

Über den Zusammenhang zwischen Aminogruppenblockierung und Schutzwert von Immunsereen¹⁾

Von H.-D. MÜLLER

Mit 9 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Die primären Aminogruppen verschiedener Immunsereen mehrerer Spezies wurden unter physiologischen Bedingungen mit Keten acetyliert und mit Dinitrofluorbenzol dinitrophenyliert. Die Ergebnisse, nach denen die Wertigkeit eine Funktion der freien Aminogruppen ist, sind in Tabellen zusammengefaßt. Mit der Einführung des DNP-Restes in Immunsereen ist allgemein eine stärkere Abnahme des Schutzwertes verbunden als mit der Einführung des Acetylrestes. Denaturierungserscheinungen wurden nicht beobachtet. Die vorliegende Untersuchung des allgemeinen Zusammenhanges zwischen funktionellen Gruppen und biologischer Funktionalität von Immunsereen bildet die Fortsetzung der in Dessau begonnenen Arbeiten von G. ZIMMERMANN, der dem Verfasser in dankenswerter Weise dieses spezielle Thema überließ.

In den letzten Jahren hat der Zusammenhang zwischen chemischen Gruppen von Naturstoffen und ihrer biologischen Funktion mehr und mehr an Interesse gewonnen. Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge werden funktionelle Gruppen chemisch verändert und die damit verbundenen Veränderungen des biologischen Verhaltens beobachtet.

Proteine enthalten verschiedene funktionelle Gruppen²⁾, die sich mit chemischen Agenzien definiert umsetzen lassen. Es sind dies vorwiegend primäre Aminogruppen, Carboxylgruppen, ferner Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen, sowie zur Azokupplung mit Diazoniumver-

¹⁾ 7. Mitteilung über konjugierte Proteine; 1. Mitteilung: G. ZIMMERMANN, Sonderheft 1957 d. Mittlgsbl. d. Chem. Ges. i. d. DDR S. 89; 2. Mitteilung: G. ZIMMERMANN, Naturwiss. **44**, 623 (1957); 3. Mitteilung: G. ZIMMERMANN, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **116**, 219 (1958); 4. Mitteilung: G. ZIMMERMANN, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **116**, 228 (1958); 5. Mitteilung: G. ZIMMERMANN, Arch. exp. Vet. Med. **13**, im Druck; 6. Mitteilung: H.-D. MÜLLER u. G. ZIMMERMANN, Chem. Technik **11 III**, 154 (1959).

²⁾ M. G. SEVAG, Erg. Hyg. **28**, 424 (1954).

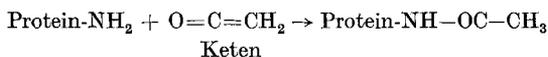
bindungen befähigte, aromatische Reste^{3) 4) 5)}. Eine umfangreiche Zusammenstellung der Reaktionen nativer Proteine mit chemischen Reagenzien gibt HERRIOTT⁶⁾.

Wenn derartige funktionelle Gruppen mit chemischen Agenzien umgesetzt werden, müssen zwei Bedingungen erfüllt werden: Erstens muß die Reaktion hinsichtlich Temperatur und p_H unter annähernd physiologischen Bedingungen verlaufen, um eine Schädigung des Proteins durch Denaturierung zu vermeiden. Zweitens darf durch Einführung von hydrophoben Substituenten in das Proteinmolekül das Proteinderivat nicht wasserunlöslich werden, da hierdurch eine immunbiologische Auswertung sehr erschwert würde.

Nach diesen Forderungen kommen zum Umsatz primärer Aminogruppen in Seren aus der großen Zahl von Verbindungen, die mit primären Aminogruppen gut reagieren, nur wenige in Frage.

Ein Umsatz der Seren mit Acetyl-, Benzoyl- oder Phosphoroxychlorid führte infolge der bei der Reaktion freiwerdenden Salzsäure zu örtlich extremen p_H -Werten und Denaturierung. Die Benzoylierung von Seren mit Benzazid in Anlehnung an die Methode von JONES⁷⁾ in schwach alkalisch gepufferter Lösung bei Zimmertemperatur führte nach drei Tagen zu erheblicher Niederschlagsbildung, die in der Reihenfolge Pferdeserum, Hammelserum, Schweineserum, Rinderserum zunehmend zu beobachten war. Der Umsatz primärer Aminogruppen von Seren mit Phenylisocyanat, wonach durch Addition Serum-Phenylharnstoffverbindungen zu erwarten sind⁸⁾, ergab ebenfalls schwer lösliche Derivate. Die Reaktion von Cyanamid mit Seren führte selbst bei mehrwöchiger Einwirkung bei Raumtemperatur nur zu einer so geringen Umsetzung der primären Aminogruppen zu den erwarteten Guanidinderivaten⁹⁾, daß der Aminostickstoff nur wenig abnahm.

Eine sehr glatte und schonende Acetylierung primärer Aminogruppen von Proteinen gelingt nach CHOW und GOEBEL¹⁰⁾ mit Keten:



³⁾ G. ZIMMERMANN, Sonderheft 1957 d. Mittlgsbl. d. Chem. Ges. i. d. DDR S. 89.

⁴⁾ G. ZIMMERMANN, Naturwiss. **44**, 623 (1957).

⁵⁾ G. ZIMMERMANN, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **116**, 219 (1958).

⁶⁾ R. M. HERRIOTT, Advances in Prot. Chem. III, 169; Academic Press Inc., Publishers New York 1947.

⁷⁾ JONES, J. chem. Soc. (London) **1952**, 5016.

⁸⁾ HOPKINS u. WORMALL, Biochem. J. **27**, 740, 1706 (1933); **28**, 228 (1934).

⁹⁾ HOUBEN-WEYL, Die Meth. d. org. Chemie IV. Bd., S. 556, 2. Aufl., G. Thieme-Verlag Leipzig, 1924.

¹⁰⁾ B. F. CHOW u. W. F. GOEBEL, J. exp. Medicine **62**, 192 (1935).

Die Autoren verwandten das Verfahren zur Darstellung künstlich veränderter Proteine als Modellantigene. Diese Acetylierungsmethode erwies sich auch für Immunsereen als sehr geeignet. Es wurden vorwiegend native Tetanus- und Diphtheriesereen verschiedener Spezies für die Acety-

Tabelle 1

Abhängigkeit der IE von Acetyl-Tetanussereen von ihrem Aminostickstoffgehalt

Serumart	%-KJELDAHL-N)	%-Amino-N) **)	IE/ml 5proz. Lösungen
Ausgangshammelserum	12,1	0,78	125
Acetylhammelsereum a	11,8	0,69	123
Acetylhammelsereum b	11,5	0,28	108
Acetylhammelsereum c	11,4	0,10	75
Ausgangs-Pferdesereum	12,1	0,95	50
Acetylpferdesereum a	11,8	0,45	31
Acetylpferdesereum b	11,5	0,18	22
Acetylpferdesereum c	11,2	0,07	14
Ausgangs-Rindersereum	13,4	0,89	100
Acetyl-Rindersereum a	13,0	0,40	75
Acetyl-Rindersereum b	12,7	0,15	45
Acetyl-Rindersereum c	12,5	0,08	25

*) In der Trockensubstanz.

***) Volumetrische VAN SLYKE-Halbmikromethode.

Tabelle 2

Abhängigkeit der AE von Acetyl-Diphtheriesereen von ihrem Aminostickstoffgehalt

Serumart	%-KJELDAHL-N)	%-Amino-N) **)	AE/ml 5proz. Lösungen
Ausgangshammelserum	13,7	0,70	165
Acetylhammelsereum a	13,4	0,61	155
Acetylhammelsereum b	13,4	0,41	133
Acetylhammelsereum c	13,2	0,07	75
Ausgangspferdesereum	12,3	0,83	50
Acetylpferdesereum a	12,1	0,31	37
Acetylpferdesereum b	12,0	0,14	20
Acetylpferdesereum c	11,8	0,06	16
Ausgangs-rindersereum	12,6	0,64	40
Acetyl-rindersereum a	12,4	0,45	28
Acetyl-rindersereum b	12,2	0,20	15
Acetyl-rindersereum c	12,1	0,11	11

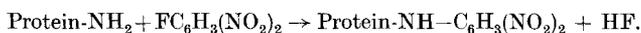
*) In der Trockensubstanz.

***) Volumetrische VAN SLYKE-Halbmikromethode.

lierung verwandt. Durch unterschiedliche Durchleitungszeit des Ketengases durch die stark gepufferten, verdünnten Seren wurde ein abgestufter Acetylierungsgrad erreicht, der sich durch einen regelmäßigen Gang der Aminostickstoffwerte zu erkennen gibt. Die Tab. 1 und 2 zeigen die gefundenen Werte. Bei Tetanus- und Diphtherieseren aller drei Spezies ist mit abnehmendem Aminostickstoff ein deutlicher Rückgang der IE- bzw. AE-Werte verbunden. Es fällt weiterhin auf, daß die Schutzeinheiten nicht völlig verschwinden, selbst wenn der Aminostickstoffgehalt fast Null beträgt. Daher haben die primären Aminogruppen wohl einen entscheidenden, aber keinen ausschließlichen Einfluß auf die Wirksamkeit des Antikörpers.

Der KJELDAHL-Stickstoffgehalt sinkt mit zunehmendem Acetylierungsgrad geringfügig, da das Mol-Gewicht des Proteins durch die Acetylgruppen etwas steigt.

Um die Unabhängigkeit obiger Befunde vom Substituenten an den primären Aminogruppen zu beweisen, wurde statt des Acetylrestes der Dinitrophenylrest (DNP-) an die Aminogruppen gebracht. Es gelingt dies ohne Denaturierung durch Umsatz der verdünnten, bikarbonatgepufferten Seren mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) nach SORM und Mitarb.¹¹⁾.



Man kann die primären Aminogruppen nicht so vollständig dinitrophenylieren wie acetylieren, da durch Einführung einer zu großen Zahl hydrophober DNP-Reste das Protein wasserunlöslich wird. Die erhaltenen DNP-Seren werden mit zunehmender Anzahl von DNP-Resten schwerer löslich und gelber. Tab. 3 und 4 stellen wieder die Abhängigkeit der IE- und AE-Werte vom Aminostickstoffgehalt unterschiedlich dinitrophenylierter Tetanus- und Diphtherieseren verschiedener Spezies dar.

Tabelle 3
Abhängigkeit der IE von DNP-Tetanussereen von ihrem Aminostickstoffgehalt

Serumart	%Amino-N*)	AE/ml 5proz. Lösungen
Ausgangshammelserum	0,78	125
DNP-Hammelserum a	0,64	75
DNP-Hammelserum b	0,52	37
Ausgangspferdeserum	0,73	150
DNP-Pferdeserum a	0,65	133
DNP-Pferdeserum b	0,55	83
Ausgangsrinderserum	0,89	100
DNP-Rinderserum a	0,64	67
DNP-Rinderserum b	0,54	58

*) In der Trockensubstanz, volumetrische VAN SLYKE-Halbmikromethode.

¹¹⁾ J. M. HAIS u. K. MACEK, Hdbuch d. Papierchromatographie I. S. 785, G. Fischer-Verlag, Jena 1958.

Bei den DNP-Seren nehmen mit sinkendem Aminostickstoffgehalt wiederum die Titer erheblich ab. Die Abnahme ist relativ größer als bei den Acetylseren. Es muß angenommen werden, daß die Einführung

des DNP-Restes in den Antikörper sich zusätzlich nachteilig auf den Schutzwert auswirkt.

Die Acetylierung und Dinitrophenylierung wurde außer mit obigen antitoxischen Seren mit einem antibakteriellen Serum durchgeführt. Es wurde ein Abortus-Bang-Serum vom Rind verwandt, die Auswertung erfolgte mittels der Langsamagglutination. Tab. 5 zeigt wieder die Parallelität zwischen Aminostickstoffgehalt und dem Agglutinationstiter.

Die Abbildungen 1 bis 9 zeigen als Beispiel oben erläuteter Proteinderivate Tiseluselektrophoreseaufnahmen nativer Diphtherieseren von Pferd und Hammel, nativen Tetanusserums vom Rind und verschieden hoch acetylierter bzw. dinitro-

phenylierter Derivate dieser drei Seren. Allen drei Seren ist gemeinsam, daß mit zunehmender Besetzung der freien Aminogruppen eine fortschreitende Uniformierung der Serumproteine einhergeht. Durch die Besetzung der basisch fungierenden, freien Aminogruppen nimmt

Tabelle 4

Abhängigkeit der AE von DNP-Diphtherieseren von ihrem Aminostickstoffgehalt

Serumart	%Amino-N*)	AE/ml 5proz. Lösungen
Ausgangshammelserum	0,70	165
DNP-Hammelserum a	0,55	84
DNP-Hammelserum b	0,35	33
Ausgangspferdeserum	0,83	50
DNP-Pferdeserum a	0,66	33
DNP-Pferdeserum b	0,55	17
Ausgangsrinderserum	0,61	40
DNP-Rinderserum a	0,53	17
DNP-Rinderserum b	0,43	13

*) In der Trockensubstanz, volumetrische VAN SLYKE-Halbmikromethode.

Tabelle 5

Abhängigkeit des Langsamagglutinationstiter von Acetyl- und DNP-Abortus-Bang-Seren von deren Aminostickstoffgehalt

Serumart	%Amino-N*)	Langsamagglutinationstiter (bez. auf 0,5-proz. Lösungen)
Ausgangs-Bang-Serum	0,81	1:40 ±
Acetyl-Bang-Serum a	0,79	1:40 ±
Acetyl-Bang-Serum b	0,69	1:20 ±
Acetyl-Bang-Serum c	0,30	1:10 ±
DNP-Bang-Serum a	0,53	1:20 ±
DNP-Bang-Serum b	0,44	1:10 ±
DNP-Bang-Serum c	0,35	0

*) In der Trockensubstanz, volumetrische VAN SLYKE-Halbmikromethode.

bei derartigen Proteinderivaten der saure Charakter stark zu. Die Folge davon ist eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes zu saureren p_H -Werten. Bei der Papierstreifenelektrophorese wurde infolge-

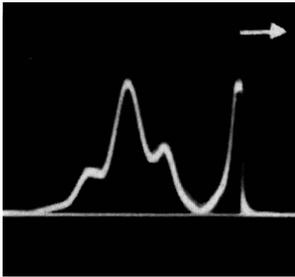


Abb. 1. Diphtherie-Hammelserum, 28,2°, 200 V/20 mA, n. 80 Min.

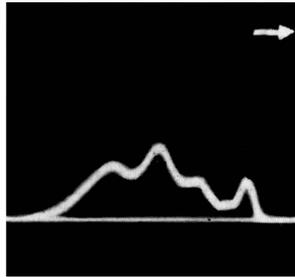


Abb. 4. Diphtherie-Pferdeserum, 28°, 190 V/20 mA, n. 60 Min.

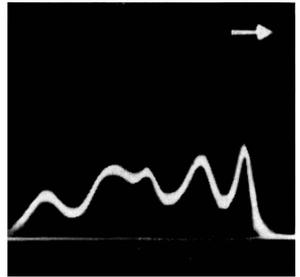


Abb. 7. Tetanus-Rinderserum, 29,3°, 200 V/20 mA, n. 80 Min.

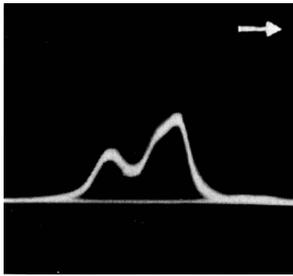


Abb. 2. Acetyl-Diphtherie-Hammelserum b, 29,2°, 180 V/20 mA, n. 35 Min.

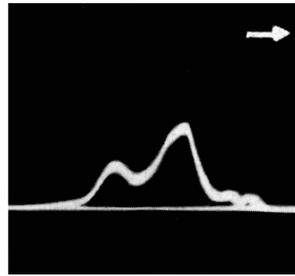


Abb. 5. Acetyl-Diphtherie-Pferdeserum a, 29,2°, 180 V/20 mA, n. 35 Min.

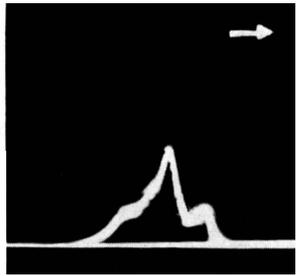


Abb. 8. DNP-Tetanus-Rinderserum a, 30°, 190 V/20 mA, n. 35 Min.

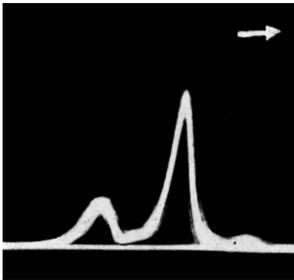


Abb. 3. Acetyl-Diphtherie-Hammelserum c, 29,2°, 180 V/20 mA, n. 35 Min.

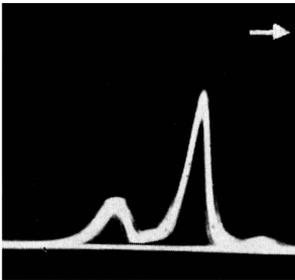


Abb. 6. Acetyl-Diphtherie-Pferdeserum c, 28,3°, 180 V/20 mA, n. 35 Min.

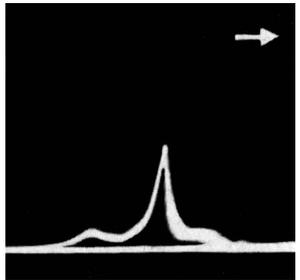


Abb. 9. DNP-Tetanus-Rinderserum b, 29,2°, 180 V/20 mA, n. 35 Min.

Abb. 1—9. Aufnahmen der Tiselius-Elektrophoresen in Michaelis-Puffer p_H 8,6, Ionenstärke 0,1

dessen eine verstärkt anodische Lauf tendenz der Acetyl- und DNP-Serumderivate beobachtet. Etwa am Start verbliebene, denaturierte Anteile fanden sich nicht.

Experimentelles

1. Acetylierung der Seren

Das zur Acetylierung verwandte Ketengas wurde durch katalytische Zersetzung von Acetondampf am glühenden Platindraht gewonnen¹²⁾¹³⁾. Der Draht war bei einem Durchmesser von 0,3 mm 1,18 m lang und wurde mit 6 A bei 35 V belastet.

Das Ketengas wurde unmittelbar durch drei hintereinander geschaltete Waschflaschen geleitet, die mit je 50 ml 2proz., mit 30% Natriumacetat gepuffertem Serum beschickt waren. Es erwies sich als zweckmäßig, die letzte Waschflasche nach etwa zwei, die mittlere nach vier und die erste nach acht Minuten abzunehmen. Diese Reaktionszeit ist zur Senkung des primären Aminostickstoffs auf obige Werte ausreichend. Weiteres Einleiten von Keten führt durch Nebenreaktionen zu Ausfällungen.

Die Acetylseren wurden anschließend dialysiert und lyophil getrocknet.

2. Dinitrophenylierung von Seren

Je 100 ml mit Bikarbonat gesättigtes, 3proz. Serum wurde mit Mengen von 50 bis 250 mg DNFB 5 Stunden geschüttelt, dialysiert und lyophil getrocknet.

3. Bestimmung der Wertigkeit der Serumderivate

Die Schutzwerte der Tetanusseren wurden nach der derzeitigen deutschen, amtlichen Prüfungsmethode¹⁴⁾ an Mäusen, die der Diphtherieseren nach JENSEN¹⁵⁾ an Kaninchen bestimmt.

¹²⁾ E. OTT, R. SCHRÖTER u. K. PACKENDORF, J. prakt. Chem. **130**, 177 (1931).

¹³⁾ R. H. OSTER u. R. M. HERRIOTT, J. gen. Physiol. **18**, 69, 71 (1934).

¹⁴⁾ Behringwerkmitteilungen **13**, 12 (1941).

¹⁵⁾ C. JENSEN, Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und -antitoxin, Kopenhagen 1933.

Dessau, Forschungsinstitut für Impfstoffe, Chemische Abteilung.

Bei der Redaktion eingegangen am 4. Dezember 1959.