Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 282–286, Mai 1969

Beseitigung der Komplementfixierung von γ -Globulin durch chemische Modifizierung mit β -Propiolacton

Von W. STEPHAN

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt/Main
(Leiter: Privatdozent Dr. H. Determann)

(Eingegangen am 3. Januar 1969)

Die chemische Modifizierung von γ -Globulin mit β -Propiolacton beseitigt die in vitro-Komplementfixierung ohne Abbau des Moleküls. Die Eigenantigenität bleibt erhalten. Die eingeführten Gruppen erzeugen keine präzipitierenden Antikörper. Die Antikörpereigenschaften von Immun- γ -Globulin werden nicht verändert.

Elimination of complement fixation in γ -globulin by chemical modification with β -propiolactone

When γ -globulin is chemically modified by treatment with β -propiolactone, the ability to fix complement in vitro is lost, but the molecule is not degraded. The antigenic properties of the γ -globulin are unchanged. The introduced groups do not cause the formation of precipitable antibodies, and the antibody properties of the immuno- γ -globulin are unchanged.

Durch Fraktionierung hergestelltes γ -Globulin hat die Eigenschaft, Komplement zu fixieren (1). Es ist aus diesem Grunde nicht intravenös, sondern lediglich intramuskulär anwendbar (2). Da die Antikörper-Wirksamkeit aber bei i. v.-Applikation vollständiger ist und vor allem sofort eintritt, hat es nicht an Versuchen gefehlt, i. v.-verträgliche γ -Globulin-Präparate herzustellen.

Diese Verfahren beruhen darauf, daß das durch herkömmliche Fraktionierungsverfahren, wie COHN'sche Alkoholfractionierung und Rivanol-Ammoniumsulfat-Fraktionierung, gewonnene komplementfixierende γ -Globulin hydrolytisch in einzelne Fragmente gespalten und so die Komplementfixierung beseitigt wird. Da die Verweilzeit solcher Präparate im Organismus relativ gering ist (3), interessierte uns die Frage, ob es möglich ist, durch chemische Modifizierung des Serums vor der Fraktionierung das γ -Globulin so zu schützen, daß durch den Fraktionierungsvorgang keine komplementbindende Aktivität entsteht, ein Abbau also unnötig wird.

Zur Beseitigung der komplementbindenden Eigenschaft des γ -Globulins durch hydrolytischen bzw. enzy-

matischen Abbau werden im wesentlichen 3 Verfahren beschrieben:

Behandlung mit HCl bei pH 4 (4), Behandlung mit Plasmin (5) und die Beseitigung der Komplementbindung von aggregiertem γ -Globulin durch Pepsin (6). Gelchromatographisch zeigt sich nach dieser Pepsin-Behandlung von nach COHN hergestelltem γ -Globulin eine starke Aufspaltung des γ -Globulin-Moleküls (Abb. 1).

Man sieht, daß der die Komplementfixierung bewirkende hochmolekulare Anteil (Fraktion I (a)) durch die Pepsinbehandlung wesentlich vermindert wird. Dafür wird jedoch ebenfalls der Anteil des 7 S- γ -Globulins (Fraktion II (b)) reduziert: Es treten Bruchstücke auf, die im Molekulargewicht vergleichbar sind mit Albumin (Fraktion III), bzw. sogar noch ein niedrigeres Molekulargewicht als Albumin besitzen. Bei den Fraktionen IV und V (b) handelt es sich um Peptide. Eine andere Möglichkeit zur Beseitigung der Komplementfixierung von γ -Globulin besteht in der chemischen Modifizierung. Nach COHEN (7) verschwindet die

Abb. 1

Gelfiltration an Sephadex G-200 von γ -Globulin, hergestellt durch Alkoholfällung (links, a) und dem daraus hergestellten Pepsin-Abbauprodukt (rechts, b). (Auffrennung unter identischen Bedingungen siehe Versuchsteil)

Tab. 1
Komplementverbrauch von modifiziertem (II) und nicht modifiziertem (I) γ -Globulin
+: Titrationsstufen, in denen Komplement gebunden wird (keine Hämolyse).
—: Titrationsstufen, in denen kein Komplement mehr gebunden wird (vollständige Hämolyse)

Probe	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42
I	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
II	++	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NaCl-Kontr.	++	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Komplementfixierung von Antigen-Antikörperkomplexen, wenn man am γ -Globulin-Molekül die spezifischen Haftstellen für das Komplement chemisch verändert. Dies wird erreicht durch eine Benzylierung des Tryptophans und eine zusätzliche Imidoacylierung des Lysins.

Im Zuge von Untersuchungen der Eigenschaften modifizierter Plasmaproteine prüften wir, ob durch die Reaktion mit β -Propiolacton die komplementbindende Eigenschaft des γ -Globulins beeinflusst wird.

Fraktionierung von β -Propiolacton-modifiziertem Serum

Da bekannt ist, daß β -Propiolacton sowohl alkylierende wie acylierende Eigenschaften besitzt (8), je nachdem nach welcher Seite sich der gespannte 4-Ring öffnet,

konnte man erwarten, daß eine Vorbehandlung von Serum bzw. Plasma mit β -Propiolacton das γ -Globulin so schützt, daß das fraktionierte und isolierte γ -Globulin keine Komplementbindung bewirkt.

Wie schon an anderer Stelle (9) gezeigt wurde, kann man die Proteine des menschlichen Serums mit relativ geringen Mengen β -Propiolacton modifizieren, wenn man vor der Behandlung die Hydrolaseaktivität des Serums z. B. durch eine Adsorptionsbehandlung beseitigt, während die Behandlung von nicht adsorbierten Seren und Plasmen mit 0,3% β -Propiolacton die Proteine nicht verändert (10). Die chemische Modifizierung der Serumproteine gibt sich immunoelektrophoretisch durch eine Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zu erkennen (Abb. 2).

Abb. 2

Immunoelektrophoretische Auftrennung von Nativ-Serum (unten) und β -Propiolacton-modifiziertem Serum (oben)
Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Fraktioniert man nun ein derart modifiziertes Serum mit Rivanol-Ammoniumsulfat (11), so erhält man ein γ -Globulin (II), das zum Unterschied von dem nach der gleichen Methode aus dem nicht modifizierten Serum erhaltenen γ -Globulin (I) keine komplementbindende Eigenschaft besitzt (Tab. 1).

Die elektrophoretische Reinheit ergibt sich aus Tabelle 2 (Folienelektrophorese) und Abbildung 3 (Immunoelektrophorese).

Tab. 2
Quantitative Folienelektrophorese von modifiziertem (II) und nicht modifiziertem (I) γ -Globulin

Produkt	Proteinkonzentration (Relativprozente)				
	Albumin	α_1 -Globulin	α_2 -Globulin	β -Globulin	γ -Globulin
Ausgangsserum	62,5	4,4	8,0	9,5	15,6
I	0	0	0	3,8	96,2
II	0	0	0	1,0	99,0

Abb. 3

Immunoelektrophoretische Auftrennung von modifiziertem γ -Globulin (unten), aufgetragen gegen das Ausgangsserum (oben)
Darstellung mit Anti-Humanserum vom Pferd

Außerdem zeigt Abbildung 3 die durch die chemische Modifizierung bewirkte erhöhte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des isolierten γ -Globulins. Die gelchromatographische Auftrennung der Präparate I und II an Sephadex G-200 ergab ein identisches Bild. Es wurde jeweils nur eine Fraktion gefunden. Das Elutionsvolumen dieser Fraktion ist mit dem der zweiten Fraktion (Hauptbestandteil: 7 S γ -Globulin) eines Kontrollserums identisch (Abb. 4).

Umwandlung von komplementfixierendem in nicht komplementfixierendes γ -Globulin

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, enthält das nicht modifizierte γ -Globulin keine Aggregate, obwohl es Komplement massiv fixiert. Der Effekt der chemischen Modifizierung besteht also nicht darin, eine Aggregation zu verhindern, sondern offenbar darin, komplementbindende Gruppen des Nativ- γ -Globulins che-

Abb. 4

Gelfiltration an Sephadex G-200 von (a) nicht modifiziertem γ -Globulin, (b) modifiziertem γ -Globulin und (c) Kontrollserum (Auftrennung unter identischen Bedingungen, siehe Versuchsteil)

misch so zu verändern, daß keine Komplementbindung stattfinden kann.

Diese Vorstellung legt den Versuch nahe, durch nachträgliche β -Propiolacton-Behandlung von I dessen komplementbindende Eigenschaft zu beseitigen.

Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Befunde bestätigen, daß dies möglich ist.

Tab. 3

Komplementverbrauch von γ -Globulin (I) und daraus durch β -Propiolacton-Behandlung hergestelltem γ -Globulin (III)
 +: Titrationsstufen, in denen Komplement gebunden wird (keine Hämolyse)
 —: Titrationsstufen, in denen kein Komplement mehr gebunden wird (vollständige Hämolyse)

Meerschweinchen-Komplement (ml)	Probe		NaCl-Kontrolle
	I	III	
0,04	++++	++++	++++
0,06	++++	++++	++++
0,08	++++	++++	++++
0,10	++++	++++	++++
0,12	++++	++++	++++
0,14	++++	++++	++++
0,16	++++	+++	±
0,18	++++	±	—
0,20	++++	—	—
0,22	++++	—	—
0,24	++++	—	—
0,26	++++	—	—
0,28	++++	—	—
0,30	++++	—	—
0,32	++++	—	—

Nach diesen Ergebnissen, die die Herstellung eines nicht abgebauten, nicht komplementbindenden γ -Globulins ermöglichen, interessierten vor allem zwei Fragen:

Bleiben die Antikörper-Eigenschaften erhalten?

Wirken die durch Modifizierung mit β -Propiolacton eingeführten Gruppen antigen?

Antikörperaktivität und Immunogenität von β -Propiolacton-modifiziertem γ -Globulin

In vitro-Tests zeigten, daß durch chemische Modifizierung mit β -Propiolacton die Antikörper-Aktivität des γ -Globulins nicht signifikant verändert wird (Tab. 4).

Tab. 4
Antikörpertiter der 5proz. Lösungen von modifiziertem (II) und nicht modifiziertem γ -Globulin (I)

Produkt	Antikörper gegen		
	Polio II (Neutralisation)	Masern (Hämagglutinationshemmung)	Pocken-Vaccine (Hämagglutinationshemmung)
I	1:100	1:1024	1:32
II	1:200	1:1024	1:16

Antigenität des modifizierten γ -Globulins

Infolge der chemischen Modifizierung kann man z. B. folgende Strukturen erwarten:

Alkylierung des Histidins

Acylierung des Lysins

Da bekannt ist, daß man z. B. durch Immunisierung mit acetylierter Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) präzipitierende Antikörper gegen die eingeführte Gruppe erhält (12), hätte man auch von den durch β -Propiolacton-Behandlung in γ -Globulin eingeführten Gruppen immunogenes Verhalten erwarten können.

Immunisiert man Kaninchen intraplantar und intravenös mit modifiziertem γ -Globulin (II), so erhält man hochtitrige Seren, die im Ouchterlony-Test (13) sowohl mit modifiziertem γ -Globulin (II) als auch mit nicht modifiziertem γ -Globulin (I) präzipitieren. Es tritt jedoch keine Spornbildung auf (Abb. 5a). Adsorbiert man dieses Antiserum mit nicht modifiziertem γ -Globulin (I), so präzipitiert dieses adsorbierte Antiserum weder mit I noch mit II (Abb. 5b).

Aus diesen Befunden muß der überraschende Schluß gezogen werden, daß die Modifizierung des γ -Globulins

Abb. 5

Antigenes Verhalten des durch β -Propiolacton modifizierten γ -Globulins

- II: modifiziertes γ -Globulin
- I: nicht modifiziertes γ -Globulin
- G: anti-IgG
- M: anti-II
- MA: anti-II adsorbiert mit I

mit β -Propiolacton die antigenen Eigenschaften nicht verändert, obwohl die chemische Modifizierung so stark ist, daß die Eigenhemmung des γ -Globulins aufgehoben wird.

Beschreibung der Versuche

Modifizierung von Serum mit β -Propiolacton

100 ml Serum werden 4 Stdn. bei 25° mit 2 g Aerosil 380¹⁾ gerührt. Danach wird 25 Min. bei 5000 U./Min. zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das adsorbierte Serum wird bei Zimmertemperatur auf pH 8,0 eingestellt und 0,045 g β -Propiolacton/1 g Protein zugegeben. Man läßt 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen, stellt den pH-Wert auf 8,0 mit 1N NaOH ein und hydrolysiert das restliche β -Propiolacton bei 37°, indem man alle halbe Stunde den pH-Wert auf 8,0 nachstellt.

Rivanol-Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Das modifizierte bzw. das nicht modifizierte Serum wird mit physiol. NaCl-Lösung auf 3,0% verdünnt und auf pH 8,2 eingestellt. Zu 100 ml werden 0,84 g Rivanol unter Rühren zugegeben (Zweckmäßig werden bei der Verdünnung 10 ml physiol. NaCl-Lösung zurückbehalten und das Rivanol darin suspendiert.) Man rührt 30 Min. bei Zimmertemperatur, läßt 30 Min. bei 5° stehen und filtriert durch ein Faltenfilter. Danach werden zu 100 ml Filtrat 5 g festes NaCl zugegeben und die Lösung auf pH 7,0 eingestellt. Man rührt 1 Std. und zentrifugiert 10 Min. bei 5000 U./Min. Der Überstand wird durch ein Faltenfilter geklärt. Das Filtrat wird mit sterilem Wasser auf 0,3% Protein verdünnt. Zu 100 ml werden 31 g festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter Rühren bei pH 7,0

(pH nachstellen!) zugegeben. Man rührt 1 Std., läßt 16–20 Stdn. bei 5° stehen, saugt den Überstand weitgehend ab und zentrifugiert 20 Min. bei 5000 U./Min. Danach wird der Niederschlag in sterilem Wasser gelöst: 0,8 ml auf 1 g Ausgangsprotein und 24 Stdn. gegen 4 mal 2 / 0,7proz. Kochsalzlösung dialysiert. Die SO_4 -freie Lösung wird auf pH 7,1 eingestellt, auf 5,0% Protein verdünnt und durch Membranfilter (GS, RA, GF) steril filtriert. Ausbeute: etwa 5 ml 5proz. γ -Globulin-Lösung.

Behandlung von komplementfixierendem γ -Globulin mit β -Propiolacton

γ -Globulin-Lösung (Proteinkonzentration 7–10%) wird bei Zimmertemperatur auf pH 8,0 eingestellt und 0,045 ml β -Propiolacton pro 1 g Protein zugegeben. Man läßt 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen, dabei wird der pH-Wert alle 20 Min. auf 8,0 nachgestellt. Die Hydrolyse wird anschließend bei 37° durchgeführt, wobei man den pH-Wert alle 20 Min. nachstellt. Man dialysiert 20 Stdn. gegen physiol. NaCl-Lösung, zentrifugiert gegebenenfalls 10 Min. bei 5000 U./Min., stellt die Lösung auf 5,0% Protein ein und filtriert steril durch Membranfilter (Millipore: GSWP/RAWP/Glasfaser).

Pepsinabbau von γ -Globulin

50 ml einer 2proz. Lösung von γ -Globulin (Biglan-Chemie, Hamburg) in 0,9proz. NaCl-Lösung wurden bei pH 4,5 zusammen mit 1 mg Pepsin purum (Firma Roth, Karlsruhe) 40 Stdn. bei 37° erwärmt. Danach wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt, 48 Stdn. gegen 0,9proz. NaCl-Lösung dialysiert, zentrifugiert und steril filtriert.

Durchführung der Sephadex-Gelfiltration

Eine Sephadex-Säule (1 m lang, Durchmesser 25 mm) wird mit Sephadex G-200 in 0,1M Phosphatpuffer (pH 8,0) beschickt. Elution mit 0,1M Phosphatpuffer (pH 8,0).

Auftrennung der Proteinlösung:

Aufgetragen werden 5 ml Vollserum (Proteinkonzentration: 5%) bzw. 5 ml γ -Globulin (Proteinkonzentration: 2%), Tropfgeschwindigkeit: 15–20 ml/Std. Die Transmission wird im Uvicord (LKB-Stockholm) bei 254 nm gemessen.

Immunisierung

Es wurden jeweils 10 männliche Albino-Kaninchen (weiße Neuseeländer) zuerst intraplantar mit komplettem Freund'schem Adjuvans und nach 4 Wochen nach einer Desensibilisierung i. v. immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Antiseren entnommen. Als Nahrung diente das Standardfutter der Fa. Hope-Farms (Woerden, Holland).

Im einzelnen wurde wie folgt gearbeitet:

Aus 3,0 ml komplettem Freund'schem Adjuvans und 1,5 ml 0,9proz. NaCl-Lösung wurde mit einem Desintegrator eine stabile Emulsion hergestellt. Nach Zugabe von 1,5 ml des modifizierten γ -Globulins (etwa 2% Protein) wurde kräftig geschüttelt und kurz nachemulgiert.

Pro Tier wurde 1 ml dieser Emulsion (etwa 5 mg Protein) angewandt. Nach 4 Wochen bekam jedes Tier morgens 100 μg des modifizierten γ -Globulins i. m. und am Nachmittag 1 mg i. v. Nach 14 Tagen wurden die Antiseren entnommen.

Adsorption der Antiseren

Zu 10 ml Antiserum gegen das β -Propiolacton-modifizierte Human- γ -Globulin werden 5 ml einer 1proz. Lösung von nicht modifiziertem Human- γ -Globulin in 0,9proz. NaCl-Lösung gegeben. Man inkubiert 4 Stdn. bei 37° (pH 7,5). Anschließend läßt man über Nacht bei 5° stehen. Danach wird abzentrifugiert und gegebenenfalls sterilfiltriert.

Immunoelektrophorese

Es wurde wie üblich nach GRABAR in der Modifikation von SCHEIDEGGER (13) gearbeitet.

¹⁾ Degussa, Frankfurt.

Folgende Antiseren wurden verwendet:

Anti-Humanserum vom Pferd (Biotest-Serum-Institut, Frankfurt/Main), Anti-IgG vom Kaninchen (Behringwerke Marburg). Die Menge an Antiserum betrug zwischen 0,02 und 0,04 ml.

Ouchterlony-Test

Es wurden 3 ml 1proz. Agar in 0,15M Phosphatpuffer (pH 7,1) pro Objektträger angewandt. Die Antiseren wurden unverdünnt verwendet. Die Antigenkonzentration betrug etwa 0,02%. Diffusionszeit: 30 Std., Färbung mit Amidoschwarz.

Quantitative Eiweißelektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit der Einrichtung der Firma Camag (Berlin) durchgeführt.

Folie: Sephaphor III
Puffer: Tris-Barbiturat-Puffer pH 8,8
Proteinkonzentration: 2–3 g/100 ml
Auftrennung: 45 Min. bei 220 Volt
Färbung: Amidoschwarz
Entfärbung: Methanol/Eisessig 9 + 1 (v/v)

Transparent wird die Folie, wenn man sie luftblasenfrei auf Objektträger aufzieht und 5–10 Min. bei 60° trocknet.

Auswertung: Eppendorf-Photometer und -Schreiber, Handplanimetriergerät.

Komplementtitration

Zu jeweils 0,25 ml γ -Globulin-Lösung (5proz.) fügt man linear steigende Mengen an Meerschweinchen-Komplement (1:30) zu und ergänzt mit 0,9proz. NaCl-Lösung zu jeweils 1 ml, z. B.:

γ -Globulin (ml)	Komplement (ml)	NaCl (ml)
0,25	0,04	0,71
0,25	0,06	0,69
0,25	0,08	0,67
usw.		

Man inkubiert 1 Std. bei 37°, fügt 0,5 ml hämolytisches System zu, läßt 1 Std. bei 37° stehen und liest ab.

Das hämolytische System besteht aus gleichen Teilen Hammelerythrocyten (2%) und einer geeigneten, vorher ermittelten Ambozeptorverdünnung (z. B. 1:2000). Vor Anwendung läßt man das hämolytische System 1 Std. bei 37° stehen.

Herrn Professor Dr. G. MAY, Hygiene-Institut, Frankfurt (Main), danke ich für die Ausführung der serologischen Tests, Fräulein E. HAUG für die Durchführung der präparativen Arbeiten und Fräulein G. SCHULTE für die Ausführung der Immunisierungsversuche.

Literatur

1. BARANDUM, S., Die Gammaglobulin-Therapie. S. Karger Verlag, Basel (1964). — 2. JANEWAY, C. A., The Gamma Globulins. J. and A. Churchill Ltd., London (1967). — 3. RIVA, G., Helvet. med. acta 30, 286 (1963). — 4. BARANDUM, S. und P. KISTLER, Vox Sang. 7, 157 (1962). — 5. JANEWAY, C. A., E. MERLER, F. S. ROSEN, S. SALMON und J. D. CRAIN, N. England J. Med. 278, 17 (1968). — 6. SCHULZE, H. E. und G. SCHWICK, Deutsches Pat. 1148037 B 64 342 IV a/30 H. — 7. COHEN, S. und E. L. BECKER, J. Immunology Baltimore 100, 403 (1968). — 8. GRE-

SHAM, T. L., J. E. JANSON, S. W. SHAVER, J. T. GREGORY und W. N. BEEARS, J. Amer. chem. Soc. 70, 1004 (1948). — 9. STEPHAN, W. und L. RÓKA, diese Z. 6, 186 (1968). — 10. LO GRIPPO, G. A., Ann. N. Y. Acad. Sci. 83, 578 (1960). — 11. HOREJSI, J. und R. SMETANA, Acta med. Scand. 155, 65 (1956). — 12. RAJEWSKY, K., Biochim. biophysica Acta Amsterdam 121, 51 (1966). — 13. SCHEIDEGGER, J. J., Internat. Arch. Allergy 7, 103 (1955).

Dr. W. Stephan
Biotest-Serum-Institut GmbH
6000 Frankfurt (Main)
Flughafenstraße 4