

## ANHANG

VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN  
SYNTHETISCHER POLYGLUTAMINSÄUREN VERSCHIEDENER  
KONSTITUTION

G. IVÁNOVICS

Mikrobiologisches Institut der Universität Szeged

DURCH wiederholtes intravenöses Impfen von Kaninchen oder Pferden mit durch Hitze getöteten bekapselten Milzbrandbazillen lassen sich Immunsera gewinnen, die mit Lösungen der natürlichen Polyglutaminsäuren bis zu einer Verdünnung von mehreren Millionen eine Präzipitationsreaktion zeigen.<sup>1,2</sup> Unter natürlichen Polyglutaminsäuren ist die aus Milzbrandbacillen (*B. anthracis*) abgetrennte (Anthrax-Polypeptid) und die aus dem Nährboden anderer aëroben, mesophilen Sporenträger (z.B. *B. subtilis*) isolierte Poly-glutaminsäure (Subtilis-Polypeptid) zu verstehen. Beide Polypeptide weisen die Eigenschaft eines Haptens (Halbantigens) auf, d.h. ihre parenterale Verabreichung hat keine Bildung eines Antikörpers zur Folge.<sup>2,3</sup>

Als Ergänzung der Konstitutionsaufklärung des Anthrax-Polypeptids und des Subtilis-Polypeptids, die Bruckner und Mitarbeiter<sup>4</sup> durchgeführt haben, wurden synthetische Poly-glutaminsäuren verschiedener Konstitution auf ihre serologische Aktivität geprüft. Diese Prüfung wurde mit antikapsularen Immunkörper enthaltenden Kaninchen- und Pferdesera durchgeführt; als Vergleichssubstanz diente ein Subtilis-Polypeptid Präparat ursprünglicher Isolierungsart.<sup>5</sup> Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 und 2 angeführt.

Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der mit Hilfe der Ringprobe und Agardiffusionsmethode durchgeführten Versuche. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass ein antikapsularen Immunkörper enthaltendes Pferdeserum nur von der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure und der *mesoiden*  $\gamma$ -Polyglutaminsäure präzipitiert wurde. Gänzlich inaktiv hingegen, erwiesen sich die Poly-glutaminsäuren anderer Konstitution, darunter auch die  $\gamma$ -Poly-L-glutaminsäure, obzwar diese erste qualitative Testung bei der mässigen Verdünnung von 1 : 1000 durchgeführt wurde. Zu den Daten dieser Tabelle sei noch bemerkt, dass anstatt der durchschnittlichen Molekulargewichte der einzelnen Präparate ihre Aminostickstoffwerte (bestimmt nach van Slyke) verzeichnet wurden.

Die Tabelle 2 berichtet über die quantitative, vergleichende Prüfung der serologischen Aktivität des Subtilis-Polypeptids ursprünglicher Isolierungsart,<sup>5</sup> der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure (Tabelle 1, Nr. 1) und der *mesoiden*  $\gamma$ -Polyglutaminsäure (Tabelle 1, Nr. 3). Es ist aus diesen Daten ersichtlich, dass die synthetische  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure Pferdeimmunsera bei eben so grossen Verdünnungen präzipitiert wie das Subtilis-Polypeptid, gleich sind auch die maximalen Menge des abgeschiedenen Antikörpers. Die *mesoide*  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure zeigte gegenüber Pferdeserum eine etwas schwächere Aktivität als die  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure. Aus dem Kaninchen-serum Nr. 46 wurde nur ein Teil seines Antikörpergehaltes durch  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure präzipitiert. Sonderbarer Weise zeigte das Kaninchen-serum-P, dessen mit dem

<sup>1</sup> J. Tomcsik und H. Szongott *Z. Immunforsch.* 77, 86 (1933).<sup>2</sup> J. Tomcsik und G. Ivánovics *Z. Immunforsch.* 93, 195 (1938).<sup>3</sup> G. Ivánovics *Z. Immunforsch.* 97, 443 (1939).<sup>4</sup> V. Bruckner, J. Kovács, J. Wein, M. Kajtár und H. Nagy, s. die vorangehende Mitteilung.<sup>5</sup> G. Ivánovics und V. Bruckner *Z. Immunforsch.* 90, 304 (1937); 91, 175 (1937).

TABELLE 1

Konstitution der Poly-glutaminsäure	Art der Synthese (Literaturangabe)	Amino-N %	Serologische Aktivität
(1) $\gamma$ -Poly-D-Glu.	4 (Methode 2)	1,5	+
(2) $\gamma$ -Poly-D-Glu.	4 (Methode 4)	0,65	+
(3) <i>mesoide</i> $\gamma$ -Poly-Glu.	4	2,9	+
(4) $\gamma$ -Poly-L-Glu.	4	0,36	--
(5) $\alpha$ -Poly-L-Glu.	6	0,14	--
(6) $\alpha$ -Poly-D-Glu.	6	0,12	--
(7) $\alpha\gamma$ -Poly-L-Glu.	7	0,36	--
(8) $\alpha\gamma$ -Poly-D-Glu.	7	0,43	--

Qualitative Prüfung der serologischen Aktivität von Poly-glutaminsäuren verschiedener Konstitution mit Antianthrax-Pferdeimmseren. Verdünnung: 10<sup>8</sup>.

TABELLE 2

Substanz	Angewandtes Immserum	Präzipitationstiter (Millionen)	Menge des aus 1 ml Serum präzipitierten Antikörpers ( $\mu$ g)
Subtilis-Polypeptid	Kaninchen-P	0,2	844
	Kaninchen Nr. 46	2,5	1231
	Pferde Nr. 971	2,5	945
	Pferde AS	3,0	1790
$\gamma$ -Poly-D-Glu.	Kaninchen-P	keine Präz.	
	Kaninchen Nr. 46	2,5	819
	Pferde Nr. 971	2,5	881
	Pferde AS	3,0	1740
<i>mesoide</i> $\gamma$ -Poly-Glu.	Pferde AS	2,0	1030

Quantitative, vergleichende Prüfung der serologischen Aktivität der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure (Tabelle 1, Nr. 1), der *mesoiden*  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure (Tabelle 1, Nr. 3) und des Subtilis-Polypeptids (Amino-N 0,20%).

Subtilis-Polypeptid ermittelter Präzipitationstiter übrigens ziemlich niedrig war, mit  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure überhaupt keine Präzipitationsreaktion. Dass aber der Antikörper dieses vor 15 Jahren hergestellten und seitdem aufbewahrten Immserums mit  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure doch spezifisch reagierte konnte, durch ihre positive

<sup>6</sup> V. Bruckner, K. Kovács, J. Kovács und A. Kótai *Experientia* 10, 166 (1945); *Hung. Acta Chim.* 5, 267 (1955).

<sup>7</sup> V. Bruckner, M. Szekerke und J. Kovács *Naturwissenschaften* 42, 179 (1955); 43, 107 (1956); 44, 90 (1957); *Z. Physiol. Chem.* 309, 25 (1957).

Hemmungsreaktion nachgewiesen werden. Bei der Ermittlung dieser Hemmungsreaktion diente als Grundlage die beim optimalen Mengenverhältnis ausgeführte Präzipitationsreaktion des Subtilis-Polypeptids und des Kaninchenserums-P. Diese Reaktion wurde von 150  $\mu\text{g}$  der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure gänzlich, von 30  $\mu\text{g}$  teilweise aufgehoben. Vollständigkeitshalber sei hier bemerkt, dass keine der Poly-glutaminsäuren, die in der Tabelle 1 als serologisch inaktiv bezeichnet wurden, die Präzipitationsreaktion des Kaninchenserums-P und des Subtilis-Polypeptids auch in geringstem Mass beeinträchtigte, auch dann nicht, wenn sie in einer Menge von 650  $\mu\text{g}$  ausgesetzt wurde.

Die oben aufgezählten feineren Unterschiede, die zwischen dem serologischen Verhalten des Subtilis-Polypeptids, der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure und der *mesoiden*  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure zu beobachten waren, dürften ihren Grund in der Verschiedenheit der durchschnittlichen Molekulargewichte bzw. der Dispersität dieser Polypeptide haben. Diese Unterschiede liessen sich an Hand der Ouchterlony'schen Agar-Diffusionsmethode<sup>8</sup> sehr klar erkennen. Während nämlich im Falle des Subtilis-Polypeptids eine weniger als 1 mm breite, sehr scharf abgegrenzt Präzipitationszone in einem 3 mm Abstand vom Rande der das Immuneserum enthaltenden Bohrung entstand, erschien die von der Präzipitations herrührende Trübung z.B. im Falle der synthetischen  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure in Form eines etwa 3 mm breiten, inhomogenen Streifens, dessen Rand fast ganz bis zum Rand der das Immuneserum enthaltenden Bohrung hervorgedrungen war. Aus diesem Unterschied ist darauf zu schliessen, dass das Subtilis-Polypeptid ziemlich homodispers ist, während die synthetische  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure ein stark polydisperses Gemisch darstellt, dessen überwiegender Anteil aus Komponenten besteht, die ein kleineres Molekulargewicht haben als die überwiegenden Komponenten des Subtilis-Polypeptids. Auf diese Differenz dürfte auch das unterschiedliche Verhalten des Subtilis-Polypeptids und der  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure gegenüber dem Kaninchenserum-P zurückgeführt werden. Hierzu sei auf die frühere Beobachtung<sup>9,10</sup> hingewiesen, dass Anthrax-Antikörper, abhängig davon, ob sie in Kaninchen oder Pferden entstanden sind, mit ihren homologen Haptenen auf verschiedene Weise reagieren können, und zwar auch dann, wenn ihre Spezifität gleich ist.

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Versuchsbefunde sind noch durch die Ergebnisse zu ergänzen, die bei der Untersuchung der durch die serologisch aktiven Polyglutaminsäuren adsorbierten Sera gewonnen wurden. Diesbezügliche Untersuchungen, die mit dem Pferdeserum AS durchgeführt wurden, brachten folgendes Ergebnis. Es ist aus Tabelle 2 ersichtlich, dass die synthetische  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure aus dem Pferdeserum AS praktisch die gleiche Menge des Antikörpers präzipitiert wie das Subtilis-Polypeptid; (1790 bzw. 1740  $\mu\text{g}$ ; die geringe Differenz dürfte dem Versuchsfehler zugeschrieben werden). Aus der Flüssigkeit, die nach dem Abschleudern des Präzipitats gewonnen wurde, konnte weder durch einen Zusatz vom Subtilis-Polypeptid, noch durch Zusatz von der synthetischen  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure eine erneute Präzipitation erzeugt werden. Mit der *mesoiden*  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure liessen sich zwar nur 1030  $\mu\text{g}$  des Antikörpers abscheiden, doch konnten aus der abgeschleuderten Flüssigkeit durch Zusatz von 25  $\mu\text{g}$  des Subtilis-Polypeptids noch weitere

<sup>8</sup> Ö. Ouchterlony *Acta Path. Microbiol., Scand.* 26, 507 (1949).

<sup>9</sup> G. Ivánovics *Z. Immunforsch.* 97, 443 (1939).

<sup>10</sup> G. Ivánovics *Z. Immunforsch.* 98, 420 (1940).

687  $\mu\text{g}$  des Antikörpers ausgefällt werden, so dass die Gesamtmenge 1717  $\mu\text{g}$  betrug. Wurde jedoch mit der mesoiden  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure der Antikörper aus dem Pferdeimmunserum nebst Anwendung des optimalen Mengenverhältnisses der beiden Lösungen einmal ausgefällt, so konnte durch Zusatz von mesoide  $\gamma$ -Polyglutaminsäure zur abgeschleuderten Flüssigkeit keine weitere Präzipitation erreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich nun sagen, dass die serologischen Versuchsbefunde mit den chemischen Untersuchungsergebnissen über die Konstitution des immun-spezifischen, polypeptidartigen Haptens der Anthrax-Subtilis Bacillengruppe in vollem Einklang stehen. Überdies weisen diese Versuchsbefunde ein u.E. sehr interessantes Beispiel der Immunspezifität auf. Es ist nämlich aus den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen klar ersichtlich, dass die Reaktion des antikapsularen Anthraxantikörpers in bezug auf die Konstitution der Poly-glutaminsäuren strukturspezifisch ist, da von den letzteren nur  $\gamma$ -Poly-glutaminsäuren entsprechender Konfiguration eine serologische Aktivität zeigen, nicht aber  $\alpha$ - und  $\alpha\gamma$ -Poly-glutaminsäuren. Weiterhin ist diese Reaktion bis zu einer noch zu ermittelnden Grenze auch stereospezifisch, da von den  $\gamma$ -Poly-glutaminsäuren nur die  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure und die mesoide  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure serologisch aktiv sind, während die  $\gamma$ -Poly-L-glutaminsäure keine serologische Aktivität zeigt. Ob die geringere serologische Aktivität der mesoiden  $\gamma$ -Poly-glutaminsäure in der Tat auf ihre eigenartige Konstitution, d.h. auf die Anwesenheit von 50% von  $\gamma$ -L-Glutaminsäureresten zurückzuführen ist, muss noch durch weitere Untersuchungen überprüft werden, da die jetzt untersuchte Substanz einen viel grösseren Aminostickstoffgehalt (d.h. vermutlich ein viel geringeres Molekulargewicht) besass, als die  $\gamma$ -Poly-D-glutaminsäure.

#### METHODISCHES

Das zum Vergleich herangezogene Subtilis-Polypeptid wurde nach dem ursprünglichen Verfahren<sup>5</sup> isoliert.

Die Kaninchen-Immunsere wurden nach dem Verfahren von Tomcsik und Ivánovics<sup>2</sup> hergestellt. Eines dieser (Bezeichnung: P) war schon im Jahre 1940 hergestellt und seitdem aufbewahrt worden, während das andere (Nr. 46) unmittelbar vor Beginn dieser Untersuchungen hergestellt wurde. Die Pferde-Immunsere wurden vom Institut für Impfstoffherzeugung ("Phylaxia", Budapest) im Jahre 1940 hergestellt, und zwar durch Impfung von Pferden mit lebendigen, avirulenten, kapselbildenden Milzbrandbacillen.

Zwecks Ermittlung des Präzipitationstiters wurden aus der Lösung der zu testenden Substanz Verdünnungsreihen nach dem Prinzip der zweifachen Verdünnung bereitet und je 0,2 ml dieser Proben mit je 0,2 ml des 1 : 2 verdünnten Serums versetzt. Inkubation: 48 Stunden bei 4°.

Die serologischen Hemmungsreaktionen wurden der Ermittlung des Präzipitationstiters ähnlich durchgeführt. Proben einer der optimalen Präzipitation entsprechend verdünnten Lösung des Subtilis-Polypeptids wurden zuerst mit verschiedenen Mengen der zu prüfenden Poly-glutaminsäuren, dann mit dem Serum versetzt.

Die quantitativen Präzipitationsproben wurden folgendermassen durchgeführt: in einem abgekühlten Zentrifugenrohr wurden 1 ml Serum und 25  $\mu\text{g}$  der zu prüfenden Substanz in 1 ml Lösung gemischt das Gemisch 48 Stunden im Eisschrank aufbewahrt, dann das Präzipitat abgeschleudert und danach durch Aufschlännen und wiederholtes Abschleudern zweimal mit je 5 ml eiskaltem Salzwasser gewaschen. Der so

gewonnene Niederschlag wurde nach der Methode von Cleghorn und Jendrassik<sup>11</sup> aufgeschlossen und sein Stickstoffgehalt mit Nessler's Reagens durch drei Parallelbestimmungen ermittelt. Als Menge des präzipitierten Antikörpers wurde das Produkt Stickstoff  $\mu\text{g}$  6,25 bezeichnet.

Die Diffusion der Polypeptide wurde nach der Methode von Ouchterlony<sup>8</sup> in einem aus 1% Agar enthaltendem, abgepuffertem Salzwasser bereiteten Agargel untersucht. Die Ränder der das Serum bzw. die Lösung der zu testenden Substanz enthaltenden zwei Bohrungen hatten einen Abstand von 9 mm.

<sup>11</sup> R. A. Cleghorn und J. Jendrassik *Biochem. Z.* **274**, 189 (1934).