzw. Globulin den artspezifischen Charakter völlig zu unterdrücken scheint. Zumindest ist erwiesen, daß die Determinante für die Sonderspezifität der Proteinfraction weit aktiver ist als die artspezifische Struktur¹⁸. Wahrscheinlicher ist die Annahme, daß zwischen Albumin und γ -Globulin tiefgreifende Unterschiede, die etwa an die jeweilige Eiweißstruktur geknüpft sind, zu den von uns be-

obachteten unterschiedlichen Reaktionsweisen geführt haben. In der Tat verhalten sich erfahrungsgemäß die verschiedenen Antigene, die als Immunisierungs-Antigene verwendet werden, recht unterschiedlich. Unabhängig von der Art und der Individualität der serum-spendenden Tiere gibt es erfahrungsgemäß Antigene, welche regelmäßig und in kurzer Frist zu hochtiterigen Immunseren führen, wogegen andere Proteine sich als sehr schwache Antigene erweisen; infolgedessen sind hier oft forcierte Immunisierungs-Verfahren erforderlich, um Antisera von auch nur geringem Antikörpergehalt zu erhalten.

Es ist bekannt¹⁹, daß bei gleichzeitiger Einwirkung zweier Antigene von verschiedener Aktivität auf den Organismus eine partielle oder totale Unterdrückung des schwächeren Partners beobachtet werden kann. So konnten bereits DOERR und BERGER¹⁸ beweisen, daß Albumine und Globuline aus gleichem Serum Antigene von ganz verschiedener *Aktivität* sind*. Worauf allerdings diese unterschiedliche Aktivität beruht, läßt sich nicht eindeutig erklären. Vergleicht man Albumin und γ -Globulin hinsichtlich ihrer Bausteine miteinander, so läßt sich feststellen, daß, abgesehen von quantitativen und qualitativen Unterschieden des Aminosäuregehalts, insbesondere auch Unterschiede im Gehalt an Kohlehydraten vorhanden sind — Albumin enthält wesentlich weniger Hexose und Hexosamin —. Der Kohlehydratanteil in einem Eiweißantigen bzw. die Besonderheit der Konfiguration der Moleküle des Eiweißmoleküls, die dem Kohlehydratanteil benachbart sind, scheint tatsächlich nach neueren Ergebnissen²⁰⁻²³ die serologische Spezifität des Antigens entscheidend zu beeinflussen. Allerdings gilt dies nicht generell, da völlig kohlehydratfreie Proteine ebenfalls die Fähigkeit zur Bildung spezifischer Antikörper besitzen^{23, 24, 19}. Immerhin wird man Strukturunterschieden der einzelnen Antigene bei der Entfaltung ihrer immunisierenden Aktivität wesentliche Bedeutung beimessen müs-

¹⁷ H. P. TREFFERS, D. H. MOORE u. M. HEIDELBERGER, Amer. J. exp. Medicine **75**, 135 [1942].

¹⁸ R. DOERR u. W. BERGER, Z. Hyg. **96**, 191 [1922].

¹⁹ H. SCHULTZE, Angew. Chem. **60**, 250 [1948].

* Als Grundlage für diesen Beweis diente allerdings eine völlig andere Versuchsanordnung als in dem hier vorliegenden Fall: Meerschweinchen wurden mit einer Mischung aus 1 Tl. Albumin und 100 Tln. Globulin präpariert, daraufhin wurden sie nur gegen Globulin, nicht aber gegen Albumin anaphylaktisch. Erst bei einer Umkehrung des Mengenverhältnisses (100 Tle. Albumin, 1 Tl. Globulin)

entwickelte sich sowohl gegen Albumin als auch gegen Globulin eine Anaphylaxie.

²⁰ F. MICHEEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **280**, 92 [1944].

²¹ F. MICHEEL, H. EMDE u. H. DÖRNER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 258 [1942].

²² L. PAULING u. Mitarb., Physiol. Rev. **23**, 203 [1943].

²³ H. SCHMIDT, Fortschritte der Serologie, S. 100, Darmstadt 1955.

²⁴ B. KICKHÖFEN, Diss., Göttingen 1945.

sen, wobei außer Kohlehydraten auch Lipide, oder, wie LOISELEUR und M. LEVY²⁵ annehmen, auch polare Gruppen OH oder COOH, eine Rolle spielen.

Die Frage, inwieweit die in *unseren* Versuchen nachgewiesene Antikörperbildung streng spezifisch gegen die verwendeten, reinen Antigene gerichtet ist, kann für das Anti-Albumin-Immunprotein dahingehend beantwortet werden, daß es sich in den Fällen, in welchen es zu Antikörperbildung gekommen ist, um einen offenbar streng spezifischen, einheitlichen Antikörper handelt (vgl. u. a. Abb. 1 und 2). Für das Anti- γ -Globulin, das sich bei immuno-elektrophoretischer Analyse in drei Fällen als nicht einheitliche Präzipitations-Linie dargestellt hat, müssen zwei Möglichkeiten zur Diskussion gestellt werden: entweder war das verwendete Antigen nicht völlig rein bzw. wies mindestens 2 Komponenten auf, gegen die naturgemäß jeweils ein Antikörper gebildet wurde, oder es handelt sich um einen Hyperimmunisierungseffekt mit Bildung von Nebenpräzipitinen.

Die erste Möglichkeit kann insofern nicht völlig ausgeschlossen werden, als entsprechende Reinheitsprüfungen des Rinder- γ -Globulins in Ermangelung eines spezifischen Anti-Rinder- γ -Globulins nicht durchführbar waren. Andererseits wäre denkbar, daß bei dem offenbar immunologisch aktiveren γ -Globulin als Antigen Zeichen der Hyperimmunisierung auftraten. Hierfür spricht die Tatsache, daß diese Art „Nebenpräzipitin“ erst bei der letzten Kontrolle als eine Präzipitations-Linie in Erscheinung trat, die einer Eiweißkomponente mit größerer Wanderungsgeschwindigkeit als der der bisher beobachteten γ -Globulinfraktion entsprechen muß. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wird vor allem von KABAT und Mitarb.^{26–29} angenommen, daß ein Organismus, wenn er längere Zeit zur Produktion großer Mengen schwerer Immunproteine induziert wird, in Form einer Art Fragmentierung bei fortwährender Neubildung sich dieser zumindest mengenmäßig unphysiologischen Proteine zu entledigen trachtet, oder daß das Trägerprotein für Immunglobulin, nämlich das γ -Globulin, infolge einer Erschöpfung seine Antikörper-Bindungsfähigkeit

auf benachbarte normale Serumfraktionen überträgt. In der Tat findet man in den Seren hochimmunisierter Organismen mehrere mit Antikörperwirkung ausgestattete Proteinkomponenten von verschiedenem Mol.-Gew. und differenter Wanderungsgeschwindigkeit^{28–30}. Zu grundsätzlich gleichen Ergebnissen kamen WOLFE und Mitarb.^{7a–c}, NICOLAS⁵ sowie SATOH⁶, ferner HEIDELBERGER und Mitarb.², HOOKER⁴ sowie HEKTOEN³, insbesondere haben die letztgenannten Autoren mit Antigenen gearbeitet, die als reine und einheitliche Substanzen gelten durften, wobei auch sie die Beobachtung gemacht haben, daß die wiederholte Zufuhr des Antigens die Spezifität des gebildeten Antikörpers vermindert.

Was die Ergebnisse der papier-elektrophoretischen Untersuchungen betrifft, so ist zunächst die gute Übereinstimmung der ermittelten Ausgangswerte der Serumprotein-Fractionen mit den in der Literatur bekannten Normalwerten für Kaninchenserum zu erwähnen. Gemessen an dem Verhalten der Albumin- sowie der γ -Globulin-Fractionen unter der Sensibilisierung war in beiden Gruppen auf eine Antikörperbildung zu schließen^{31, 32}. Dabei läßt sich in Übereinstimmung mit den mit anderer Methodik erzielten Untersuchungsergebnissen der zeitlich spätere Anstieg der γ -Globuline bei Gruppe I sowie der steiler und früher eingesetzte Anstieg und darauf folgende Rückgang der γ -Globuline in Gruppe II erkennen. Die Albumine zeigen in beiden Gruppen ein entsprechendes gegensinniges Verhalten.

Ob es sich bei der Verschiebung des Verhältnisses Albumin/ γ -Globulin insbesondere im Falle der einmal beobachteten γ -Globulin-Zunahme um eine absolute, quantitative γ -Globulin-Vermehrung im Sinne aktiver Antikörperbildung handelt, kann nicht sicher beantwortet werden. Vergleicht man die absoluten Werte der Albumin- und γ -Globulin-Fraktion mit dem Verhalten der Gesamteiweißwerte, so ist zwar eine Änderung zwischen Albumin und γ -Globulin im obigen Sinne auch hier zu erkennen, die Gesamteiweißwerte verhalten sich jedoch bei den verschiedenen Kontrollen völlig indifferent, so daß also die absolute γ -Globulin-Neubildung auf Grund unserer Befunde nicht sicher erwiesen ist. Zumindest wird sie

²⁵ J. LOISELEUR u. M. LEVY, Ann. Inst. Pasteur **73**, 116 [1947].

²⁶ E. A. KABAT u. K. O. PEDERSEN, Science [New York] **87**, 372 [1938].

²⁷ M. L. PETERSMANN u. A. M. PAPPENHEIMER, Science [New York] **93**, 458 [1941].

²⁸ E. A. KABAT, J. exp. Medicine **69**, 103 [1939].

²⁹ A. TISELIUS u. E. A. KABAT, J. exp. Medicine **69**, 119 [1939].

³⁰ M. HEIDELBERGER u. K. O. PEDERSEN, J. exp. Medicine **65**, 393 [1937].

³¹ H. PETER u. A. HANSER, Z. exp. Med. **121**, 419 [1953].

³² H. PETER, A. HANSER u. D. AMELUNG, Z. Immunforsch. **109**, 383 [1952].

mit der Papierelektrophorese quantitativ nicht in ausreichendem Maße erfaßt. Diese Tatsache würde dafür sprechen, daß nicht die Vermehrung der γ -Globuline bei der Darstellung von Immunsereen das Wesentliche ist, sondern eine qualitative Veränderung in dieser Fraktion³⁰.

Somit kann auf Grund unserer mit verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse festgestellt werden, daß bei Verwendung von Albumin und γ -Globulin als Antigen bei gleichem Sensibilisierungs-Modus eine zeitliche und quantitativ unterschiedliche Antikörperbildung erfolgt.

Größe, Gestalt und Solvation des Edestinmoleküls aus dem Studium der Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Von J. C. CLEEMANN und O. KRATKY

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz
(Z. Naturforschg. **15 b**, 525—535 [1960]; eingegangen am 23. Mai 1960)

Die experimentelle Grundlage der Untersuchung bilden Messungen an Edestinlösungen mit Konzentrationen zwischen 1,4 und 0,655 Prozent, anfänglich durchgeführt auf photographischem Wege, später mit Geiger-Müller-Zählrohr und Proportionalzählrohr. Durch Extrapolation auf $c=0$ wird ein Streumassenradius von $R=49,6$ Å erhalten. Die Volums- und Gestaltsbestimmung erfolgt durch Vergleich mit theoretischen Kurven im Bereich des Hauptmaximums und ersten Nebenmaximums. Am wahrscheinlichsten ist ein Rotationsellipsoid mit den Halbachsen 48,5, 48,5 und 87 Å. Das entsprechende Volumen von 860 000 Å³ weist auf eine Solvation von mehr als 100 Prozent hin. Zur Kontrolle dieser Konsequenz wird eine Mol.-Gew.-Bestimmung durch Absolutmessung der Intensität vorgenommen (Beschreibung dazu entwickelter experimenteller Behelfe und kurze Wiedergabe der Theorie). Das so bestimmte Mol.-Gew. von 324 000 steht in Übereinstimmung mit den besten mit anderen Methoden durchgeführten Messungen. Das aus dieser Größe und Gestalt errechnete Reibungsverhältnis von 1,32 ist deutlich größer als das von SVEDBERG mit 1,21 ermittelte. Eine Klärung dieser Diskrepanz steht noch aus.

I. Überblick der mit anderen physikalischen Methoden gewonnenen Ergebnisse

Das korpuläre Protein Edestin ist ein Vertreter der Pflanzenglobuline und kommt als Reservestoff im Hanfsamen vor. Es wurde daraus erstmalig von RITTHAUSEN¹ 1881 gewonnen. Nachdem die präparative Gewinnung von OSBORNE², HITCHCOCK³ und FLORENCE⁴ verbessert worden war, gelang es schließlich BAILEY⁵ Edestinkristalle zu züchten, womit die Voraussetzungen für die Röntgen-Strukturanalyse der Kristalle⁶ geschaffen worden waren. Weitere Gewinnungsmethoden haben BEECKMANS und LONTIE⁷, GORING und JOHNSON⁸, DRENTH und WIEBENGA⁹ und andere gegeben.

Im Rahmen der Strukturaufklärung der Eiweißstoffe wurden seither zahlreiche Untersuchungen über Größe und Gestalt des Edestinmoleküls durchgeführt.

Osmotische Messungen weisen darauf hin, daß Edestin in Harnstofflösung in Untereinheiten aufspaltet. Für das Zahlenmittel des Mol.-Gew. der Bruchstücke wurde

50 000 gefunden⁹. Nach STAHMANN und Mitarbb.¹⁰ werden in Gegenwart von Harnstoff durch eine Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften Gruppen frei, die im nativen Protein geschützt sind. In Kochsalzlösung ist Edestin nach SVEDBERG¹¹ im pH-Bereich von 5,5 bis 10, nach BEECKMANS und LONTIE⁷ im pH-Bereich von 5,4 bis 8,9 stabil.

Tab. 1 gibt, nach Methoden geordnet, in Erweiterung einer Zusammenstellung von DRENTH und WIEBENGA¹² die bisher gefundenen Mol.-Gew. wieder. Ältere Angaben, die auf Grund von Verbesserungen in der Präparation oder der Meßtechnik durch neuere Messungen korrigiert wurden, sind in Klammern aufgeführt. Zu den Ergebnissen seien einige Bemerkungen gemacht.

Das von SVEDBERG^{11, 15} mit der Ultrazentrifuge bestimmte Mol.-Gew. von 310 000 ist unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens von 0,744 berechnet. Eine neuere Bestimmung der letzteren Größe ist mittels eines von MACINNES und DAYHOFF²⁵ eingeführten Präzisionsverfahrens von CHARLWOOD²⁶ durchgeführt

¹ H. RITTHAUSEN, J. prakt. Chem. **23**, 481 [1881].

² T. B. OSBORNE, J. Amer. chem. Soc. **14**, 662 [1892].

³ D. J. HITCHCOCK, J. gen. Physiol. **4**, 597 [1921].

⁴ G. FLORENCE u. Mitarbb., Bull. Soc. Chim. biol. **15**, 135 [1933].

⁵ K. BAILEY, Trans. Faraday Soc. **38**, 186 [1942].

⁶ J. DRENTH u. E. H. WIEBENGA, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **74**, 813 [1955]; R. S. BEAR, in: C. E. HALL, J. biol. Chemistry **185**, 45 [1950].

⁷ M. L. BEECKMANS u. R. LONTIE, Bull. Soc. Chim. biol. **28**, 509 [1946].

⁸ D. A. J. GORING u. P. JOHNSON, Arch. Biochem. Biophysics **56**, 448 [1955].

⁹ N. F. BURK, D. M. GREENBERG, J. biol. Chemistry **87**, 197 [1930].

¹⁰ STAHMANN u. Mitarbb., Congr. intern. biochim., Resumes communs., 3 Congr., Brussels 1955, S. 11.

¹¹ T. SVEDBERG u. A. J. STAMM, J. Amer. chem. Soc. **51**, 2170 [1929].

¹² J. DRENTH u. E. H. WIEBENGA, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **74**, 813 [1955].