

Wissenschaftliche Forschungsberichte

Naturwissenschaftliche Reihe Band XXX

**FORTSCHRITTE DER
SEROLOGIE**

VON

H. SCHMIDT

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBERICHTE

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNGSBERICHTE

NATURWISSENSCHAFTLICHE REIHE

HERAUSGEGEBEN VON

DR. RAPHAEL ED. LIESEGANG, FRANKFURT A. M.

BAND XXX

FORTSCHRITTE DER SEROLOGIE



1 9 3 3

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

FORTSCHRITTE DER SEROLOGIE

VON

HANS SCHMIDT

Dr. med. a. o. Prof. für Hygiene
Institut für exper. Therapie „Emil v. Behring“
Marburg a. L.

MIT 20 ABBILDUNGEN UND
MEHREREN TABELLEN



1 9 3 3

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

ALLE RECHTE VORBEHALTEN

Copyright 1933 by Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Ursprünglich erschienen bei Theodor Steinkopff Dresden und Leipzig 1933

Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1933

ISBN 978-3-662-30691-8

ISBN 978-3-662-30768-7 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-662-30768-7

ZWECK UND ZIEL DER SAMMLUNG

Nur sehr wenigen ist es möglich, das Wichtigste aus der Buch- und Zeitschriftenliteratur ihres Gebietes auf Grund eines Studiums der Originale zu verfolgen. Selbst das Durcharbeiten der verschiedenen Zentralblätter erfordert nicht allein viel Zeit, sondern auch ein gutes Wahlvermögen, denn Spreu ist vom Weizen zu sondern. Eine Auswahl des Wichtigsten in gedrängter Form zu bieten, was In- und Ausland seit etwa 1914 in jedem einzelnen Zweige der Naturwissenschaften geleistet hat, ist Zweck und Ziel dieser „Wissenschaftlichen Forschungsberichte“ (Naturwissenschaftliche Reihe).

Aber für gute Sammelreferate, bei welchen nicht etwa die Redaktionsschere die Hauptarbeit geleistet hat, und welche andererseits auch nicht in der Hauptsache aus Titelangaben bestehen, sind nicht leicht geeignete Verfasser zu finden, trotz des großen Nutzens, der dem Autor meist aus solch kritischer Bearbeitung des Fremden erwächst.

Erfreulicherweise hat sich dennoch eine Anzahl von Forschern bereit gefunden, dieses Werk auf ihrem Sondergebiet zu leisten, weitere werden folgen, so daß in Kürze ein Gesamtüberblick über die Fortschritte der Naturwissenschaften im letzten Jahrzehnt vorliegen wird.

Lehrbücher sollen hierdurch nicht ersetzt, sondern ergänzt werden. Die „Wissenschaftlichen Forschungsberichte“ lassen auch nicht die persönliche Meinung des Verfassers in den Vordergrund treten, sondern sie berichten von den sich oft widerstreitenden Meinungen verschiedener Forscher.

Eine entsprechende Reihe über die technischen Fortschritte („Fortschritte der chem. Technologie in Einzeldarstellungen“), herausgegeben von Prof. Dr. B. Rassow, erscheint im gleichen Verlag.

Der Verleger:
Theodor Steinkopff.

Der Herausgeber:
Raphael Ed. Liesegang.

VORWORT

Auf einem relativ kleinen Raume die Fortschritte der Serologie der letzten Jahre zu bringen, war entweder nur durch kurzes Referieren der sehr umfangreichen Literatur möglich, eine Arbeit, die ich aber in Anbetracht unserer vorzüglichen Referatenzeitschriften für überflüssig hielt, oder dadurch, daß eine gewisse Auswahl vorgenommen, diese aber in einen engeren Zusammenhang gebracht wurde. Ich habe letzteren Weg eingeschlagen. Um aber meinen verfügbaren Raum nicht zu überschreiten, habe ich alles, was mit der Immunität und Anaphylaxie zusammenhängt und somit auch viele Probleme der pathogenen Mikroorganismen eng berührt und einen gesonderten Band dieser Serie als „Immunitätsforschungsberichte“ erfordern würde, fortgelassen und mich nur auf die Serologie in engstem Sinne, d.h. auf die eigentlichen Reagenzglasphänomene beschränkt. Auch dann noch verbot der Raum alles zu bringen, so daß sicher Viele manches vermissen werden. Ich beabsichtigte aber kein Kompendium der Serologie zu schreiben, sondern habe mich bemüht, nur das Wesentliche zu bringen, dieses aber in geschlossenen Zusammenhängen, was wiederum mit sich brachte, manches längst bekannte zu berühren, und ferner nicht nur rein referierend, sondern mit persönlicher kritischer Einstellung und vielfach mit Hervorhebung des noch Problematischen. Ich bin mir dabei bewußt gewesen, daß viele Leser meinen Ansichten widersprechen werden, aber wenn aus diesem Widerstreit der Meinungen Anregungen zu weiterer Arbeit gerade über fundamentale Fragen der Serologie sich ergeben sollten, so ist damit der vernehmlichste Zweck dieses kleinen Buches erfüllt.

Marburg, im Dezember 1932.

Hans Schmidt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Das Antigen	1
Hapten-Schleppertheorie	4
II. Agglutination	9
A. Die physikalisch-chemischen Grundlagen	9
1. Die elektrische Ladung der Teilchen einer Suspension, spez. von Bakterien	10
2. Die Beeinflussung der Ladung	10
a) Beeinflussung der Ladung durch Elektrolyte	11
b) Beeinflussung der Ladung der Bakterien durch Änderungen (evtl. chemischer Art) der Bakterien-Grenzfläche	12
1. Einfluß von Nichtelektrolyten	12
2. Einfluß der Temperatur	13
c) Beeinflussung der elektrischen Ladung durch Adsorption von Stoffen (Eiweißen), Flockungsfähigkeit des Antigen-Antikörper-Komplexes	14
1. Wirkung der H-Ionen	15
2. Wirkung von Elektrolyten	17
3. Die Bedeutung von Serumeigenschaften für den Agglutinationsvorgang	20
4. Die Nichtagglutinabilität von Bakterien und die spontane Agglutination	21
B. Die immunbiologischen Grundlagen der Agglutination	22
1. Das Agglutinogen	22
a) Die qualitative Rezeptoren-Analyse	23
b) Die S- und R-Formen und die diphasische Variation	25
c) Die kritischen Arbeiten von Tulloch	27
d) Die Haptene der Bakterien (Lipoide und Polysaccharide)	31
e) Die antigenen Eigenschaften der Pneumokokkenkohlehydrate	38
f) Die funktionelle Neutralisation der Pneumokokken-Polysaccharide durch Antiserum	44
g) Zusammenhang von Polysacchariden mit den R- und S-Formen der Kolonien	47
2. Das Agglutinin	49
a) Normalagglutinine	49
b) Zusammenhang von Agglutination und Präzipitation	50
III. Die Hämagglutination	52
A. Die unspezifische Hämagglutination	53
I. Die Sedimentation der roten Blutzellen (Geldrollenbildung)	53
1. Ursache und Beeinflussung der Geldrollenbildung	53
2. Faktoren, die die Sedimentation der roten Blutzellen beeinflussen	55

II. Die Kälteagglutination	55
B. Die spezifische Hämagglutination.	59
1. Die menschlichen Blutgruppen	60
2. Entstehen der Agglutinogene und Agglutinine	61
3. Iso-Hämolyse, Iso-Präzipitine und Iso-Opsonine	63
4. Gruppenspezifische Eigenschaften anderer Zellen und Gewebe	64
5. Die Natur der A- und B-Substanzen	65
6. Immunisatorische Gewinnung gruppenspezifischer Agglutinine	67
7. Untergruppen	69
a) M-, N- und P-Rezeptoren	69
b) Untergruppen von A.	70
C. Das Thomsen'sche Phänomen	72
IV. Die spezifische Präzipitation	76
1. Die verschiedenen Erscheinungsformen der Präzipitation.	76
2. Die quantitativen Verhältnisse bei der Präzipitation.	77
3. Die Zusammensetzung des Präzipitates	80
4. Beziehung der Präzipitatzahl zum Antigen-Antikörper-Verhältnis	81
5. Antigen und Antikörper in der überstehenden Flüssigkeit.	83
6. Komplexität der Antigene	84
a) Gleichzeitiges Vorkommen von Antigen und Antikörper in vivo	84
b) Gleichzeitige Einverleibung verschiedener Antigene.	86
7. Die zur Präzipitation erforderlichen Mindestmengen an Antigen und Antikörper	86
8. Die Beteiligung verschiedener Antikörper bei der Präzipitation	87
9. Physikalische Einflüsse auf die Präzipitation.	88
a) Die H-Ionen-Konzentration	89
b) Die Temperatur	89
c) Die Verdünnung	89
d) Einfluß von Elektrolyten	90
10. Beziehung zwischen Präzipitation und Komplementbindung	90
V. Das Komplement	93
1. Allgemeine Eigenschaften des Komplements	94
2. Die Zerlegung des Komplementes in Einzelkomponenten.	94
3. Erklärungsversuche	96
4. Untersuchungen an Meerschweinchen mit angeborenem Komplementmangel	98
5. Zusammenhänge zwischen Komplement und Blutgerinnung	100
VI. Die Hämolyse	103
I. Die unspezifische Hämolyse	103
Die Kieselsäurehämolyse	105
Die Tanninhämolyse	106
II. Die spezifische Hämolyse.	106
a) Der Lösungsvorgang der roten Blutzellen	106
b) Die Hämolyse-Komplementverbindung	107

1. Die Reihenfolge der Einwirkung	107
2. Die Spezifität des Komplementes	108
c) Die quantitativen Beziehungen zwischen dem hämolysierenden Antikörper und dem Komplement	109
d) Faktoren, die die spezifische Hämolyse beeinflussen	110
1. Einfluß der Elektrolyte des Mediums	110
2. Einfluß der Temperatur auf die spezifische Hämolyse	111
3. Einfluß von Eiweißzusatz auf die spezifische Hämolyse	112
e) Spezifische Hämolyse ohne Komplement (Hämotoxin).	113
III. Das Hämolysin	114
a) Immunisatorische Erzeugung	114
b) Bindung und Dissoziation des Hämolysins.	115
Reindarstellungsversuche.	115
c) Natur der Hämolysine und Art ihrer Bindung	117
VII. Die Komplementbindung und Komplementablenkung.	118
VIII. Die Wassermann'sche Reaktion	121
a) Der alkoholische Organextrakt als Antigen	123
b) Die Komplementbindung	132
c) Die Rolle des Cholesterins	134
d) Der Antikörper bei der Wa. R.	136
e) Einiges zur Methodik	145
XI. Hemmungszonen bei serologischen Reaktionen	146
a) Zonenbildung bei der Komplementbindung	146
b) Hemmungszone bei der Agglutination und Präzipitation	148
X. Die Phagozytose	151
Opsonine und Tropine	151
XI. Bakterizide und bakteriolytische Antikörper	156
Bakterizidie ohne Komplement	159
XII. Toxine und Antitoxine	161
1. Die Toxin-Antitoxinbindung	161
2. Die Natur der T. A.-Flockung	170
XIII. Über die Rolle der Lipide für serologische Reaktionen	174
XIV. Der Antikörper	179
Sachregister	187

I. Das Antigen.

Auch heute kann man „Antigen“ noch nicht besser definieren als eine Substanz, die spezifische Antikörper erzeugen kann, wobei der Begriff „Antikörper“ in engerem Sinne die bisher von Globulin nicht trennbare Eigenschaft bedeutet, in mehr oder weniger spezifischer Weise mit dem homologen Antigen Reaktionen zu geben, die wir als Antigen-Antikörper oder abgekürzt als A. A.-Reaktionen bezeichnen. Fermente, wie sie nach Injektion von Kohlehydraten oder Fetten auftreten können, sind daher von den Antikörpern zu trennen. Die A. A.-Reaktionen beruhen auf spezifischer Bindung von Antikörper an Antigen und können je nach Art des Antigens und des Milieus sich verschieden äußern, so daß wir unterscheiden: Präzipitation und Agglutination, Komplementbindung, Giftneutralisation, Zellauflösung, Phagozytose und Anaphylaxie-erzeugung.

Wenn wir auch den Antigenbegriff nicht anders definieren können als durch den Antikörper und letzteren nur durch seine Eigenschaften, mit Antigen zu reagieren, so kennen wir doch eine Reihe von Merkmalen, die ein Antigen notwendig haben muß, wenn auch andererseits eben diese Merkmale nicht hinreichen, um ein Antigen eindeutig zu charakterisieren. Diese notwendigen, aber nicht hinreichenden Merkmale sind folgende:

Ein Antigen muß löslich sein. Das Molekül muß eine gewisse Größe (Mizellencharakter) haben. Das bisher als unbedingt notwendig erachtete Merkmal, daß, um Antikörper zu erzeugen, ein Antigen unbedingt Eiweiß enthalten muß, während zur Bindung von Antikörpern auch Nichteiweißantigene befähigt sind, kann heute nicht mehr aufrecht erhalten werden, wenn es allerdings auch für alle natürlich vorkommenden Antigene seine Gültigkeit behält.

Aber von diesen rein physikalisch-chemischen Bedingungen ist die antigene Wirkung nicht allein abhängig, sondern es muß eine gewisse biologische Beziehung zwischen dem antigenen Stoff und dem Organismus bestehen, z. B. Artfremdheit. Trotzdem ist letztere bekanntlich kein unbedingtes Postulat für die antigene Wirkung, denn auch artgleiche Stoffe können antigen sein für einen Organismus, der sich gruppen- oder typenspezifisch von dem Organismus unterscheidet, der das Antigen liefert. Ein Beispiel dafür ist die Bildung von Isoantikörpern mit Ziegenblutzellen (*Ehrlich* und *Morgenroth* 1900).

Von der größten Bedeutung für die antigene Wirkung einer Substanz ist es, ob dieselbe in dem Organismus, dem sie eingeführt werden soll,

normal vorhanden ist oder nicht. Das Antigen muß körperfremd sein (*Doerr*). Blutfremdheit allein, wie es *von Dungern* und *Hirszfeld* annehmen, scheint nicht genügend zu sein.

Eine scheinbare Ausnahme bilden die Autohämolyse bei der paroxysmalen Hämoglobinurie. Aber hier kommt eine A. A.-Reaktion nicht unter physiologischen Verhältnissen, sondern nur bei niedriger Temperatur zustande (*Landsteiner* und *Donath*). Bei den scheinbar gelungenen Versuchen, mit Isoorganbestandteilen Antikörper zu erhalten, ist zu beachten, daß die chemischen und physikalischen Eingriffe, die zur Gewinnung des antigenen Substrates aus den Organzellen dienen, sehr leicht eine Spezifitätsänderung bewirken können (*Centanni*), die eine Körperfremdheit zur Folge haben kann; auch kann eine bakterielle Verunreinigung den Organauszügen neue Spezifitäten verleihen, ja unter Umständen durch ihr Bakterieneiweiß Haptene komplettieren (*Doerr* und *Hallauer*). Wir müssen also vorderhand an der Körperfremdheit als eine wesentliche Bedingung der antigenen Wirkungsmöglichkeit festhalten. (Eine Ausnahme macht das Linseneiweiß).

Besonders wichtig ist zu beachten, daß die natürlichen Antigene stets zusammengesetzter Natur sind und eine Vielheit von Partialantigenen enthalten. Einige darunter könnten Haptene sein, die isoliert mit Antikörpern reagieren können, so daß es den Eindruck machen kann, als könnte eine Substanz mit Antikörpern reagieren, die von der ursprünglichen antigenen Substanz ganz verschieden ist. Die Unkenntnis dieser Beziehungen hat zu vielen Mißverständnissen geführt, bis diese für unsere Erkenntnis der Spezifität so wichtigen Tatsachen durch *Landsteiner* 1921 und *Landsteiner* und *Simms* 1923 bekannt wurden.

Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, den Begriff des Antigens unterzuteilen und schärfer zu differenzieren. Naturgemäß haben alle Untersuchungen über die Natur der Antigene auch der Erforschung der Frage der Spezifität gedient, denn wenn wir Antigene als Stoffe, die Antikörper erzeugen, definieren, dann liegt in dieser Definition implizite der Begriff der Spezifität, ohne den man den Antikörper nicht in immunbiologischem Sinne definieren kann.

Nun haben *Obermayer*, *Pick*, *Landsteiner*, *Wells* u. a. zeigen können, wie durch physikalisch-chemische Eingriffe z. B. Kochen, sowie durch rein chemische Eingriffe in die Konstitution des Eiweißkörpermoleküls, z. B. Diazotieren, die antigene Spezifität verändert werden kann, daß unter Umständen sogar der ursprüngliche Artcharakter des Eiweißes verloren und eine neue hochgradige Spezifität — durch Präzipitation *in vitro* wie auch durch Anaphylaxie *in vivo* nachweisbar — erworben werden kann. Gegenüber *Landsteiner's* Ansicht, daß bei der Chemospezifität der Komplexantigene die Einführung neuer Gruppen in das Molekül das wesentliche ist, haben später *A. Klopstock* und *G. E. Selter*¹⁾

¹⁾ *A. Klopstock* und *G. E. Selter*, Ztschr. Immunitätsforsch. 63, 463 (1929), daselbst frühere Literatur.

gezeigt, daß es auch durch eine bloße Mischung, z. B. eines Diazoniumkörpers mit Blutserum, gelingt, ein für Diazo-eiweiß chemo-spezifisches Antigen herzustellen.

Sehr wichtig war die Feststellung von *Landsteiner*, daß gegen Diazo-eiweiß gerichtetes Immuserum (von Kaninchen mit diazotiertem Hühner-eiweiß hergestellt) auch mit diazotierten chemischen Substanzen spezifisch reagiert, selbst wenn diese wegen Kleinheit der Moleküle zur sichtbaren Präzipitation nicht mehr befähigt sind. Er bediente sich dabei der sog. Hemmungsreaktion von *Landsteiner* und *Halban*, für die folgendes Beispiel typisch ist:

0,2 $\frac{1}{500}$ diazotiertes Hühnereiweiß + 0,1 ccm diazotierte Seidenpeptonlösung + 2 Tropfen des Kaninchenserums	0,2 ccm idem. + 0,1 ccm 1proz. NaCl-Lösg. + 2 Tropfen idem.
keine Präzipitation, weil hier das spezifische Antigen in Form von diazotiertem Eiweiß im Überschuß vorhanden war.	deutliche Präzipitation

So gelang es nachzuweisen, daß selbst relativ kleine Moleküle, wie z. B. Tyrosin, wenn mit diazotierter Metanilsäure gekuppelt, die spezifische Azoproteinpräzipitationsreaktion aufheben und somit eine spezifische A. A.-Reaktion eingehen können.

Auf Grund dieser Erkenntnisse, daß Immusera, die mit einem veränderten Eiweißantigen dargestellt sind, auch in vitro mit niedrig molekularen Körpern, die als solche keine Antikörper erzeugen können, dann reagieren können, wenn diese die gleiche chemische Veränderung aufweisen, und auf Grund der Lipoid- (nicht Eiweiß-) Natur mancher Invitroantigene hat man die Antigene unterschieden in:

Vollantigene, z. B. genuines Eiweiß; Mikrobenleiber, bakterielle Toxine (?) usw.

Haptene, das sind relativ niedermolekulare Stoffe, die selbst keine Antikörper erzeugen können, wohl aber sich mit Antikörpern spezifisch binden. Dazu sollen Lipide gehören¹⁾, ferner Kohlehydrate aus Bakterien (Pneumokokken); das *Forssman'sche* Antigen. Semi-Haptene nennt *Sachs* Stoffe, die auch in vitro keine Bindungsfähigkeit mehr haben, aber durch verschiedene Stoffe, die wahrscheinlich den Dispersitätsgrad ändern, wieder zu Haptenen gemacht werden können.

¹⁾ Auch mit dem synthetischen Lipoid von *Grün* und *Limpächer* gelang es *Weil* und *Besser* (Klin. Wschr. 1931, 1941; Ztschr. Immunitätsf. 76, 76, 1932) Lipoidantikörper zu erhalten. Cholesterinantikörper wurden von *Sachs* und Mitarbeiter (Dtsch. med. Wschr. 1925, Nr. 25; Biochem. Ztschr. 159, 491, 1925) hergestellt und Ergosterinantikörper von *Berger* und *Scholer* (Klin. Wschr. 1932, 158; Ztschr. Immunitätsf. 76, 16, 1932).

Komplettiert wird ein Hapten bezeichnet, wenn es mit einem Vollantigen (z. B. Schweineserum) vereinigt wird. Dann vermag der vereinigte Komplex Antikörper hervorzurufen, und zwar sowohl Antikörper gegen das betreffende komplettierende Vollantigen, wie auch gegen das komplettierte Hapten.

Komplex wird ein Hapten bezeichnet, wenn es durch chemische Reaktionen unter Änderung des Gefüges und damit auch der Spezifität der betr. Eiweißmizelle in bestimmte Stellen des Eiweißmoleküls eingeführt wird. Die damit erzeugten Antikörper reagieren spezifisch mit dem eingefügten Haptenkomplex (Beispiel: Diazotierte Eiweißkörper).

Hapten-Schlepper-Theorie.

Bei dieser Einteilung der Antigene können wir zunächst von der Annahme ausgehen, daß Eiweiß ein Vollantigen ist, aber dürfen wir umgekehrt sagen: Ein Vollantigen muß Eiweiß enthalten? Die bisherigen Erfahrungen schienen in der Tat diese Frage zu bejahen, insofern Haptene wie Bakterienpolysaccharide und Lipide allein keine Antikörper zu bilden schienen, wohl aber und nur, wenn mit Eiweiß kombiniert (*Pick* und *Schwarz* 1909, *Landsteiner*, *Sachs*). *Sachs* und seine Mitarbeiter nehmen an, daß Lipide allein deswegen keine Antikörperbildung hervorrufen, weil sie von körpereigenen Proteinen umhüllt werden und dadurch ihrer Antigenfunktion verlustig gehen. Artfremdes Eiweiß, z. B. aus Schweineserum¹⁾, wirkt als Schlepper, weil es in der Invitromischung die Lipidteilchen umhüllt, so daß bei der immunisierenden Einspritzung der Komplex zunächst wie artfremdes Eiweiß wirkt. Dies macht es verständlich, warum die getrennte Einspritzung von Schweineserum und Lipoid bei z. B. Kaninchen keine Antilipide erzeugt, sondern nur die Mischung.

Diese Hapten-Schlepper-Theorie ist aber in dieser Form nicht haltbar. Zunächst muß die Annahme, daß Haptene wie z. B. Polysaccharide allein keine Antikörper erzeugen können, eingeschränkt werden in dem Sinne, daß sie zwar keine Antikörper bilden können, die mit den in vitro erkennbaren A. A.-Reaktionen nachweisbar sind, also z. B. keine Präzipitine, Agglutinine und komplementbindende Antikörper, aber doch spezifische Antikörper, die sich aber dem üblichen Nachweisverfahren entziehen. Wie auf S. 39 ausgeführt, sind Mäuse, die mit Pneumokokkenpolysacchariden behandelt sind, gegen die Infektion mit dem homologen Pneumokokkentypus geschützt. Sie enthalten also zweifellos Antikörper, wenn

¹⁾ Nach *E. Fränkel* und *L. Tamari* (Klin. Wschr. 1927, 2473) geht Schweineserum seiner Fähigkeit, als Schlepperantigen zu dienen, durch eine Spur Alkali verlustig (vielleicht weil dadurch die Adsorptionsfähigkeit seiner Globuline herabgesetzt wird).

diese auch nicht in vitro nachweisbar sind. Wir dürfen nicht vergessen, daß wir nur eine begrenzte Zahl von Nachweisverfahren für Antikörper haben, und daß alle diese Verfahren die Anwesenheit solcher Antikörper voraussetzen, die an relativ labile oder relativ lyophile Globuline gebunden sind, und daß alle Invitroverfahren versagen können, wenn der Antikörper ausschließlich an stark lyophiles Pseudoglobulin gebunden ist, wie z. B. Antitoxine. Analog könnten auch Polysaccharide hochlyophile Antikörperglobuline bilden, die zu keiner in vitro (auf Adsorptionsvorgängen beruhenden) Antigen-Antikörperreaktion mehr fähig sind, und es muß überhaupt zur Diskussion gestellt werden, ob bei der Immunisierung eines Kaninchens mit z. B. Eiweiß das gebildete Präzipitin der einzige Antikörper ist, der erzeugt wird, wenn es auch bisher der einzige ist, den wir mittels Präzipitation, Komplementbindung usw. nachweisen können.

Bei der Immunisierung mit reinen Lipiden hindert uns zunächst nichts anzunehmen, daß analoge Verhältnisse vorliegen, daß also ein Lipidantikörper gebildet wird, den wir nur deswegen nicht nachweisen können, weil er an hydrophiles Pseudoglobulin gebunden ist und weil auch sonst wegen fehlender primärer Toxizität des Lipoids eine Schutzwirkung beim Tier nicht wie bei Antitoxinen nachzuweisen ist.

Nun könnte man einwenden, daß das Toxin ja kein Hapten, sondern ein Vollantigen ist, aber das dürfte noch zu beweisen sein. Vielleicht sind die reinen bakteriellen Toxine bei manchen Arten (Di., Tet., Botulinus) Haptene, die¹ zusammen mit Bakterieneiweißstoffen erst antigenen Charakter haben, bei anderen bakteriellen Toxinen, die man als Endotoxine zu bezeichnen pflegt, ist das Bakterieneiweiß selbst toxisch, und solche Giftstoffe leiten ohne scharfe Grenze zu den Toxalbuminen über, die wie z. B. Ricin, Abrin, Schlangen- und Pilzgifte Vollantigene sind. Jedenfalls steht fest, daß Haptene allein Antikörper bilden können.

Und nun kommen wir zu dem zweiten Punkt, weswegen die bisherige Hapten-Schlepper-Theorie nicht haltbar zu sein scheint. Die Annahme, daß nur Eiweiß ein Hapten zum Vollantigen machen kann, ist hinfällig. Es gelang *Zozoya* (S. 42), durch Bindung von N-freien Polysacchariden an Kollodiumteilchen dieselben soweit antigen zu machen, daß Antikörper gebildet wurden, die in vitro mittels Präzipitation nachweisbar waren. *P. Gonzalez* und *M. Armangué*¹⁾ erzielten bei Kaninchen durch Immunisierung mit an Kaolin adsorbierten Lipiden aus Pferdenieren (*Forssman*'sches Antigen) die Bildung von Hammelbluthämolytinen. Ferner gelang es *H. Schmidt* in noch unveröffentlichten Versuchen durch Adsorption von Lipoid an Kollodiumteilchen bei Kaninchen Lipidantikörper zu erzeugen, die spezifische Komplementbindung gaben. Dabei ist Kollodium selbst eine Substanz, die nachweislich keine antigene Fähigkeit besitzt.

¹⁾ *Gonzalez* und *Armangué*, Compt. rend. Soc. Biol. 106, 1006 (1931).

Das Kolloidium hat also hier die Rolle des Eiweißes übernommen, um im Bilde zu bleiben, als Schlepper gewirkt. Jedoch ist ein sehr wichtiger Umstand zu beachten. Wird ein Lipoid mit Schweineserum versetzt, so bildet das Lipoid das Adsorbens, um das sich eine Eiweißhülle bildet, während im Falle des Kolloidiums dieses das Adsorbens ist, an das sich das Polysaccharid bzw. das Lipoid bindet. In letzterem Falle befinden sich also die immunisierenden Stoffe bildlich gesprochen in der Außenschicht des Komplexes und die ganze Komplexbildung hat anscheinend nichts anderes bewirkt, als die Antigenmizelle zu vergrößern. Es sieht so aus, als käme diesem Umstand eine große Bedeutung zu. Allgemein kann man sagen, daß mit der Abnahme der Molekulargröße von z. B. Eiweißkomplexen der Antigencharakter verloren geht, wobei allerdings zu beachten ist, daß damit auch eine Strukturänderung verbunden ist, über deren Einfluß auf die Antigenbefähigung wir außer der Feststellung eines solchen Einflusses nichts genaueres sagen können. Niedere Eiweißbaustoffe, Albumosen und Peptone wirken nicht mehr antigen, noch vermögen sie mit dem Präzipitin, das immunisatorisch mit dem nativen Eiweiß erhalten wurde, in eine in vitro als Präzipitation erkennbare Reaktion zu treten, wohl aber, wenn die Spaltprodukte zu größeren molekularen Verbänden resynthetisiert wurden (*V. Knaffl-Lenz* und *E. P. Pick*). Trotzdem kann sich aber, wie der Hemmungsversuch von *Landsteiner* und *Habban* zeigt, auch mit relativ kleinen Molekülen eine spezifische A. A.-Reaktion abspielen, wobei zu beachten ist, daß ein Stoff wohl Antikörper in vitro binden kann, ohne befähigt zu sein, in vivo solche zu bilden. *Zinsser* u. a. haben schon früher angenommen, daß eine Substanz unter anderem deswegen antigene Fähigkeit hat, weil seine Molekülgröße keine Diffusion in das Innere von Zellen zuläßt, daher die Abwehr des Organismus in die Zellwand resp. außerhalb der Zelle verlegt wird, was die Bildung von im Blute nachweisbaren Antikörpern mit sich bringt. Jedenfalls liegt dieser Vorstellung der Gedanke zugrunde, daß die Größe der Mizelle für ihre antigene Funktion maßgeblich ist.

Bekannt ist die Bedeutung der mizellaren Größe für die Art der A. A.-Reaktion in vitro. Man denke nur an die Rolle des Dispersitätsgrades der Extraktverdünnung bei der Wassermann'schen Reaktion. Tuberkulinlösung gibt keine Komplementbindung mit Antikörpern, die mittels vollantigenen Tuberkelbazillen hergestellt sind, wohl aber, wenn das gleiche Tuberkulin an eine feste Phase adsorbiert in Suspension vorhanden ist.

Nun haben wir gesehen, daß Polysaccharide allein Antikörper erzeugen können, die aber in vitro nicht nachweisbar sind, und daß dieselben Polysaccharide, wenn ihre mizellare Struktur durch Adsorption an Kolloidiumteilchen eine gewisse Vergrößerung erfahren haben, auch Antikörper erzeugen können, die aber diesmal in vitro nachweisbar sind.

Sind das nun verschiedene Antikörper oder der gleiche, der aber nur an verschiedenem Globulin gebunden ist, im ersten Falle an lyophiles, im zweiten Falle an relativ lyophobes Globulin? Das würde, wenn man das letztere annimmt, bedeuten, daß, je größer die Antigenmizelle ist, desto mehr relativ hydrophobes, labiles Immunglobulin gebildet wird, und je kleiner sie ist, desto mehr lyophiles Immunglobulin.

Verfasser hat daraufhin Versuche unternommen durch intravenöse Injektion von Formoltoxoid allein und an Kolloidium gebunden, Antitoxine bei Kaninchen zu erzeugen, und die so erhaltenen Antisera einer Eiweißfraktionierung unterworfen. Die Versuche sind zwar noch nicht abgeschlossen, erlauben aber, soweit Ergebnisse vorliegen, den Schluß zu ziehen, daß das gleiche Formoltoxoid an Kolloidium gebunden mehr Antitoxin, welches an Euglobulin gebunden ist, zu erzeugen scheint als das Formoltoxoid allein.

Wenn also, wie wir gesehen haben, der Satz, daß jedes Vollantigen unbedingt Eiweiß enthalten muß, nicht ohne Einschränkung zutrifft, so gilt das gleiche auch umgekehrt, insofern nicht jedes Eiweiß ein Antigen ist, wenn auch hier, wie schon oben bemerkt, zu berücksichtigen ist, daß es Antikörper geben kann, die wir noch nicht nachweisen können.

Soweit wir heute sagen können, muß ein Eiweiß, damit es ein Antigen ist, noch einige Bedingungen erfüllen.

1. Das betreffende Eiweiß muß aromatische Gruppen enthalten. Fehlen diese, wie z. B. bei Gelatine, dann fehlt trotz seines Eiweißcharakters die antigene Fähigkeit (der Gelatine fehlt Tryptophan und Tyrosin; sehr gering vorhanden ist Phenylalanin).

2. Das Eiweiß muß löslich sein. Die durch Hitzeoagulation geschaffenen Veränderungen sind z. T. reversibel. Ist aber durch eine komplette irreversible Denaturation das Eiweiß unlöslich geworden, dann ist auch die antigene Wirkung verschwunden.

3. Aber auch gelöstes Eiweiß ist nur dann antigen, wenn es im intermediären Stoffwechsel abbaufähig ist. Dies ist nicht mehr der Fall, wenn unter dem Einfluß von Alkalien durch eine Enolisierung das Protein racemisiert und für proteolytische Fermente unangreifbar wird. So sehr die Tatsache, daß racemisierte Eiweiße nicht mehr antigen wirken, für den Zusammenhang von Antigenwirkung und Struktur spricht, so wenig darf man auf den Umstand, daß solche Stoffe nicht durch Trypsin angreifbar sind, ein Postulat für die Antigenwirkung ableiten, denn *Landsteiner's* azetylierte Eiweißkörper waren trotz Unangreifbarkeit durch Trypsin doch Vollantigene.

Man sieht daraus, daß man selbst bei einem Stoff, der in chemischem Sinne ein Eiweißkörper ist, nicht unbedingt seine antigene Fähigkeit voraussetzen darf. Alle natürlichen Antigene sind Gemische aus Eiweißen, Lipoiden, Kohlehydraten, Fetten usw. Befreit man solche von Eiweißen, dann ist immer zu beachten, daß wir biologisch noch Eiweiß nachweisen können, wo selbst die empfindlichsten chemischen Nachweisverfahren versagen. Welche geringe Eiweißmenge noch antigen wirken kann, geht aus den Angaben S. 86 hervor. Ferner ist im Auge zu behalten, daß die Trennungs-

methoden von z. B. Lipoid und Eiweiß, Kohlehydrat und Eiweiß, stets für das Eiweiß schwere Eingriffe darstellen, die dessen Struktur und damit Spezifität ändern können, und dazu kommt noch die Gefahr bakterieller Verunreinigung, die durch das Bakterieneiweiß eine Komplettierung an und für sich haptener Stoffe zur Folge haben kann.

Alle diese vielen Schwierigkeiten haben es mit sich gebracht, daß wir noch nicht die Bedingungen fixieren können, die notwendig und hinreichend sind, um den Antigenbegriff definieren zu können. So bleibt zunächst nichts anderes übrig, als die Vielheit der biologischen Stoffe auf ihre antigene Wirkung einzeln zu untersuchen. Über alle diese bisherigen Untersuchungen unterrichtet u. a. besonders die zusammenfassende Darstellung über die Biochemie der Antigene und Antikörper von *E. P. Pick* und *F. Silberstein*¹⁾ sowie das kürzlich erschienene Buch von *O. Thomsen*²⁾, woselbst ausführliche Literaturangaben zu finden sind.

Wir sind daher nach wie vor darauf angewiesen, die antigene Fähigkeit eines Stoffes durch die damit erzeugten Antikörper nachzuweisen, die mit dem Antigen eine Reihe von in vitro erkennbaren Reaktionen eingehen, sowie auch im lebenden Tiere durch den passiven und aktiven Überempfindlichkeitsversuch nachgewiesen werden können. In vitro können wir das Antigen durch den Antikörper sichtbar ausflocken und selbst, wo diese Ausflockung unterbleibt, durch die Komplementbindung den Nachweis der A. A.-Reaktion erbringen. Ferner ist der Phagozytoseversuch imstande, besonders bakterielle Antikörper nachzuweisen. Wenn dabei auch lebende Zellen benutzt werden, so ist doch die eigentliche, sich dabei abspielende A. A.-Reaktion ein in vitro vor sich gehender Vorgang, während bei dem Anaphylaxieverfahren die A. A.-Reaktion im lebenden Organismus stattfindet und deren Ablauf aus Symptomen geschlossen wird, die im ganzen einer restlosen Erklärung größere Schwierigkeiten entgegenbringen als die reinen in vitro Phänomene.

Nun kann man bekanntlich mit einem bestimmten Antigen Antikörper erzeugen, die sowohl als Präzipitine, Agglutinine, Lysine, Opsonine als auch im anaphylaktischen Versuch nachweisbar sind, und die heute noch offene Frage ist, ob es sich dabei um einen Antikörper handelt oder um verschiedene, die zu gleicher Zeit im Tierkörper gebildet werden. Wir werden, wenn wir diese Reaktionen im einzelnen besprochen haben, auf diese Frage, die zugleich eine solche nach der Natur des Antikörpers ist, zurückkommen.

¹⁾ *E. P. Pick* und *F. Silberstein*, Handb. d. pathog. Mikroorganismen, III. Aufl. Bd. II (Jena 1928).

²⁾ *O. Thomsen*, Antigens in the light of recent investigations (Kopenhagen 1931).

II. Die Agglutination.

Physikalisch-chemisch betrachtet ist die Agglutination eine Koagulation von Suspensionen und die Präzipitation eine solche von kolloiden Lösungen. So wenig man kolloidchemisch genötigt ist, diese Koagulationsvorgänge gesondert zu behandeln, da sie prinzipiell auf den gleichen Vorgängen beruhen, so wären auch hier Agglutination und Präzipitation im Zusammenhang darzustellen, da der wesentliche Unterschied nur in der Größe der Teilchen der präzipitierten Phase liegt. Trotzdem wollen wir aus Zweckmäßigkeitsgründen hier zunächst nur die Agglutination und in einem späteren Abschnitt die Präzipitation gesondert erörtern.

Die Teilchen, die bei der hier zu besprechenden Agglutination in Betracht kommen, sind Zellen, von denen Bakterien und Blutzellen nur Sonderfälle darstellen. In Anbetracht der Bedeutung, die die Hämagglutination als solche und im Zusammenhang mit der Blutzellensenkung gewonnen hat, wird der Hämagglutination ein besonderer Abschnitt gewährt. Hier soll nur die Bakterienagglutination als Sonderfall der Zellagglutination besprochen werden. Bei der spezifischen Zellagglutination der Serologie ist es zweckmäßig, zwischen zwei Vorgängen zu unterscheiden, und zwar dem rein physikalisch-chemischen Vorgang der Agglutination und der diesem Vorgang zugrunde liegenden spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, und deswegen sollen zunächst die rein physikalisch-chemischen Grundlagen der Zellagglutination besprochen werden, wobei das Agglutinin zunächst als ein bezüglich des Antigens in spezifischem Sinne verändertes Serumglobulin aufgefaßt wird.

A. Die physikalisch-chemischen Grundlagen der Agglutination.¹⁾

Unter normalen Verhältnissen ist eine Bakteriensuspension stabil. Die Bakterien nähern sich durch Eigenbewegung oder durch Brown'sche

¹⁾ *I. G. Fitzgerald* und *D. T. Fraser*, Bacterial agglutinins and their applications; *Jordan* und *Falk*, The newer knowledge of Bacteriology and Immunology (Chicago 1928), 811. — *G. H. Bailey*, The functional role of agglutinins; *Jordan* und *Falk*, The newer knowledge of Bacteriology and Immunology (Chicago 1928), 802. — *J. H. Northrop*, The mechanism of agglutination; *Jordan* und *Falk*, The newer knowledge of Bacteriology and Immunology (Chicago 1928), 782. — *R. E. Buchanan*, Agglutination. Journ. of Bacteriology 4, 73 (1919). — *A. M. Noblat*, Observations sur le mécanisme de l'agglutination (Labor. von *Lasseur*). Faculté de Pharmacie (Nancy 1929). — *H. Netter*, Über die physikochemischen Grundlagen der Zellagglutination. Klin. Wschr. 1924, 2254. — *H. Eagle*, Specific agglutination and precipitation. I. The mechanism of

Bewegung, aber ohne zu kollidieren. Erst unter dem agglutinierenden Einfluß von irgend etwas kollidieren die Teilchen und haften aneinander. Die abstoßende Kraft entspricht der Potentialdifferenz zwischen Teilchenladung und Flüssigkeit. Ist diese geringer als die Kohäsion, die vermittels der Grenzflächenspannung die Haftung ermöglicht, dann ist die Bedingung für Agglomeration gegeben, und die Sedimentierung der Aggregate folgt. Die auslösende Ursache der Agglutination greift also an der elektrischen Ladung der Teilchen (Bakterien) an.

1. Die elektrische Ladung der Teilchen einer Suspension, spez. von Bakterien.

Die Tatsache einer elektrischen Ladung sowie deren Vorzeichen läßt sich aus der Wanderungsrichtung bei Kataphoreseversuchen feststellen.

Unter den normalen Verhältnissen einer Bakteriensuspension in physiologischer NaCl-Lösung sind die Bakterien negativ geladen.

Der Ursprung der Ladung ist nicht sicher bekannt. Wenn sich nicht auf der Bakterienoberfläche Stoffe befinden, die dissoziieren, so ist die Ladung durch bevorzugte Ionenadsorption aus dem Suspensionsmittel bedingt. Jedenfalls besteht eine Beziehung zwischen Größe der Ladung und Elektrolytgehalt des Milieus, insofern die Potentialdifferenz zwischen Bakterienoberfläche und Milieu um so geringer und damit die Stabilität der Lösung um so kleiner wird, je elektrolytfreier das Milieu ist. Dabei ist zu beachten (*Noblat*), daß reines Aqua dest. den Mikrobenzellen Elektrolyte entzieht, und daß auch isotonische Lösungen reiner Saccharose in nicht merklicher Weise die Elektrolytabgabe aus lebenden und toten (80° erhitzten) Bakterien vermindert, wie sie reines Wasser allein bewirkt, was sich aus der *Donnan*'schen Theorie ergibt.

Vieles spricht für die Ansicht von *Laing* und *Mc Bain*, nach der die Bakterien an ihrer Oberfläche Mizellen enthalten, die große Ionen bilden, die sich von den gewöhnlichen Ionen durch ihre große Valenz unterscheiden. Mithin würde eine Steigerung der Kataphorese-Geschwindigkeit nicht für eine größere Potentialdifferenz sprechen, sondern für eine Vermehrung der Zahl der Ladungen pro Flächeneinheit. Also: Die elektrische Ladung stammt von Verbindung des Teilchens mit einem Ion. Aber die Natur dieser Bindung ist nicht bekannt.

2. Beeinflussung der Ladung.

Damit Teilchen agglutinieren können, muß ihre, die gegenseitige Abstoßung bedingende Ladung herabgesetzt werden. Dazu ist aber nicht eine völlige Entladung nötig, sondern nur eine Verminderung bis zu dem Punkt, bei dem die Kohäsion der Teilchen ihre Abstoßung überwindet. Dieses sog. kritische Potential, welches ja durch die Kohäsionskräfte und durch die Grenzflächenspannung der Suspensionsflüssigkeit mitbedingt ist, bleibt im allgemeinen bei einer Suspension das gleiche, ohne Rücksicht auf die Art und die Wertigkeit der Ionen des Milieus,

the reaction. Journ. of Immunology 18, 393 (1930). — *H. G. Wells*, The chemical aspects of Immunity. II. Ausg. (New York 1929). — *R. Kraus*, *N. Kovacs* und *R. Paltauf*, Agglutination und Agglutinine. Bd. II. 3. Aufl. Handb. d. pathog. Mikroorganismen (*Kolle*, *Kraus*, *Uhlenhuth*). (Jena 1929.)

kann jedoch durch hohe Konzentrationen von Elektrolyten beeinflusst werden (siehe weiter unten). Wird aber, hauptsächlich durch chemische Eingriffe oder durch Adsorption von Stoffen, besonders von Eiweißen, die Oberfläche der Zellen verändert, dann ändert sich außer dem elektrokinetischen Potential auch das kritische Potential. Letzteren Vorgang hat man stets bei der spezifischen Agglutination von Bakterien durch Serum, da hierbei stets Serumeiweiß adsorbiert wird.

Die Ladung der Bakterien kann daher beeinflusst werden:

- a) ohne Gegenwart adsorbierbarer Stoffe und ohne chemische Änderung der Grenzfläche durch Elektrolyte,
- b) durch chemische Änderung der Grenzfläche, wozu auch Hitze- einwirkung gehört,
- c) durch Adsorption von Stoffen, die dadurch neue Grenzflächen mit veränderten Eigenschaften bedingt.

Selbstverständlich ist die bei b) und c) veränderte Grenzflächenladung ihrerseits wieder von Elektrolyten einflußbar.

a) Beeinflussung der Ladung durch Elektrolyte.

Rein wässrige Bakteriensuspensionen sind durch Elektrolyte fällbar (*Bechhold*). Wirksam ist nur das Kation. Die OH'-Ionen sind ohne jede agglutinierende Wirkung. Von den einwertigen Kationen ist außer dem H⁺ nur das Ag⁺-Ion wirksam (*Friedemann und Neisser, Bechhold 1904*). Von den zweiwertigen agglutinieren Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ und Hg²⁺, nicht aber Ca²⁺, Ba²⁺ und St²⁺. Die dreiwertigen Al³⁺ und Fe³⁺-Ionen agglutinieren sehr stark, jedoch ist ihre Wirksamkeit durch die Hydrolyse ihrer Salze kompliziert. Diese Befunde wurden in der Folgezeit mehrfach bestätigt. Dagegen sind, wie weiter unten erörtert, mit Agglutinin beladene Bakterien schon durch einwertige Ionen agglutinierbar.

Bechhold hatte für die agglutinierende Wirkung der Salze einen „Schwellenwert“ feststellen können und beobachtete bei sehr starker Konzentration eine „Vorzone“, in der trotz der Elektrolyte keine Agglutination erfolgt, bei der also durch die Elektrolyte auch die Kohäsion beeinflusst war. Diese Beeinflussung konnten *Northrop* und *de Kruif* (1922)¹⁾ mit einer einfachen, zwar nicht sehr exakten, aber brauchbaren Methodik feststellen:

Es wurden an Deckgläschen Bakterien angetrocknet und die Kraft gemessen, die nötig war, das Deckgläschen aus der Oberfläche von wässrigen Salzlösungen herauszuziehen. Sie fanden, daß bei einer Potentialdifferenz unter dem kritischen Potential von 15 mV (gleichgültig welches Vorzeichen) regelmäßig Agglutination eintritt, vorausgesetzt, daß die Kohäsion nicht vermindert wurde. Elektrolyte in niedriger Konzentration unter 0,001 m beeinflussen nur das Potential der Bakterien. In höheren Konzentrationen über

¹⁾ *Northrop* und *de Kruif*, Journ. of. gen. Physiol. 4, 639 (1922).

0,01 m vermindern sie außerdem die nach obiger Technik gemessene Kohäsion, wodurch die agglutinierende Potentialzone verschmälert wird. Diese Kohäsionsverminderung ist der Grund, warum in konzentrierten Salzlösungen die Elektrolytagglutination auch dann ausbleiben kann, wenn das Potential unter 15 mV sinkt und unmeßbar klein wird, und erklärt ferner die agglutinierende Wirkung niederer, und stabilisierende Wirkung höherer Salzkonzentrationen.

Ganz hohe Salzkonzentrationen, wie sie *Liefmann*¹⁾ zur Unterscheidung verwandter Bakterienarten anwendete, fällen aber die hydrophilen Bakterien auf anderer Grundlage, nämlich analog der Aussalzung von lyophillem Eiweiß durch Ammoniumsulfat, wobei u. a. Dehydratationsvorgänge eine Rolle spielen.

Ein Spezialfall der Elektrolytagglutination ist die Säureagglutination durch H⁺-Ionen (*Michaelis* 1914, *Arkwright* 1914). *Michaelis* fand bestimmte Agglutinationsmaxima bei einer für die betr. Bakterienart charakteristischen H⁺-Ionenkonzentration, die beim Flockungsmaximum dem i. P. eines Zellbestandes des Bakteriums entsprechen. Manche Stämme, besonders frisch isolierte Typhusstämmen, zeigen mitunter überhaupt keine Säureagglutination (*Hanssen* 1923). Dazu kommt, daß die Anionen nicht gleichgültig sind. Die Agglutinationskurven starker Säuren waren verschieden (*Noblat*). Schwach dissoziierte Säuren agglutinieren schwächer als starke Säuren, aber man muß beachten, daß es sehr schwierig ist, Bakteriensuspensionen von gleicher Stabilität herzustellen, und schon geringe Unterschiede in der Stabilität genügen, um die Charakterisierung der optimalen H⁺-Ionenkonzentration so unscharf zu gestalten, daß die Säureagglutination als Methode zur Identifizierung von Bakterien nicht brauchbar ist. Trotz optimaler H⁺-Ionenkonzentration kann bei genügend hoher Salzkonzentration die Agglutination ausbleiben. Nach *Beniasch* (1912), *Arkwright* (1914) u. a. ist das Optimum der Säureagglutination bei begeißelten Bazillen, z. B. bei Typhus zunächst bei einer (H⁺) von etwa $0,7 \cdot 10^{-4}$ oder $3,5 \cdot 10^{-5}$ auf die Geißeln zurückzuführen, während die von den Geißeln beraubten, wie auch auf 100° erhitzten Bakterienleiber erst bei p_H 3,0 agglutinierten. Da auch der Typus der Agglutination verschieden ist, unterschieden die Autoren 1. eine „Flagellenagglutination“ von grobflockigem und 2. eine „somatische Agglutination“ von mehr körnigem Charakter.

b) Beeinflussung der Ladung der Bakterien durch Änderungen (evtl. chemischer Art) der Bakterien-Grenzfläche.

1. Einfluß von Nicht-Elektrolyten. Alle Nichteletkrolyte ändern entweder die Oberflächenspannung im Sinne einer Erhöhung der Kohäsionswirkung zwischen den Teilchen (Bakterien), oder, z. B. Alkohol, ändern die Oberfläche der hydrophilen Bakterien im Sinne einer Denaturierung, so daß allein deren Affinität zu Wasser so gering wird, daß die Kohäsion untereinander überwiegt oder Elektrolyte ihre Entladung bewirken und nun Agglomeration eintreten kann. — Da bei der spezifischen Agglutination Nichteletkrolyte keine erkennbare Rolle zu spielen scheinen, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

¹⁾ *Liefmann*, Münch. med. Wschr. 1913, 1417.

2. Einfluß der Temperatur auf die Agglutinabilität der Bakterien. Hier ist der Einfluß der Erhitzung auf die Bakterien von dem auf das Serum, der weiter unten besprochen wird, zu trennen.

Erhitzen der Bakterien verändert das gesamte Protein der Zelle im Sinne der Hitzedenaturierung. Es ist daher, wie wir später sehen, nicht zweckmäßig, die Beobachtungen an erhitzten Bakterien dadurch erklären zu wollen, daß man hitzebeständige und hitzeunbeständige proteinhaltige Antigene in der Bakterienzelle annimmt. Anders liegen die Verhältnisse bei der Unterscheidung von Proteinantigenen einerseits und den hitze-stabilen Polysacchariden der Bakterien andererseits. Erhitzung ändert die Elektrolytempfindlichkeit der Bakterien, wie z. B. die folgenden Beobachtungen von *Tulloch*¹⁾ über die Agglutination durch NaCl-Lösungen von spezifischen und unspezifischen (siehe weiter unten über die diphasische Variation) Stämmen von Bakterien nach Hitzeeinwirkung zeigen (Ablesung nach 2 Std. 55°).

	molare Konz. von NaCl	B. aerthrycke (49)		B. Paratyph. B (3297)	
		spezifisch	unspezifisch	spezifisch	unspezifisch
nicht erhitzt	1	—	—	—	++++
	0.8	—	—	—	++++
	0.6	—	—	—	++++
	0.4	—	—	—	++++
	0.2	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—
1/2 Stunde 65°	1	—	—	—	++
	0.8	—	—	—	++
	0.6	—	—	—	++++
	0.4	—	—	—	+
	0.2	—	—	—	±
	0.1	—	—	—	—
1/2 Stunde 95°	1	++	+	—	—
	0.8	++	+	—	—
	0.6	++	+	—	++
	0.4	+	—	—	++
	0.2	+	—	—	++++
	0.1	+	—	—	++++

Man sieht, daß der Hitzeeinfluß nicht auf alle Bakterien gleichmäßig wirkt. Die Elektrolytempfindlichkeit kann gesteigert werden, es tritt aber auch eine in höheren Salzkonzentrationen auftretende Verringerung der Agglutinabilität ein durch Verminderung der Kohäsion (*Northrop*).

Erhitzt man Bakterien (z. B. Typhusbazillen) auf 80° C, so sind sie nicht mehr durch Immunsrum agglutinierbar, werden aber merkwürdiger-

¹⁾ Siehe S. 27.

weise wieder agglutinierbar, wenn man sie auf 100° C erhitzt. Bezüglich der Agglutinierbarkeit erwies sich eine einmalige Erhitzung auf 115° nicht so eingreifend wie eine solche auf nur 80° (*Porges, Jobling, Dreyer und Blake, 1906*). Dabei gibt es anderseits Bakterien, wie z. B. *B. melitensis*, der bei Erhitzung auf 90° spontan agglutinieren soll. Die Frage nach dem Grunde für die Nichtagglutinierbarkeit von auf 80° C erhitzten Bakterien wurde erneut von *Noblat (1929)* untersucht mit folgendem Ergebnis:

Die Verringerung der Agglutinabilität von auf 80° C erhitzten Bakterien durch homologes Immuneserum ist in ihrem Ausmaß bei verschiedenen Bakterien verschieden und nicht an den Tod gebunden, denn letzterer kann herbeigeführt werden, ohne die Agglutinierbarkeit zu verringern und anderseits verhalten sich erhitzte Sporen (80°) wie nicht erhitzte. Die Agglutinierbarkeit ist zwar nicht völlig aufgehoben, sondern kleine Agglomerationen (fein flockige A.) können unter dem Einfluß des Immuneserums doch zustande kommen. *Noblat* konnte nachweisen, daß auf 80° C erhitzte Bakterien nur sehr wenig ihre agglutinogene Fähigkeit verringert hatten, daß unter der Einwirkung der Hitze in wässriger Lösung beträchtliche Elektrolytmengen abgegeben werden, und daß die Bindungsfähigkeit der erhitzten Bakterien zwar nachgelassen hatte, aber daß anderseits stets mehr Agglutinin gebunden wurde als zur Agglutinierung nicht erhitzter Bakterien nötig war. Dazu kam, daß bei 60° erhitzte Bakterien nicht mehr Agglutinin banden als bei 80° erhitzte, jedoch viel leichter agglutinierten. Demnach war also trotz Antikörperbindung die Agglutinabilität aufgehoben. Die Existenz hemmender oder stabilisierender Stoffe im Milieu konnte experimentell nicht erwiesen werden. Ferner ließ sich erweisen, daß weder eine Änderung der elektrischen Ladung der Bakterien noch die geringe und dabei nicht einmal konstant feststellbare Erhöhung der Viskosität des Milieus durch das Erhitzen ursächlich für die Stabilität der mit Agglutinin beladenen erhitzten (80°) Bakterien in Betracht kommen. Eine befriedigende Lösung der Frage steht noch aus.

Noblat weist auf die Möglichkeit hin, daß Quellungsvorgänge die Mizellare Struktur geändert und somit eine evtl. Änderung der Grenzflächenspannung herbeigeführt haben könnten. Wir kommen bei Besprechung der qualitativen Rezeptorenanalyse nochmals auf den Einfluß des Erhitzens auf die Agglutinabilität der Bakterien zurück.

c) Beeinflussung der elektrischen Ladung durch Adsorption von Stoffen (Eiweißen).

Hier sei in erster Linie die Adsorption von Eiweiß berücksichtigt, weil es sich bei allen serologischen Agglutinations-Reaktionen um diese Adsorption handelt. Eiweiße sind amphotere Elektrolyte, deren Dissoziation von der H⁺-Ionenkonzentration des Milieus abhängig ist, und wenn Eiweiß adsorbiert wird, so wird zunächst einmal das elektrokinetische Potential des betreffenden Adsorbens von dem Dissoziationsgrade des adsorbierten Eiweißes abhängen, und da letztere von der p_H des Milieus abhängig ist, so wird also die p_H der Suspensionsflüssigkeit die Ladung des mit einer adsorbierten Eiweißhülle umgebenen Bakteriums bestimmen. Anderseits wird aber auch das kritische Potential der Bakteriensuspension

verändert, denn dieses ist jetzt gegeben durch den isoelektrischen Punkt des jeweils adsorbierten Eiweißes.

Wir wollen jetzt an Hand der neueren Arbeiten von *H. Eagle* die Bedeutung erörtern, die einmal die Adsorption von Normalserumeiweiß und dann die von Immunsersumeiweiß auf die Agglutinabilität der Bakterien haben.

Wie oben bemerkt, haben einwertige Ionen keinen Einfluß auf normale Zellsuspension (Bakterien oder Blutzellen). Dieses hydrophilen Kolloiden analoge Verhalten ändert sich bei Zusatz von Immunsersum. Die Suspension wird hydrophob und ist nun auch durch einwertige Kationen fällbar.

Dies könnte dadurch erklärt werden, daß das Antigeneiweiß durch die Bindung mit dem Antikörper denaturiert wird, in dem Sinne, wie z. B. Alkohol Eiweiß denaturiert und hydrophob macht, oder aber das Antigen selbst bleibt unverändert und wird von einer adsorbierten Eiweißhülle umgeben, die hydrophob ist und damit die Antigenmizelle gegen einwertige Elektrolyte sensibilisiert. Letzterer Vorgang ist höchstwahrscheinlich der tatsächliche, denn derartige Sensibilisierungsvorgänge sind in der Kolloidchemie bekannte Erscheinungen, wie z. B. die Sensibilisierung von Goldsol durch Gelatine, von Tannin durch Gelatine, Agar, Stärke; von Kolloidiumteilchen und Farbstoffen durch Gelatine, von Eisenhydroxydsol durch Eiweiß usw. Stets handelt es sich um Adsorption von hydrophilen Kolloiden, die durch den Vorgang der Adsorption denaturiert und elektrolytempfindlich werden. Die Ausflockung betrifft dann primär das denaturierte Kolloid und erst sekundär die als Adsorbens dienende Mizelle.

Ganz analog haben wir uns die Wirkung der Bindung von Agglutinin an das Bakterium vorzustellen. Agglutinine sind gewisse Globuline des Immunsersums, die auf Grund einer spezifischen Affinität von der entsprechenden Bakterienzelle (Antigen) adsorbiert werden, und durch diesen Adsorptionsvorgang relativ lyophoben Charakter annehmen. Dieses im Antigen-Antikörperkomplex (A. A.-Komplex) gebundene Globulin ist dann die Substanz, die durch Elektrolyte ausgeflockt wird. Werden im Kataphoreseversuch die normal in verschiedenem Grade negativ geladenen Bakterien mit Immunsersum versetzt, so nähert sich und erreicht schließlich das kataphoretische Potential, ebenso wie der kataphoretisch ermittelte isoelektrische Punkt, die Werte, die dem denaturierten Globulin des betreffenden Serums zukommen [bei Kaninchensersum $p_H = 5,3$ (*Shibley*); bei Pferdesersum $p_H = 4,7$ (*Northrop*), $4,7—5,2$ (*Eagle*)]. Entsprechendes fand sich bei sensibilisierten roten Blutzellen und beim spezifischen Eiweißpräzipitat.

Flockungsfähigkeit des A. A.-Komplexes.

1. Wirkung der H^+ -Ionen. Die Säureflockung von nicht sensibilisierten Bakterien entspricht dem isoelektrischen Punkt einer seiner Zellbestandteile. Wird normales oder Immunsersum zugefügt, so wandert die Zone der optimalen Agglutination von einer für jedes Bakterium

charakteristischen Zone (*Michaelis*) zu einem für alle Bakterien gemeinsamen Wert, nämlich dem isoelektrischen Punkt des Serumglobulins. Bei normalem Serum ist dazu relativ viel Serum nötig.

Die Fig. 1 und 2 aus der Arbeit von *Eagle* zeigen, daß normales und Immenserum in qualitativ gleichem Sinne auf das Flockungsoptimum (ausgezogene Linie) wirken, das sich nach dem i. P. des Serumglobulins hin verschiebt. Aber das nur lose adsorbierte, leicht durch einmaliges Waschen entfernbare normale Globulin gibt nur in der Nähe des i. P. Säureflockung, während das fest gebundene, nur mit Schwierigkeiten entfernbare Immenserumglobulin fast bei allen Reaktionen Säureflockung gibt.

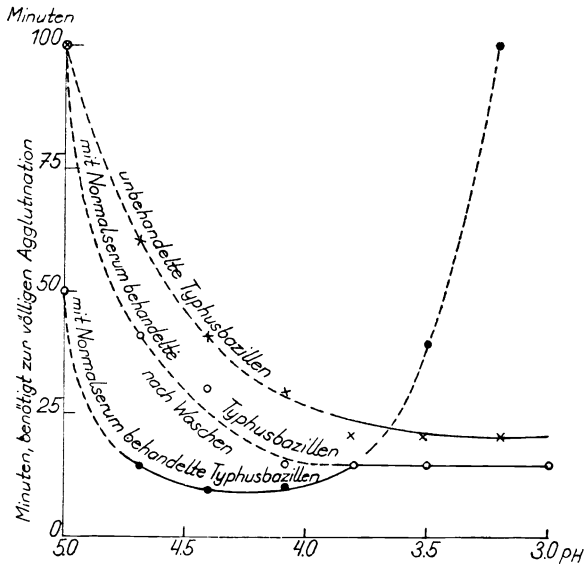


Fig. 1. Einfluß von Normalserum auf das Agglutinationsoptimum von Typhusbazillen [*H. Eagle*, Journ. of Immun. 18, 393 (1930)]. Die ausgezogene Linie bedeutet Agglutination.

Maßgebend für den Unterschied in dem agglutinierenden Effekt von normalem und Immenserum ist nur der physikalische Zustand des adsorbierten Proteins. Das adsorbierte Normalserumeiweiß ionisiert in gleicher Weise wie in Lösung und bildet eine schützende Hülle von hydrophilem wasserlöslichem Kolloid in analoger Weise, wie sie die unbehandelten Bakterien dem wässrigen Milieu gegenüber besitzen, weswegen aus dem gleichen Grunde auch die mit Normalserumeiweiß beladenen Bakterien nicht agglutinieren. Dagegen wird das Immenserumglobulin denaturiert.

Wenn es daher auch die gleiche optimale Flockungszone hat wie normales Serumglobulin, so kann es doch auch abseits der isoelektrischen Zone von Elektrolyten geflockt werden.

Schon eine sehr geringe Immunserrummenge verschiebt das kritische Potential nach dem i. P. des Globulins. Der Grad der Verschiebung ist proportional der zugefügten Immunserrummenge. Das jeweilige kataphoretische Potential ist die Resultante aus dem ursprünglichen und dem Potential des adsorbierten Immunglobulins. Ist maximale Verschiebung des isoelektrischen Punktes (bei Typhusbazillen bis 4,7 ρ_H) eingetreten, so muß man völlige spezifische Absättigung aller antigenen Gruppen der Bakterienoberfläche annehmen, wobei *Eagle* annimmt, daß $\frac{4}{5}$ der Zelloberfläche mit Immunglobulin bedeckt ist.

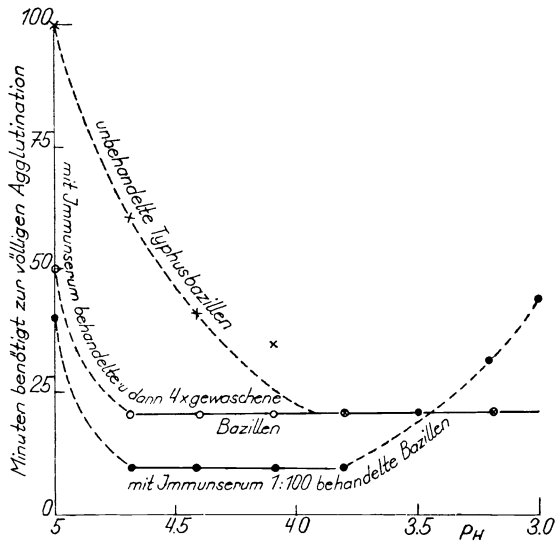


Fig. 2. Wirkung von Immunserrum auf das Agglutinationsoptimum von Typhusbazillen [*H. Eagle*, Journ. of Immun. 18, 293 (1930)]. Die ausgezogene Linie bedeutet Agglutination.

2. Wirkung von Elektrolyten. Es ist schon von *Bechhold*, *Buxton*, *Lasseur* u. a. festgestellt, daß mit Agglutinin beladene Bakterien zum Unterschied von freien Bakterien auch durch einwertige Kationen agglutiniert werden. Die erhöhte Elektrolytempfindlichkeit ist durch das adsorbierte und damit denaturierte Globulin des Immunserrums bedingt. Im Grunde sind es aber zwei getrennte Vorgänge, auf die Elektrolyte einwirken können: Die Bindung des Agglutinins an die Bakterien und die Entladung des A. A.-Komplexes.

Zur Rolle der Elektrolyte bei der Bindung der Agglutinine sei auf die Arbeit von *Noblat* (1929) verwiesen. Die Autorin fand, daß die Menge von gebundenem Agglutinin in Beziehung zum NaCl-Gehalt des Milieus

bis zu einer gewissen Konzentration steht. Danach spielen die Elektrolyte — vielleicht nur in sehr schwacher Konzentration — auch eine Rolle bei der Agglutininbindung. Aber wegen der Abgabe von Elektrolyten auch in reines Wasser wie in isotonische Zuckerlösung muß die Frage, ob auch bei absoluter Elektrolytfreiheit Agglutinine von Bakterien gebunden werden können, ungewiß bleiben.

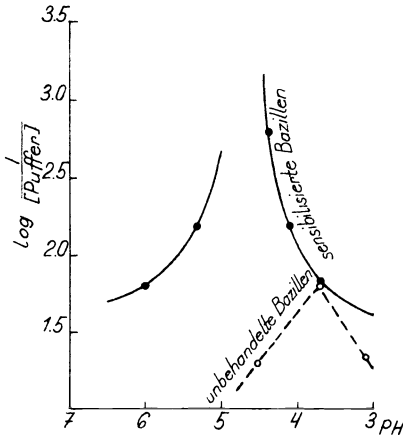


Fig. 3. Die Wirkung der H-Ionenkonzentration des Milieus auf die Agglutination sensibilisierter und unbehandelter Typhusbazillen durch die Pufferelektrolyten [H. Eagle, Journ. of Immun. 18, 293 (1930)].

Bei der Wirkung von Elektrolyten auf den A. A.-Komplex sind nach Eagle bei der optimalen Reaktion zwei Erscheinungen zu berücksichtigen: Die normale Agglutination, die auf dem Minimum an Löslichkeit (Hydrophilie) der Zelloberfläche beruht, und die Kohäsion durch die Entladung des adsorbierten Immunglobulins bei dessen isoelektrischem Punkt. Das Optimum liegt tatsächlich bei einer dazwischenliegenden Reaktion, und für die optimale Agglutination sind außer den H-Ionen keine anderen Elektrolyte unbedingt nötig. Tatsächlich zeigt die nebenstehende Figur 3 der Arbeit von Eagle, daß bei der optimalen Reaktion schon eine Pufferkonzentration (Azetat) von $< n/1000$ genügt, um Flockung zu bewirken.

Abseits der isoelektrischen Zone, z. B. bei $p_H = 7,4$, haben weder das ursprüngliche hydrophile Antigen (Typhusbaz.) noch das adsorbierte Normalglobulin eine Tendenz zur Flockung. Die Aggregierung des A. A.-Komplexes tritt nur bei dessen kritischem Potential, für dessen Wert nur das adsorbierte Immunglobulin maßgebend ist, ein, wobei die Geschwindigkeit der Agglutination von der Menge des adsorbierten Globulins, d. h. von der Größe der bedeckten Oberfläche abhängt.

Was nun die Wirkung anderer Elektrolyte auf die Ausflockung von A. A.-Komplexen allgemein betrifft, so existiert, wie die folgende Tabelle von Eagle zeigt, eine minimale Elektrolytkonzentration, über die hinaus eine Verstärkung der Agglutination nicht erfolgt.

Die Tabelle gibt die Agglutination nach 1 Std. bei 56° und 2 Std. Zimmertemperatur bei $p_H 7,4$ an, wobei die molare Konzentration für das Volumen von 0,1 ccm der A. A.-Suspension in 1 ccm Aqua dest. gilt.

Wirkung von Elektrolyten auf die Agglutination von A. A.-Komplexen bei p_H 7,4 (nach *H. Eagle*, Journ. of Imm. **18**, 393, 1930).

A. A.-Komplex	Elektrolyt	molare Konzentration							
		0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,00125	0,0006	0,0003
sensibilis. Coli. B.	NaCl	+++	+++	+++	+++	±	—	—	—
	Na ₂ SO ₄	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
	BaCl ₂	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++
sensibilis. Typhus B.	NaCl	++++	++++	++	—	—	—	—	—
	Na ₂ SO ₄	++++	++++	+++	+	—	—	—	—
	BaCl ₂	++++	++++	++++	++++	++++	+++	±	—
sensibilis. rote Blutzellen	NaCl	++++	++++	++++	+++	—	—	—	—
	Na ₂ SO ₄	++++	++++	++++	++++	+	—	—	—
	BaCl ₂	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
spezifisches Eiweiß- Antieiß- Präzipitat	NaCl	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
	Na ₂ SO ₄	++++	++++	++++	++++	—	—	—	—
	BaCl ₂	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
Hitze- denaturiertes Globulin	NaCl	++++	++++	++	—	—	—	—	—
	Na ₂ SO ₄	++++	++++	+++	—	—	—	—	—
	BaCl ₂	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	—

Die Ladung des fällenden Ions muß entgegengesetzt der der A. A.-Teilchen sein, diese letztere ist aber bedingt durch den adsorbierten Ampholyten. Auf der alkalischen Seite des i. P. ionisiert dieser als Na-globulinat' und ist wegen der größeren Beweglichkeit des Na⁺ negativ geladen und daher wirken Kationen entladend. Auf der sauren Seite des i. P. des Ampholyten ist wegen der Dissoziation in Globulin+chlorid⁻ der A. A.-Komplex positiv geladen, weswegen für die Agglutination Anionen in Betracht kommen, wie dies von *Tulloch*¹⁾ gezeigt werden konnte.

Bemerkenswert an der Tabelle ist, daß die zur Agglutination sensibilisierter Bakterien benötigte Elektrolytkonzentration von der gleichen Größenordnung ist, wie die zur Agglutination sensibilisierter Blutzellen und zur Ausflockung spezifischer Eiweiß-Antieiß-Komplexe. Unter anderem ist dies mit ein Grund für die Berechtigung der Annahme, daß das adsorbierte antikörperhaltige Globulin und nicht das Antigen maßgebend ist für die Ausfällung von A. A.-Verbindungen.

Die auf den oben skizzierten Untersuchungen fußende Anschauung über den Mechanismus der Agglutination nimmt also eine Bindung von Antigen mit Antikörper' an, aber so, daß das agglutininhaltige Globulin als eine Hülle denaturierten hydrophoben Eiweißes das Antigen umgibt. Das aktiv agglutinierende Agens ist der Elektrolyt. Das Antigen, einmal mit Antikörper verbunden, ist an dem Flockungsvorgang ganz unbeteiligt,

¹⁾ *Tulloch*, Biochem. Journ. **8**, 293 (1904).

indem die Kohäsion nach Entladung der Oberflächen der A. A.-Komplexe zunächst nur an den Oberflächenfilmen angreift und das Antigen nur sekundär in den Vorgang passiv mit hineingezogen wird.

3. Die Bedeutung von Serumeigenschaften für den Agglutinationsvorgang.

Hier sei nur die Auswirkung, die ein Erhitzen des Immunserums auf die Agglutination zur Folge hat, erwähnt. Bekannt ist das Hemmungsphänomen, das darin besteht, daß ein Immunserum unverdünnt oder nur wenig verdünnt nicht agglutiniert, wohl aber bei weiterer Verdünnung. Diese „Prozone“ als Folge zu hoher Elektrolytkonzentrationen war schon weiter oben erwähnt. Relativ häufig kann man es bei gealterten oder erhitzten Seren beobachten. Die Ursache des Hemmungsphänomens kann zweifacher Art sein: Entweder wird die Adsorption des Immunglobulins gehindert oder sie findet zwar statt, aber die Agglomeration der mit Immunglobulin umhüllten Bakterien ist verhindert.

Bezeichnend ist *Shibley's*¹⁾ Beobachtung, daß erhitzte Sera mit Prozone leichte Opaleszenz bis Trübung aufweisen, deren Entfernung z. B. durch Filtration oder Kaolinadsorption auch die Prozenenbildung aufhebt. Eine Bildung von Agglutinoiden mit einer höheren Affinität zu den Bakterien wie die gewöhnlichen Immunagglutinine durch die Erhitzung anzunehmen, ist überflüssig. Das Hemmungsphänomen ist sicher einfach physikalisch erklärbar und beruht sehr wahrscheinlich auf einem ähnlichen Mechanismus wie das Zonenphänomen bei der Komplementbindung (S. 46).

Nach *L. Fleck*²⁾ ist die Zerstörung des Agglutinationsvermögens durch Erwärmen umgekehrt proportional zum Verdünnungsgrad des Serums, zu seinem ursprünglichen Titer und zur Leichtigkeit, mit der durch Erhitzen das Hemmungsphänomen zustande kommt. Diesen Einfluß der Verdünnung auf den Verlust des Agglutinationstiters durch Erwärmen zeigen die folgenden Zahlen, die *C. A. Millardo*³⁾ mit Anticolliserum vom Titer 1:500 nach Erhitzen von je einer halben Stunde bei verschiedenen Temperaturen erhielt:

55° unverdünnt	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{5}$ verdünnt	$\frac{1}{40}$
60° unverdünnt	$\frac{1}{200}$	verdünnt	$\frac{1}{20}$
65° unverdünnt	$\frac{1}{100}$	verdünnt	$\frac{1}{10}$
70° unverdünnt	$\frac{1}{50}$	verdünnt	keine Agglutination.

*Priestley*⁴⁾ hatte bei der Agglutination von Serum erkrankter Rinder mit *Br. Abortus* Bang gelegentlich eine Hemmungsreaktion beobachtet, wobei

¹⁾ *Shibley*, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. **25**, 333 (1928).

²⁾ *L. Fleck*, 1922, polnische Arbeit.

³⁾ *Millardo*, Je Morgagni, 19. Sept. 1926, 125; zit. nach *Tulloch*, Journ. of Royal Army Medic. Corp. **48**, 96 (1927).

⁴⁾ *Priestley*, Journ. of Pathol. **34**, 81 (1931).

das Serum sowohl in stärkerer wie schwächerer Verdünnung agglutinierte. Die Lage der Zone hing ab vom Verhältnis zwischen Serum- und Bakterienmenge, Filtration (Berkefeld) des Serums erweiterte die Zone in Richtung stärkerer Konzentration. Erhitzen des Serums auf 56° erweiterte die Hemmungszone bei der Agglutination bei 37°. Wurde aber die Agglutination bei 56° vorgenommen, so verengte sich die Zone. Verringerung der Salzkonzentration erweiterte die Hemmungszone nach der Seite schwächerer Serumkonzentration, und Erhöhung des Salzgehaltes hob die Hemmung auf. Versucht man eine physikalische Erklärung dieser Hemmungserscheinungen, so wäre daran zu denken, daß in erhitztem Serum durch die Erhitzung die Hydratation des denaturierten Eiweißes zugenommen hat (erhöhte Viskosität).

Was die Rolle der Viskosität auf das Agglutinationsphänomen betrifft, so ergaben kürzlich angestellte Versuche von *St. Went*¹⁾, daß, wenn die Viskosität des Mediums bis zu einem gewissen Grade zugenommen hat, Bakterien spontan agglutinieren, wobei der Schwellenwert der Viskosität bei verschiedenen Bakterien verschieden ist. Kleine Bakterien, wie Staphylokokken, sind in dieser Hinsicht viel stabiler als begeißelte Bakterien wie Typhusbazillen. Die rein serologische Agglutination kann nur in Medien untersucht werden, die durch ihre Viskosität selbst keine Agglutination hervorrufen. Bei erhöhter Viskosität wird die Sensibilisierung der Bakterien durch das Immunglobulin zeitlich gehemmt.

4. Die Nichtagglutinabilität von Bakterien und die spontane Agglutination.

Bekanntlich trifft man mitunter frisch aus dem Körper isolierte Typhusbazillen, die mit dem homologen Immunserum inagglutinabel sind. Die Ursache dieser Erscheinung steht noch nicht fest. Im allgemeinen verliert sich diese Erscheinung bei weiterer Züchtung auf Agar. Besonders, wenn nach *R. R. Mellon*²⁾ dem Nährboden 0,1 Proz. Zystin oder 1 Proz. NaS_2O_3 zugesetzt ist, doch kann nach weiterer Passage auf gewöhnlichem Agar diese Inagglutinabilität wieder auftreten.

Man muß annehmen, daß irgendeine physikalische Ursache der Adsorption von Immunglobulin hemmend im Wege steht. Es wäre denkbar, jedoch bisher nicht erwiesen, daß manche Typhusbazillen eine Hülle spezifisch löslicher Substanzen bilden, wie sie in ausgeprägter Form bei anderen Bakterien zur sichtbaren Kapselbildung führen kann. Diese Hülle verhindert (vielleicht aus Polysaccharid-Eiweiß-Komplexen mit ihren hydrophilen Molekülteilen nach außen gerichtet) die Adsorption von solchen Antikörpern, die durch gut agglutinable, eine solche Hülle nicht besitzende Stämme von Kaninchen hergestellt, auch keine immunologische Spezifität für diese hypothetische Hüllensubstanz besitzen.

¹⁾ *St. Went*, Journ. of Immunology **19**, 347 (1930).

²⁾ *R. R. Mellon*, Journ. of Immunology **12**, 331 (1926).

In einem gewissen Gegensatz dazu sind manche Bakterien in Suspensionen so unstabil, daß sie schon unter dem Einfluß der Elektrolyte des Milieus spontan agglutinieren. Auch die Ursache der Spontanagglutination ist nicht restlos geklärt. Das, was die inagglutinablen Bakterien an Schutzstoffen zu viel haben, ist bei den spontan agglutinierenden nicht genügend vorhanden. Wahrscheinlich sind lipoidartige Stoffe in der Oberflächenmembran die Ursache des relativ lyophoben Charakters der zur spontanen Agglutination neigenden Bakteriensuspension.

Schon geringe Elektrolytkonzentrationen genügen zur Agglutination. Erhöht man dieselbe, so kann die spontane Agglutination aufgehoben werden, wie *Mellon*¹⁾ an einer Streptokokkensuspension in 2—2,5 Proz. NaCl-Lösung zeigen konnte. Wahrscheinlich findet durch die Na⁺-Ionen eine Umladung statt, wie sie zweiwertige Ionen (Ca⁺⁺) in noch höherem Maße bewirken, denn *Mellon*²⁾ hatte einmal einen Bakterienstamm, der nur durch Na⁺, nicht aber durch Ca⁺⁺ oder Mg⁺⁺-Ionen spontan agglutiniert werden konnte.

Bekanntlich bedient man sich eines kleinen Zusatzes von Galle oder Alkohol, um Tuberkelbazillen besser zu einer stabilen Suspension verreiben zu können, und solche die Oberflächenspannung herabsetzende Mittel wie Na-Oleat (*Mellon*) hemmen noch in großer Verdünnung die spontane Agglutination durch Salze. Das gleiche erzielte *Berlin*³⁾ durch Zufügung von Gelatine oder erhitztem (30 Min. bei 60—65°) Meerschweinchen Serum als Schutzkolloid, also durch Steigerung des Haftdruckes an Wasser. Die große Bedeutung der Oberflächenspannung für die Stabilität einer Bakteriensuspension, die natürlich aufs engste mit der elektrischen Aufladung verbunden ist, geht auch aus der Arbeit von *Green* und *Halvorson*⁴⁾ hervor. Nach *E. Sorn*⁵⁾ wird der Wert der Oberflächenspannung einer Suspension von Choleravibrionen durch Normals Serum nur wenig, durch Immuns Serum aber stärker herabgesetzt. Auf den Unterschied der spontanen Agglutinabilität zwischen S- und R-Formen des gleichen Stammes kommen wir später (S. 49) zurück.

B. Die immunologischen Grundlagen der Agglutination.

1. Das Agglutinogen.

Wir haben in der vorausgegangenen Erörterung der physikalischen Grundlagen der Agglutination das Agglutinogen als etwas Ganzes, repräsentiert durch die Bakterienzelle, aufgefaßt und von dem Agglutinin nur als Immunglobulin gesprochen. Wir werden jetzt sehen, daß das Bakterienantigen eine sehr komplexe Struktur hat.

Die Forschung über die antigene Struktur der Bakterienzelle hat begonnen mit der Untersuchung der Einzelbestandteile der säurefesten

¹⁾ *Mellon*, Journ. of Immunology 9, 365 (1924).

²⁾ *Mellon*, Journ. of med. Res. 43, 345 (1922).

³⁾ *Berlin*, Russische Arbeit 1930, ref. in Zbl. ges. Hyg. 24, 781 (1931).

⁴⁾ *Green* und *Halvorson*, Journ. Inf. Diseases 35, 5 (1924).

⁵⁾ *E. Sorn*, Compt. rend. Soc. Biol. 103, 635 (1930).

Stäbchen (*v. Behring, Deycke, Much* und viele andere), hat dann durch die von *Weil* und *Felix* inaugurierte qualitative Rezeptorenanalyse wegen des leichteren Nachweises *in vitro* und letzthin durch die sehr gründliche Erforschung der Struktur der Pneumokokken große Fortschritte gemacht.

Die weitgehende Isolierung und Reindarstellung der Einzelbestandteile der säurefesten Bakterienzellen ist mehr in chemischer Hinsicht erfolgt und hat nicht zur Serologie, speziell zur Agglutination und Präzipitation, die engen Beziehungen wie die Strukturanalyse der X-Stämme, der Pneumokokken, der Typhusbazillen u. a. gefunden, weswegen die Besprechung der Ergebnisse bei den Tuberkelbazillen u. a. säurefester Stämme einem Bande über Bakteriologie in dieser Sammlung vorbehalten sei.

a) Die qualitative Rezeptorenanalyse.

Im Laufe experimenteller Untersuchungen zur Aufklärung der 1915 von *Weil* und *Felix*¹⁾ entdeckten Reaktion bei Flecktyphus galt es festzustellen, warum die verschiedenen, von Flecktyphuskranken isolierten *Proteus*-X-Stämme, z. B. X₂ und X₁₉ mit Patientenserum andersartig reagierten wie mit spezifischem Kaninchenserum.

Patientensera agglutinierten X₁₉ 100mal stärker als X₂, und zwar langsam und feinflockig. Immunsera von Kaninchen agglutinierten beide Stämme gleich stark, und zwar schnell und grobflockig. Saprophytische *Proteus*stämme der verschiedensten Herkunft reagierten sehr gut bis zum Endtiter mit Immuns serum, dagegen überhaupt nicht mit Patientenserum. Ein Erhitzen auf 60° hob bei den Patientensera, jedoch nicht bei den Immuns era, die agglutinierende Fähigkeit auf.

Weil und *Felix* [1917²⁾] gelang es, diese Unterschiede folgendermaßen zu erklären:

Die X-Stämme kommen in zwei morphologisch und biologisch verschiedenen Kulturformen vor: H- (mit Geißel) und O- (ohne Geißel) Formen, die ineinander umwandelbar sind und sich serologisch wie folgt unterscheiden lassen:

Das Anti-O-Serum beider Stämme enthält nur das O-Agglutinin, das die homologen Bazillen kleinflockig agglutiniert. Das Anti-H-Serum beider Stämme enthält O- und H-Agglutinin, von denen das H-Agglutinin grobe Flockung auch mit anderen *Proteus*stämmen gibt.

Demnach ist das H-Antigen (oder H-Rezeptor in der *Ehrlich*'schen Ausdrucksweise) allen *Proteus*stämmen gemeinsam, das O-Antigen bei jedem Stamm individuell verschieden, woraus sich das verschiedene Verhalten von Immuns erum und Patientenserum, welch letzteres identisch mit dem Anti-O-X₁₉-Immuns erum ist, erklären soll.

Weiter konnten *Weil* und *Felix*³⁾ zeigen, daß auch bei allen anderen *Proteus*bazillen das gruppenspezifische H- und das stammsspezifische

¹⁾ *Weil* und *Felix*, Wien. klin. Wschr. 1916, 33.

²⁾ *Weil* und *Felix*, Wien. klin. Wschr. 1917, 1509.

³⁾ *Weil* und *Felix*, Wien. klin. Wschr. 1918, 637.

O-Antigen vorhanden sind. *Sachs*¹⁾ stellte dann fest, daß das O-Antigen thermostabil, das H-Antigen thermolabil ist, woraufhin dann *Felix* und *Mitzenmacher*²⁾ in der Lage waren, die Methodik der sogenannten Rezeptorenanalyse zu vereinfachen, indem die H-Formen der Bazillen zwei Stunden bei 100° C gehalten werden, wonach sie sich wie rein gezüchtete O-Formen verhalten sollen. Später konnten *Weil* und *Felix*³⁾ zusammen mit *Mitzenmacher*⁴⁾ zeigen, daß ganz allgemein dieser Doppeltypus der Antigene auch für alle Bakterien der Typhus-Paratyphusgruppe existiert, der immunisatorisch zur Bildung feinflockender stammspezifischer Anti-O-Körper und grobflockender gruppenspezifischer Anti-H-Körper führt [Zeitschr. Immunitätsforschung **29**, 24 (1920)]. Die Methode der qualitativen Rezeptoranalyse — qualitativ deshalb, weil sie die qualitativ verschiedenen Rezeptortypen unterscheiden läßt —, ist in der Folge von vielen anderen Autoren auch auf andere Bakteriengruppen mit Erfolg angewendet worden, z. B. von *Schiff*⁵⁾ und *Fürth*⁶⁾ zur Unterscheidung von echtem Paratyphus-B Schottmüller und nahrungsmittelvergiftenden Typen (*Flügge*) sowie auch von *Spät*⁷⁾, *Weil*⁸⁾ u. a.

Seine Untersuchungen über Typhusbazillen führten *Felix*⁹⁾ zu folgenden Ergebnissen:

Für die Untersuchung auf feinflockige Agglutinine hat sich auch bei Typhus die Benutzung eines Stammes Ty (901) als besonders empfehlenswert erwiesen (*Kral's* Sammlung in Wien). Aber um eine Verschiebung der labilen und stabilen Antigene bei diesem Ty 901 sowie auch beim X₁₉ zu vermeiden, sind besondere Nährbodenbedingungen und besondere Versuchstechnik genau einzuhalten, wie sie u. a. *Braun* und *Feiler*¹⁰⁾ und *Eisler* u. *Silberstein*¹¹⁾ angaben, jedoch von *Kauffmann*¹²⁾ nicht als regelmäßig angesehen wurden.

Bei typhuskranken Menschen soll man stets die kleinflockige Agglutination (gegen Ty 901) finden, aber nur selten bei Paratyphuskranken. Die Schutzimpfung führt stets zur Bildung grobflockiger Agglutinine sowie die „anamnestische“ Reaktion [*Conradi* und *Bieling*¹³⁾]. Auf diese Weise ist die Agglutination bei Infektion von der nach Schutzimpfung zu unterscheiden.

*J. Craigie*¹⁴⁾ konnte zwar die experimentellen Beobachtungen von *Weil* und *Felix*, *Braun* u. a. bestätigen, denen zufolge die Geißeln der Ty-Bazillen

1) *Sachs*, Deutsch. med. Wschr. **1918**, 459.

2) *Felix* und *Mitzenmacher*, Wien. klin. Wschr. **1918**, 988.

3) *Weil* und *Felix*, Wien. klin. Wschr. **1918**, 986.

4) *Mitzenmacher*, Wien. klin. Wschr. **1918**, 1226.

5) *Schiff*, Ztschr. Immunitätsforsch. **33**, 511 (1922).

6) *Fürth*, Wien. klin. Wschr. **1922**, 337.

7) *Spät*, Zbl. Bakt. **88**, 5 (1922).

8) *Weil*, Ztschr. Immunitätsforsch. **35**, 25 (1922).

9) *Felix*, Ztschr. Immunitätsforsch. **39**, 127 (1924); Journ. of Immun. **9**, 115 (1924).

10) *Braun* und *Feiler*, Ztschr. Immunitätsforsch. **29**, 303 (1920).

11) *Eisler* und *Silberstein*, Ztschr. Hyg. **93**, 267 (1921).

12) *Kauffmann*, Ztschr. Hyg. **106**, 241 (1926).

13) *Conradi* und *Bieling*, Dtsch. med. Wschr. **1916**, 1280.

14) *J. Craigie*, Journ. of Immun. **21**, 417(1931).

den H- und die Bakterienleiber den O-Rezeptor darstellen, aber er konnte andererseits feststellen, daß, obwohl die Suspensionen isolierter Geißeln von einem O-Antiserum nicht agglutiniert wurden, sie doch als Antigen O-Agglutinine erzeugen können. Da weiterhin Auflösungen von Ty-Bazillen-Geißelsubstanz (durch Hitze oder Alkohol) sowohl mit reinem Geißelantiserum wie auch mit O-Antiserum Präzipitation gaben und andererseits entgeißelte und erhitzte Bazillen beim Kaninchen neben überwiegenden O- auch geringe Mengen von Geißel-Agglutininen lieferten, hält sich *Craigie* für berechtigt anzunehmen, daß sowohl die Geißelsubstanz als auch der Bakterienleib H- und O-Agglutinogene enthalten, was jedoch bei Typhusbazillen nicht streng bewiesen werden kann, da es unmöglich ist, den Beweis für die Reinheit der Geißel- resp. Bakterienleibersuspension zu erbringen. Nach *Mandelbaum*¹⁾ lassen sich aber auch mit Mischserum, das H- und O-Agglutinin enthält, Differenzierungen in der Typhus-Paratyphus-Gruppe durchführen, wenn man als Kriterium nicht die Agglutination, sondern die Immobilisation verwendet, für deren Zustandekommen nur die Geißelagglutinine maßgebend sind.

b) Die S- und R-Formen und die diphasische Variation²⁾.

Mittlerweile hatten amerikanische und englische Autoren, wie u. a. *Smith* und *Reagh*³⁾, *Bayer* und *Reagh*⁴⁾, *Smith* und *Tenbroeck*⁵⁾, *Arkwright*⁶⁾, *Schuetze*⁷⁾, *Orcutt*⁸⁾, *Burnet*⁹⁾ u. a. bei einer Reihe von Bakterien, z. B. der Salmonella- und Dysenteriegruppe, das Antigen in ein „somatisches“ Antigen des Zelleibes und in ein Geißel-Antigen¹⁰⁾ unterschieden, denen verschiedene Agglutinine mit verschiedener Hitzestabilität entsprechen. Ferner ließen sich kulturell glatt (smooth = s) und rauh (rough = r) wachsende Kolonien bei gleichen Stämmen unterscheiden, deren immunisatorisch gewonnene Agglutinine ebenfalls serologisch verschieden waren.

In der Folge wurde dann von *Arkwright* und *Goyle*¹¹⁾, *Goyle*¹²⁾ u. a. versucht, die Befunde von *Weil* und *Felix* mit denen der englischen und amerikanischen Forscher in Beziehung zu bringen. Danach kommen bei Bakterien der Salmonellagruppe zunächst meist reversible Variationen

¹⁾ *Mandelbaum*, Berl. Mikrob. Gesellsch. 18. I. 1932, ref. Zbl. Bakt. **105**, 377 (1932).

²⁾ Eine Übersicht über dieses Gebiet findet sich u. a. in *Arkwright's* Arbeit über Agglutination in „A system of Bacteriology“. *Medic. Res. Council Bd.* 6 (London 1931).

³⁾ *Smith* und *Reagh*, *Journ. medic. Res.* **10**, 89 (1903/04).

⁴⁾ *Bayer* und *Reagh*, *Journ. medic. Res.* **12**, 313 (1904).

⁵⁾ *Smith* und *Tenbroeck*, *Journ. medic. Res.* **35**, 97 (1914/15).

⁶⁾ *Arkwright*, *Journ. of Path.* **23**, 358 (1919/20); **24**, 36 (1920/21).

⁷⁾ *Schuetze*, *Journ. of Hyg.* **20**, 332 (1921).

⁸⁾ *Orcutt*, *Journ. exper. Med.* **40**, 43 (1924).

⁹⁾ *Burnet*, *Brit. Journ. exper. Path.* **5**, 251 (1924).

¹⁰⁾ Neuerdings nimmt *Pijper*, *Zbl. Bakt.* **123**, 195 (1931), die peritriche Begeißelung der Typhusbazillen als Kunstprodukt an. In Bouillon soll der Ty. baz. nur 2 Geißeln haben.

¹¹⁾ *Arkwright* und *Goyle*, *Brit. Journ. exper. Path.* **5**, 104 (1924).

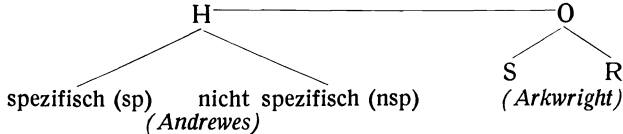
¹²⁾ *Goyle*, *Journ. of Path.* **29**, 149 (1926).

vor zwischen beweglichen, begeißelten Formen mit sowohl thermolabilem H- als auch thermostabilem O-Antigen einerseits und andererseits unbeweglichen unbegeißelten Formen mit thermostabilem O-Antigen.

Dann haben *Andrewes* [1922¹⁾] und *Krumwiede, Cooper und Proost*²⁾ den Begriff der „diphasischen Variation“ eingeführt, d. h. einer meist sprunghaften Dissoziation des labilen H-Anteils in zwei serologisch verschiedenen Formen, von denen die eine für den zugehörigen Bazillentypus spezifisch, die andere unspezifisch ist. Mit anderen Worten: Es ist möglich, daß die Kolonien eines und desselben Bazillenstammes serologisch verschieden sind³⁾. Diese diphasische Variation ist nicht dasselbe wie die Unterscheidung in R- und S-Formen. Letztere Formen stellen nicht immer reversible Variationen dar zwischen dem normalen spezifischen O-Anteil = S-Form und einem davon serologisch verschiedenen O-Anteil mit einer geringeren Spezifität = R-Form.

Wenn alle diese Beziehungen auch durchaus nicht vollständig sind und andererseits Unregelmäßigkeiten wie auch Zwischenformen vorkommen, so wird doch das folgende Schema (*Schuetze*) zur Klärung der verwickelten Verhältnisse beitragen:

Schema eines diphasischen Salmonellastammes (z. B. Paratyphus B) mit seinen möglichen Variationen:



Da das H-Antigen nach *Andrewes* bei manchen Salmonellen entweder in der spezifischen oder in der unspezifischen Phase vorkommt, das O-Antigen entweder in der S- oder in der R-Form, kann ein beweglicher diphasischer Organismus, wie z. B. Paratyphus B, in folgenden Formen vorkommen:

- | | | |
|-------------------------------|-------------|------------|
| 1. beweglich nicht spezifisch | glatt = nsp | HS-Antigen |
| 2. beweglich spezifisch | glatt = sp | HS-Antigen |
| 3. beweglich nicht spezifisch | rauh = nsp | HR-Antigen |
| 4. beweglich spezifisch | rauh = sp | HR-Antigen |
| 5. nicht beweglich | glatt = | S-Antigen |
| 6. nicht beweglich | rauh = | R-Antigen. |

Während es zwischen den spezifischen und unspezifischen Phasen anscheinend keine Übergangsformen gibt, gibt es deren viele zwischen völlig R und völlig S, da die R-Formen eine lösliche spezifische Substanz nicht besitzen und dieser Verlust völlig oder nur partiell sein soll. Dazu kommt nun noch die bereits von *Felix* und *Weil* betonte verschiedene

¹⁾ *Andrewes*, Journ. of Path. **25**, 505 (1922); **27**, 345 (1925).

²⁾ *Krumwiede, Cooper und Proost*, Journ. of Immun. **10**, 55, 152 (1925); ausführliche Literatur.

³⁾ Lit. bei *Savage* und *Bruce White*, Med. Res. Council. Spec. Report. Series. **91** (1925); **103** (1926).

Art der Agglutination, ob fein- oder grobflockig, die *Fr. Kauffmann* folgendermaßen zusammenfaßt:

„Dem thermolabilen H-Antigen entspricht (bei den Salmonella-Bakterien) eine flockige, lose, schnell eintretende, leicht zerschüttelbare, wolkenartige, auch schneeflockenartige, graue H-Agglutination, dem thermostabilen O-Antigen im Gegensatz hierzu eine körnige, feste, langsamer eintretende, schwer zerschüttelbare, hagelkornartige, oft scheibenförmige und fetzige, weiße O-Agglutination.“ (Im folgenden sei die erstere als flockige und die zweite als körnige bezeichnet und in diesem Sinne von einem flockulären und granulären Antigen gesprochen.)

Unter Zugrundelegen der englischen Arbeiten, besonders der Arbeit von *Bruce White*¹⁾, ist es dann durch zahlreiche deutsche Arbeiten gelungen, in den großen Wirrwarr der Salmonellagruppe ein ordnendes Prinzip zu bringen. So ließ sich mit Hilfe des thermostabilen O-Antigens die Typhus-Paratyphusgruppe in 4 große Gruppen einteilen, so daß es mit Anwendung gekochter Bazillenaufschwemmungen und wirksamen O-Seren der 4 Gruppen mit Leichtigkeit gelingt, einen fraglichen Paratyphusstamm in eine der 4 Gruppen einzuordnen. Die weitere Typeneinteilung der 4 Gruppen ist unter Berücksichtigung des thermolabilen H-Antigens, und zwar deren spezifischer Phase mit Hilfe typenspezifischer Immunsera und kultureller Methoden durchführbar. Zur Typenumwandlung bemerkt *Kauffmann*, daß bisher in der gesamten Typhus-Paratyphus-Literatur noch kein Fall sichergestellt ist.

Weitere Einzelheiten dieser Arbeiten, die mehr bakteriologischen Charakter haben, hier zu bringen, würde den Rahmen des vorliegenden Buches überschreiten. Es sei daher auf die Arbeiten von *Kauffmann* verwiesen²⁾.

c) Die kritischen Arbeiten von Tulloch.

Während die englischen und amerikanischen Arbeiten über die antigenen Variationen bei Salmonellen u. a. Bakterien in Deutschland Eingang und Bestätigung und weiteren Ausbau erfahren haben, sind die Argumente von *Tulloch's* Kritik nicht in gleichem Maße bekannt geworden, was wohl in erster Linie darauf zurückzuführen ist, daß diese ausführliche Arbeit von *W. J. Tulloch*, „A critical review of the present position of bacterial agglutination“ in einer in Deutschland wenig gelesenen Zeitschrift erschien [Journ. Army med. Corps 48, 96, 192, 267, 358, 435 (1917)]. Deswegen sei an dieser Stelle etwas breiter auf die Ausführungen von *Tulloch* eingegangen, soweit sie die drei ersten Arbeiten betreffen:

Haben wir wirklich Beweise für die Annahme, daß Bakterien aus einem „Mosaik“ von Antigen bestehen?

a) Der Schluß, daß eine Substanz ein Antigen ist, wenn wir den entsprechenden Antikörper nachweisen und umgekehrt nicht antigen gewirkt hat, wenn wir in vitro keinen Antikörper nachweisen können, ist erstens nicht zwin-

¹⁾ *Bruce White*, A system of Bacteriology, Bd. IV (London 1929).

²⁾ *Kauffmann*, Ztschr. Hyg. 110, 526, 537, 556 (1929); 111, 749 (1930); Dtsch. med. Wschr. 1930, 1339; Zbl. Hyg. 25, 273 (1931); dort alle Literatur bis April 1931.

gend und setzt zweitens voraus, daß unsere Invitroreaktionen bezüglich ihrer Feinheit und Spezifität mit den Invivovorgängen Hand in Hand gehen, was aber nicht der Fall ist, denn wir können bestimmte Antigene nicht in vitro nachweisen, wohl aber durch ihre Reaktionen in vivo. Zum Beispiel vermag erhitzte Geißelsubstanz in vivo Agglutinin zu bilden, nicht aber in vitro auf Agglutinin zu reagieren (*Orcutt*). Wenn auch hier das Erhitzen die Sachlage verwickelt, so bieten die Arbeiten von *Krumwiede* u. a. auch Beispiele ohne Erhitzung; z. B. vermag der degradierte Paratyphus X¹ eines ursprünglichen Paratyphus X im Tierkörper Agglutinin zu bilden gegen einen Paratyphus Y, der sich aber nicht durch das X₁-Antigen aus dem Serum absorbieren läßt, d. h. also, daß ein Antigen existieren kann, ohne durch die üblichen Invitro-Methoden nachweisbar zu sein.

b) Bei Salmonellen hat man aus den Beobachtungen gefolgert:

Das Geißelantigen ist thermolabil und gibt eine grobe, flockuläre Agglutination, die stammspezifisch ist. Das Soma-Antigen ist thermostabil und gibt eine feine granuläre Agglutination, die nicht spezifisch ist. Damit wird angenommen, daß es in den Bakterien zwei Antigene gibt, von denen das eine durch Hitze zerstört, ohne daß das andere geändert wird. Man könnte sich aber auch vorstellen, entweder, daß es nur ein Antigen gibt, das jedoch unter den Versuchsbedingungen flockulär, granulär oder gar nicht agglutiniert, oder daß es ein einziges Antigen gibt, das durch die Hitzeeinwirkung in ein anderes umgewandelt wird. Für diese Möglichkeit zeigen die Anaphylaxieversuche von *Besredka*¹⁾ mit nativem und gekochtem Hühnereiweiß, daß der Organismus zwischen erhitztem und nicht erhitztem Proteinantigen unterscheiden kann.

Nun warnen die folgenden Beispiele der Qualität der Agglutination, ob fein oder grob, für die Frage der Spezifität eine Bedeutung zuzuerkennen, denn bei der Coli-Typhus-Enteritis-Gruppe soll das spezifische Antigen das thermolabile, grob flockulär agglutinierende sein, während bei der Proteusgruppe das thermostabile, granulär (fein) agglutinierende Antigen das spezifische sein soll. Die Proteus-X-Stämme werden von Fleckfieberserum granulär agglutiniert, genau so wie durch Immuserum, was durch Immunisierung mit dem stabilen, granulären Antigen von Proteusbazillen gewonnen ist, obwohl in dem Fleckfieberserum echte Antikörper gegen Proteusbazillen nicht nachgewiesen sind.

Bei aller Anerkennung der Tatsachen ist es nicht ratsam, bei unserem gegenwärtigen Wissen irgendeine Art des Agglutinationsvorganges mit einem gewissen Bestandteil des Bact. in Beziehung zu bringen, ob dieser Bestandteil nun eine biologische Einheit, wie die Substanz der Geißeln oder des Zellleibes ist, oder erst dadurch in die Erscheinung tritt, daß man durch Hitzeeinwirkung mit der Absicht, den einen oder anderen Bestandteil zu zerstören, den Reaktionstypus ändert. Ergaben doch Versuche von *Tulloch*, daß bereits so geringe Eingriffe wie Waschen in Aqua dest. weitgehenden Einfluß auf die antigene Eigenschaft in vivo und in vitro einer Bakteriensuspension haben können. Der Einfluß von Hitze ist noch größer und stellt eine progressive hydrolytische Veränderung des Eiweißes dar, die nachweislich bei verschiedenen Stämmen derselben Art verschieden sein kann. Und doch entfernt bei Salmonellen selbst Kochhitze nicht immer das sogenannte thermolabile flockuläre Antigen für Invivoversuche, während doch 70° bereits dessen Nachweis in vitro aufhebt.

Nach *Tulloch* ist die Bakterienzelle eine Einheit, bei der die Hitzeeinwirkung alle Komponenten beeinflußt. Nur erlaubt es die Struktur der Bakterienzelle nicht, die Antigene nach Art der Globulin- und Albumintrennung beim Serum

¹⁾ *Besredka*, Ann. Inst. Pasteur 25, 392 (1911).

zu trennen. Anstatt für jede beobachtete Reaktion ein gesondertes Antigen anzunehmen, wird nur ein Antigen vorausgesetzt, nämlich die Gesamtheit der Bakterienzelle und die zweifellos vorhandenen Unterschiede in der Art der Reaktion vor und nach Hitzeeinwirkung beruhen auf physikalischen Änderungen des Antigens, die sich einmal in Hemmung, dann aber auch in Steigerung der Agglutinabilität äußern können. Jedenfalls kann von einer durchgreifenden regelmäßigen Beziehung zwischen Geißel- oder ähnlichem Antigen mit Thermostabilität und grobflockender Agglutination einerseits und somatischem thermostabilem Antigen mit granulärer feinflockiger Agglutination andererseits nicht die Rede sein.

c) Was nun die R- und S-Typen von Kolonien und deren Beziehung zur Thermostabilität der Antigene betrifft, so kommen zweifellos Variationen im Charakter der Kolonien vor; ob diesen aber die Bedeutung einer Art-Variation zukommt, ist doch fraglich. Zur Charakterisierung einer R-Form könnte man folgendes anführen:

1. Rauheit, unregelmäßiges und trübes Aussehen der Kolonie.
2. R-Bakteriensuspension flockt durch NaCl-Lösung auch ohne Immunsorum.
3. Besondere Art der R-Agglutination mit Immunsorum.

Eine Beziehung zwischen 1. und 2. ist nach *Schuetze* sicher nicht vorhanden und mit *Tulloch* sind auch andere Autoren darin einig, daß sowohl S- als auch R-Kolonien spezifische wie auch Gruppenreaktionen geben können, so daß also zwischen den Formen der Kolonien und der Spezifität keine konstanten Beziehungen bestehen. Zwischen 1. und 3. und zwischen 2. und 3. besteht auch kein fester Zusammenhang, denn sowohl ein R-Stamm im Sinne von 1. wie ein R-Stamm im Sinne von 2. können mit Immunsorum auch grobflockig agglutinieren, so daß also die R-Eigenschaft nicht notwendig mit dem Verlust eines bestimmten Antigens verbunden zu sein braucht.

Man sieht, daß es bisher nicht möglich gewesen ist, eine einwandfreie Definition der R-Eigenschaft zu geben. Nichtsdestoweniger sind auf Grund von serologischen Invitroreaktionen, deren Anwendbarkeit in diesen Fragen bereits zu Zweifeln Veranlassung gibt, Folgerungen von weitgehender Bedeutung gezogen werden. *Savage* und *Bruce White* (*Medic. Res. Council spec. Rep. Series No. 91*) geben eine Zusammenfassung der Beziehung von R- und S-Stämmen der Salmonellen, der man folgendes entnehmen kann:

A. Das flockige Antigen von S- ist qualitativ identisch mit dem in R-Stämmen. In letzteren kann es aber reduziert vorhanden sein oder gänzlich fehlen. Vergleicht man R- und S-Stämme, dann neigt R zu granulierter und S zu flockulärer Agglutination.

B. Die grobflockigen Agglutinine in den aus R- und S-Stämmen gewonnenen Immunsoren sind qualitativ identisch, aber in den R-Seren kann das grobflockige Agglutinin reduziert sein oder sogar fehlen.

Wenn *Bruce White's* Beobachtungen dies auch zu bestätigen scheinen, so bleibt doch die Schwierigkeit, daß zwischen A und B keine bestimmte Beziehung besteht.

Man kann (z. B. durch Erhitzen, Waschen, Behandeln mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammon.-Oxalatlösung) grob flockende Suspensionen so beeinflussen, daß sie nicht mehr grob flocken, aber dies braucht man nicht so zu deuten, als wäre den Bakterien das grobflockende Antigen entzogen worden. Zum Beispiel:

Der zunächst sehr hitzeempfindliche Stamm Aetrycke 49 wurde nach $\frac{1}{2}$ Stunde 60° so verändert, daß er nur noch körnig und nur bis $\frac{1}{100}$ mit einem Serum agglutinierte, das durch Immunisierung mit den gleichen aber 35 Minuten

bei 65° erhitzten Bakterien gewonnen war und welches die unerhitzten Bakterien bis $\frac{1}{12800}$ agglutinierte.

Also nach A. müßten die Bakterien das grobflockende Antigen verloren haben, aber nach B. müßten sie es noch enthalten.

Ferner geht aus einem Versuch von *Orcutt* hervor, daß ein mit reinen Geißeln hergestelltes Serum die Geißeln allein nur bis $\frac{1}{230}$, die ganzen beweglichen Bakterien bis $\frac{1}{5000}$ und die nicht beweglichen Bakterien überhaupt nicht agglutinierte, woraus die große Bedeutung erhellt, die ganz allgemein bei jedem Agglutinationsvorgang dem physikalischen Zustand der reagierenden Substanzen zukommt.

Die weiteren Schlußfolgerungen von *Bruce White* bedeuten, daß in der Erwerbung eines neuen granulären Antigens von Seiten der R-Organismen das eigentliche serologische Problem liegt, d. h. das granuläre Antigen der S-Form ändert sich in, oder geht verloren, oder wird ersetzt durch ein dem R-Typus besonders zukommendes granuläres Antigen, das auch thermostabil ist, sich aber doch von dem thermostabilen Antigen der S-Form unterscheidet. Diese sich scheinbar zwangsläufig aus den Beobachtungen ergebende Annahme hat aber zur Voraussetzung, daß die Begriffe „R“ und „thermostabil“ definierbar sind, und daß der Antigenbegriff sowohl in Vitro- als auch in Vivo-Versuchen genügt. Das trifft aber nicht zu. Besonders letzteres geht aus den Arbeiten von *Goyle* hervor.

Das Hauptgewicht liegt bei der Frage: Ist das granuläre Antigen der O-S-Form gleich mit oder verschieden von dem granulären Antigen der O-R-Form? *White*, *Goyle* u. a. nehmen eine Verschiedenheit an, aber es erscheint doch zweifelhaft, ob ihre Versuche diese Verschiedenheit beweisen. Andererseits ist nicht bewiesen, daß sie gleich sind.

Eine Notwendigkeit, die Bildung eines besonderen neuen granulären Antigens in der R-Form anzunehmen, liegt nicht vor, denn dieses Antigen mag bereits in der S-Form vorhanden sein, nur in einem Zustand, der seinen Nachweis durch die benutzten Invitromethoden nicht gestattet. Oder aber das R-gruläre Antigen stellt nur eine Modifikation des O-grulären Antigens dar in Analogie zur bekannten Tatsache, daß die Einwirkung verschiedenster physikalischer Einflüsse auf ein Antigen dessen immunbiologische Reaktion weitgehend verändern kann. Es ist durchaus im Rahmen der Möglichkeit, daß auch im Laufe der Kultivierung physikalische Einflüsse auf die Bakterienzelle einwirken, so daß die Änderung von S in R und die Änderung von O-S-grulärem Antigen zu O-R-grulärem Antigen eine rein physikalische Änderung darstellt, die die Bakterienzelle als Ganzes trifft und nicht notwendig nur eine Änderung eines einzelnen Bestandteiles darstellt.

d) Was die diphasische Variation von *Andrewes* und *Krumwiede* anbetrifft, so ist an der Tatsache, daß gewisse Bakterien sowohl in der S- wie auch in der R-Form spezifische und Gruppeneigenschaften aufweisen können, nicht zu zweifeln, wohl aber kann man über die theoretische Deutung anderer Meinung sein.

Andrewes nimmt an, daß es die gleiche Bakteriensubstanz ist, die in vivo Agglutinin bildet und in vitro Agglutinin bindet und schließt aus seinen Zahlen, daß die gruppenspezifische Phase nur etwa $\frac{1}{100}$ der in der spezifischen Phase enthaltenen antigenen Substanz darstellt. Ist nun dieser Überschuß an einem gewissen spezifischen Antigen in der spezifischen Phase und an einem gewissen Gruppenantigen in der nichtspezifischen Phase nicht nur scheinbar? Die Annahme einer rein quantitativen Differenz in der Menge der beiden Antigene in den beiden Phasen setzt voraus, daß die beiden spezifischen und Gruppenantigene bei der Immunisierung Agglutinine erzeugen, die ihrer jeweiligen

Menge proportional ist. Dies trifft aber nicht zu, wie *Andrewes* selbst zugibt, und für Präzipitine auch von *Hektoen* später erwiesen wurde. Blicke also eine nur qualitative Verschiedenheit der gleichen Antigene in gleichen Mengen in beiden Phasen, die in einem verschiedenen physikalischen Zustand bestehen könnte und sich darin äußert, daß bei der Immunisierung der Anreiz zur Agglutininbildung sehr verschieden stark ist und daher entweder fast nur spezifische oder fast nur Gruppenagglutinine gebildet werden. Wenn also die Bedeutung der diphasischen Variation für die Differenzierung speziell der *Salmonellen* unbestritten ist, so bleibt es doch zweifelhaft, ob damit wirkliche Art-Variationen vorliegen.

d) Die Haptene der Bakterien (Lipoide und Polysaccharide).

Die Aufspaltung des Antigenkomplexes der Bakterienzelle ist nun noch weiter, und zwar in chemischer Richtung fortgeschritten. Bekanntlich gelang es, aus dem Antigenkomplex neben dem Eiweiß Kohlehydrate und Lipoide zu isolieren und deren antigene Funktionen soweit zu klären, daß man heute bei zwei Klassen natürlich vorkommender Nichteiweißantigene: Polysaccharide und *Forssman'sches* Antigen, deren Eigenschaften mit der Annahme erklären kann, daß ihre antigene Funktion dem Proteinkomplex als ganzem zwar die strenge Spezifität verleiht, aber daß diese Stoffe selbst nur einen kleinen Teil des Gesamtantigens darstellen. Dank der Kenntnis dieser Stoffe darf heute die Differenzierung gewisser Bakterien in einzelne wohl unterscheidbare Typen als eine gesicherte Tatsache gelten.

Am genauesten ist diese Typisierung bei den *Pneumokokken* durchgeführt.

Dochez und *Avery*¹⁾ wiesen 1917 in Kulturfiltraten von *Pneumokokken* wie auch im Blut und Urin *Pneumoniekranker* lösliche typenspezifische Substanzen nach, die nicht dialysierbar und durch Kochen und Trypsin nicht angreifbar waren, sowie durch Alkohol, Azeton und Äther aus ihren Lösungen gefällt werden konnten. 1923 stellten *Zinsser* und *Parker*²⁾ aus *Pneumokokken*, *Staphylokokken*, Typhus-, Influenza- und Tuberkelbazillen alkoholunlösliche, keine Eiweißreaktion gebende, hitzebeständige „Residualantigene“ dar, die, wenn sie auch keine Antikörper erzeugten, doch mit Antisera spezifische Präzipitation gaben und die sie identisch mit den typenspezifischen Substanzen von *Dochez* und *Avery* hielten. *Heidelberger* und *Avery*³⁾ beschrieben 1923 die Herstellung hochaktiver Substanzen aus Typ II *Pneumokokken*, 1924⁴⁾ auch aus Typ I und III *Pneumokokken* und mit einer verbesserten Technik stellten *Heidelberger*, *Goebel* und *Avery* 1925⁵⁾ diese löslichen spezifischen Substanzen so weitgehend rein dar, daß ihre Bedeutung für die Typenspezifität sich nicht mehr auf andersartige Beimengungen zurückführen lassen konnte.

Es handelt sich um chemisch unterscheidbare verschiedene Polysaccharide, die keine Jodreaktion geben, der Einwirkung von Amylase widerstehen, weder

1) *Dochez* und *Avery*, Journ. exper. Med. 26, 477 (1917).

2) *Zinsser* und *Parker*, Journ. exper. Med. 37, 275 (1923).

3) *Heidelberger* und *Avery*, Journ. exper. Med. 38, 73 (1923).

4) *Heidelberger* und *Avery*, Journ. exper. Med. 40, 301 (1924).

5) *Heidelberger*, *Goebel* und *Avery*, Journ. exper. Med. 42, 727 (1925).

S noch P enthalten, keine Biuretreaktion, wohl aber starke Molisch-Reaktion geben. Fehling'sche Lösung wird nur nach Hydrolyse in Säure reduziert. Die lösliche spezifische Typ II-Substanz ist N-frei-rechtsdrehend und liefert bei der Hydrolyse Glukose (bestätigt von *Saito* und *Ulrich*¹⁾). Die Typ III-Substanz ist N-frei-linksdrehend und gibt wenig Glukose bei der Hydrolyse [*Heidelberger* und *Goebel*²⁾]. Die Typ I-Substanz hat 5 Proz. N, ist sehr stark rechtsdrehend und gibt bei der Hydrolyse reduzierende Zucker, die von den bei Typ II und III gefundenen verschieden sind und vielleicht u. a. Galakturonsäure enthalten.

Im Gegensatz zu den hochgradig typenspezifischen Polysacchariden sind die Bakterienproteine nach *Avery* und *Heidelberger*³⁾) artspezifische Vollantigene. Dieser Art- und Typengegensatz von Antigenen und Antikörpern bei den Pneumokokken wurden dann von *Avery* und *Morgan*⁴⁾, *Avery* und *Neill*⁵⁾) und *Avery* und *Heidelberger*⁶⁾) näher analysiert.

Danach ist allen Pneumokokken ein Nukleoprotein (Pr) gemeinsam, das ein Vollantigen ist und bei der Immunisierung ein Antiserum liefert, das in artspezifischer Weise mit allen Pneumokokkenstämmen reagiert. Bei virulenten Stämmen ist außer der Pr-Substanz noch das Polysaccharid (K) als typenspezifische Substanz vorhanden⁷⁾). In reiner Lösung gibt die K-Substanz mit den Antiseren, die durch Immunisierung mit virulenten Stämmen hergestellt sind, eine strenge typenspezifische Präzipitation, ist aber allein nicht imstande, typenspezifische, in vitro durch Agglutination oder Präzipitation nachweisbare Antikörper zu bilden. Die K-Substanz ist also in diesem Sinne ein Hapten. Aber im Gegensatz zu Lipoiden, die auch Hapten-Natur haben und durch bloßes Mischen mit geeignetem Eiweiß (Schweineserum) zu Vollantigenen aktiviert werden können, ist eine bloße Mischung von Pr- und K-Substanzen der Pneumokokken in dieser Hinsicht wirkungslos. Das K ist nur in einer festen Verbindung mit dem Pr, wie sie in den nativen, vollvirulenten Pneumokokken vorhanden ist, als Antigen wirksam. Um also in vitro das K zum Vollantigen aktivieren zu können, bedarf es der Herstellung fester Adsorptions- oder chemischer Verbindungen, wie wir weiter unten sehen werden.

Da selbst in jungen Kulturen virulenter Pneumokokken der Pr-K-Komplex teilweise dissoziiert, wobei das K in Lösung geht, so liefert die Immunisierung mit solchen Vollkulturen neben typenspezifischen Antikörpern auch artspezifische, da ja die in Lösung befindlichen dissoziierten Pr- und K-Substanzen nicht ein K-spezifisches Antigen darstellen, sondern

¹⁾ *Saito* und *Ulrich*, Ztschr. Hyg. **109**, 163 (1928).

²⁾ *Heidelberger* und *Goebel*, Journ. biol. Chem. **70**, 613 (1926); **74**, 613 (1927)

³⁾ *Avery* und *Heidelberger*, Journ. exper. Med. **38**, 81 (1923).

⁴⁾ *Avery* und *Morgan*, Journ. exper. Med. **42**, 347 (1925).

⁵⁾ *Avery* und *Neill*, Journ. exper. Med. **42**, 355 (1925).

⁶⁾ *Avery* und *Heidelberger*, Journ. exper. Med. **42**, 367 (1925).

⁷⁾ Vielleicht ist die K-Substanz auch in avirulenten Stämmen vorhanden, aber in einem andersartigen strukturellen Verband mit den Proteinen.

nur das Pr allein in artspezifischem Sinne wirkt. Daher gibt ein solches Serum auch mit avirulenten eine Agglutination, sowie mit Kulturfiltraten eine (feinflockige) Präzipitation, kann daher ein Übergreifen der Typenspezifität vortäuschen, während das typenspezifische Agglutinin sowohl das Vollantigen wie auch die homologe K-Lösung grobflockig ausfällt (auf die mögliche Ursache der fein- resp. grobflockigen Fällung kommen wir später zu sprechen). Während nun die K-Substanz hitzebeständig ist, wird die Pr-Substanz durch Erhitzen weitgehend ihrer antigenen Fähigkeit beraubt, aber nicht soweit, daß sie im nativen Verband im Pr-K-Komplex nicht noch das K zum Vollantigen zu aktivieren vermag (auch selbst bei völliger Denaturierung durch Hitze würde wahrscheinlich der Pr-K-Komplex noch typenspezifisch antigen wirken können, solange die adsorptive Bindung der beiden Komponenten bestehen bleibt). Dadurch gelingt es, mit erhitzten jungen Kulturen virulenter Pneumokokkenstäme fast reine typenspezifische Sera zu erhalten, die sich andererseits nur durch Absorption der artspezifischen Pr-Agglutinine mittels avirulenter Pneumokokken gewinnen lassen.

Avery und Mitarbeiter nehmen das Polysaccharid der Pneumokokken im wesentlichen in der Kapselsubstanz an und erklären die leichte Reaktionsfähigkeit der Zelle auf typenspezifische Sera durch die Außenlage des Polysaccharides.

Auf Grund der Arbeiten von Avery stellte Toenniesson¹⁾ das Polysaccharid eines Friedländerbazillus dar, das von Mueller, Smith und Litarczek²⁾ genauer untersucht wurde: 1,3 Proz. N, etwas P, kein S, gibt nach Hydrolyse reduzierende Zucker. Heidelberg, Goebel und Avery³⁾ fanden das Polysaccharid vom Friedländerbazillus Typ B (Einteilung nach Julianette) N-frei, rechtsdrehend und nach Hydrolyse Glukose bildend, und konnten ferner feststellen, daß das Typ II-Pneumokokken- und das Friedländer-Typ B-Polysaccharid zwar nicht identisch, aber doch sehr nahe verwandt sind. Das Polysaccharid von Typ A Friedländers Bazillus ist nach Goebel und Avery⁴⁾ linksdrehend und nach Goebel⁵⁾ dem Polysaccharid des Typ III Pneumokokkus nahe verwandt. Das Typ C-Friedländer-Polysaccharid ist rechtsdrehend. Beide A- und C-Polysaccharide sind starke Säuren und reduzieren Fehling'sche Lösung erst nach Hydrolyse.

Müller und Tomcsik⁶⁾ stellten aus Hefe ein Polysaccharid dar, das in der reinsten Form noch etwas P und etwas N enthielt, jedoch letzteres aus Immunisierungsversuchen zu schließen, nicht in der Form von Protein. Laidlaev und Dudley⁷⁾ erhielten aus humanen Tuberkelbazillen eine haptene hochspezifische Substanz, die nach Säurehydrolyse Fehling'sche Lösung reduzierte, zwar keine Glukose, aber bis zu 20 Proz. Pentosen gab. 1926 gewann Müller eine sehr

¹⁾ Toenniesson, Zbl. Bakt. **85**, 225 (1921).

²⁾ Mueller, Smith und Litarczek, Proc. Soc. exper. Biol. New York **22**, 373 (1924/25).

³⁾ Heidelberg, Goebel und Avery, Journ. exper. Med. **42**, 701, 727 (1925).

⁴⁾ Goebel und Avery, Journ. exper. Med. **46**, 601 (1927).

⁵⁾ Goebel, Journ. biol. Chem. **74**, 619 (1927).

⁶⁾ Müller und Tomcsik, Journ. exper. Med. **40**, 343 (1924).

⁷⁾ Laidlaev und Dudley, Brit. Journ. exper. Path. **6**, 197 (1925).

ähnliche Substanz aus Alt-Tuberkulin. Nach unveröffentlichten Versuchen von *J. Hirsch* enthalten auch Diphtheriebazillen komplexe Polysaccharide, die nach Hydrolyse vornehmlich Pentosen liefern.

*Tomcsik*¹⁾ isolierte ein 0,9 Proz. N enthaltendes Polysaccharid aus *B. lactis aerogenes* und eine gleichfalls sehr individuell spezifische Substanz aus kapseltragenden Colibazillen. Da sich typenspezifisches Polysaccharid auch bei nicht kapseltragenden Meningo-, Viridans-Streptokokken usw. [*Przesmycki*²⁾, *Hitchcock*³⁾, *R. Lancefield*⁴⁾] fand, so darf die Bedeutung der Kapselsubstanz als Träger des Polysaccharids nicht verallgemeinert werden, es sei denn, daß auch solche Bakterien Kapseln haben, diese aber zu klein sind, um mikroskopisch wahrnehmbar gemacht werden zu können. Ferner gelang es *Landsteiner* und *Levine*⁵⁾ aus Cholerabazillen und *Furth* und *Landsteiner*⁶⁾ aus Typhus-, Paratyphus B-, Enteritis-*Proteus*-Bazillen praktisch eiweißfreie Polysaccharid-Komplexe von Haptencharakter zu isolieren. *White*⁷⁾ konnte aus den S-, nicht aus den R-Varianten von Organismen der *Salmonella*-Gruppe spezifische Polysaccharide herstellen und *Morgan*⁸⁾ aus S-Varianten der Shigabazillen.

Besonders interessant sind die Feststellungen von *R. Lancefield*⁹⁾ an Streptokokken.

Sie konnte aus hämolytischen Streptokokken neben dem Protein, das wegen seines Übergreifens auf Pneumo- und Viridans-Streptokokken gruppenspezifisch war, noch zwei andere Substanzen isolieren: Einen A-Körper mit 4,2 Proz. N, dessen grobflockige Agglutination jedoch in diesem Falle im Gegensatz zu der K-Agglutination bei Pneumokokken art- und nicht typenspezifisch war, und einen typenspezifischen Stoff „M“, der jedoch 14 Proz. N hat, durch Trypsin- und Pepsin-Einwirkung zerstörbar ist und trotz dieses anscheinenden Eiweißcharakters doch bezgl. Immunisierung ein Hapten darstellt. Ein mit intakten Streptokokken hergestelltes Antiserum reagiert mit allen 3 Substanzen, aber das mit keimfreiem Filtrat oder Autolysat hergestellte Serum reagiert nur mit der artspezifischen Substanz.

Die antigene Struktur der hämolytischen Streptokokken ist aber nur scheinbar komplexer wie die der Pneumokokken, denn aus letzteren konnten noch verschiedenartige andere antigene Substanzen gewonnen werden: unter anderen z. B. die von *L. A. Julianelle* und *H. A. Reimann*¹⁰⁾ gewonnene thermostabile, durch Trypsin zerstörbare Substanz, die bei Tieren Purpura erzeugte, ferner die von *Enders*¹¹⁾ in Typ I-Kulturen nachgewiesene Substanz, die vom Kohlehydrat verschieden war, in schwach alkalischer Lösung durch Hitze zerstörbar, aber in schwach saurer Lösung

1) *Tomcsik*, Proc. Soc. exper. Biol. New York **34**, 810, 812 (1926/27).

2) *Przesmycki*, Journ. inf. Dis. **35**, 537 (1924).

3) *Hitchcock*, Journ. exper. Med. **40**, 575 (1924).

4) *R. Lancefield*, Journ. exper. Med. **42**, 377 (1925).

5) *Landsteiner* und *Levine*, Journ. exper. Med. **46**, 213 (1927).

6) *Furth* und *Landsteiner*, Journ. exper. Med. **47**, 171 (1928).

7) *White*, Journ. of Path. **30**, 113 (1927); **31**, 423 (1928); **32**, 85 (1929).

8) *Morgan*, Brit. Journ. exper. Path. **12**, 62 (1931).

9) *Lancefield*, Journ. exper. Med. **42**, 377, 397 (1925); **47**, 91, 469, 481 (1928).

10) *Julianelle* und *H. A. Reimann*, Journ. exper. Med. **43**, 87 (1926); **45**, 609 (1927).

11) *Enders*, Journ. exper. Med. **52**, 235 (1930).

relativ thermostabil war (da sie eine halbe Stunde 100° vertrug). *Tillet, Goebel* und *Avery*¹⁾ haben in Pneumokokken ein Polysaccharid gefunden, welches im Gegensatz zu dem typenspezifischen Polysaccharid nur artspezifisch ist, indem es mit Pneumokokkenserum aller drei Typen Präzipitinreaktion gibt. Dieser Stoff ist N-haltig, aber eiweißfrei und nicht als solcher antigen für Agglutininbildung, wohl aber vermag er immunisatorisch Schutzwirkung zu entfalten und diese Wirkung wird weder durch Pepsin noch Trypsin beeinträchtigt.

Heidelberger und *Kendall*²⁾ isolierten aus einem Pneumokokkenstamm der Gruppe IV drei verschiedene N-haltige Polysaccharide:

1. ein typenspezifisches von den I, II und III typenspezifischen Polysacchariden verschiedenes Polysaccharid, das sehr arm an N- und nach Hydrolyse relativ reich an reduzierenden Zuckern ist.

2. eine chemisch ähnliche Substanz ohne spezifische Funktion und

3. ein artspezifisches Kohlehydrat, analog dem von *Tillet, Goebel* und *Avery* gefundenen, was aber zum Unterschied von den analogen Substanzen der I-, II- und III-Typen phosphorhaltig ist. Der Phosphor ist so fest gebunden, daß er erst nach Hydrolyse nachweisbar ist.

Andererseits haben *Schiemann* und dessen Mitarbeiter³⁾ experimentell zeigen können, daß die Annahme von *Perlzweig* und *Steffen* (1923), über die Nichtidentität der immunisierenden Substanz des Pneumokokkus mit der spezifischen präzipitablen, nicht zutrifft. *Schiemann's* Arbeiten machen es wahrscheinlich, daß auch die immunisierende Wirkung alkohollöslicher Substanzen der Pneumokokkenzelle auf minimalen Kohlehydratbeimengungen beruhen. Bei der sehr gründlichen Erforschung der Polysaccharide (siehe weiter unten) sind die Untersuchungen auf andere haptene Substanzen noch lückenhaft; besonders ist über reine Lipide bei Pneumokokken nichts sicheres bekannt.

Auch bei den Typhus-, Coli-Ruhr-Bazillen erwies sich bei der chemischen Analyse die antigene Struktur ziemlich komplex. Zum Beispiel konnten *Landsteiner* und *Furth*⁴⁾ aus Typhusbazillen durch Alkohol eine stark vollantigen wirkende P₁-Substanz gewinnen und durch weitere Extraktion (NaCl-Lösung mit folgender Alkoholfällung usw.) aus dem Bazillenrest eine P₂-Substanz. Beide hatten Proteincharakter (16—17 Prozent N), unterschieden sich aber serologisch folgendermaßen:

Anti-P₁-Serum agglutiniert lebende Typhusbazillen nur sehr gering (1:100) und ist gruppenspezifisch für Typhus-, Paratyphus B, Gärtner- und Colibazillen. Anti-P₂-Serum (hergestellt mit dem nach P₁-Extraktion bleibenden Bazillenrest) agglutiniert sehr stark (1:10000), und ist nur für Typhus- und Paratyphus-Bazillen gruppenspezifisch. Beide Sera waren der eiweißfreien und haptenen K-Substanz der Typhusbazillen gegenüber, die für Typhus- und Gärtner-Bazillen artspezifisch ist, wirkungslos. Die K-Substanz wird aber stark und

¹⁾ *Tillet, Goebel* und *Avery*, Journ. exper. Med. 52, 895 (1930).

²⁾ *Heidelberger* und *Kendall*, Journ. exper. Med. 53, 625 (1931).

³⁾ *Schiemann*, Ztschr. Hyg. 108, 220 (1927); 112, 315 (1931).

⁴⁾ *Landsteiner* und *Furth*, Journ. exper. Med. 47, 171 (1928); Proc. exper. Biol. u. Med. 25, 565 (1928).

grobflockig ausgefällt von Immuns Serum, das mit Vollbakterien oder besser noch mit trypsinverdauten Bakterien hergestellt war.

Von verschiedenen anderen Autoren [Literatur bei *Levinthal*¹⁾] sind durch Extraktion mit Alkohol aus Bakterien antigene Substanzen gewonnen worden. Diese hatten einen wechselnden Gehalt an N und Kohlehydraten, was wohl auf die verschieden feste Bindung des Eiweiß-polysaccharidkomplexes zurückzuführen ist. Es sei an das Forssman'sche Antigen erinnert, das ja auch die Molisch-Probe gibt, und das ja auch in z. B. Shigabakterien nachgewiesen ist. Im einzelnen ist gerade auf diesem Gebiete noch viele Kleinarbeit zu leisten, ehe man wieder zur Synthese leitender Grundsätze gelangen kann.

Noch am gründlichsten bearbeitet ist die Bedeutung der Polysaccharide (K) bei den Pneumokokken. Aus den folgenden experimentell erwiesenen Tatsachen:

1. Das K-Antigen bildet keine typischen In-vitro-Antikörper (jedoch nach Adsorption an Kollodium; siehe später), wohl aber Schutzstoffe gegen virulente Pneumokokken,
2. die reine P₂-Substanz (Nukleoprotein) der Pneumokokken bildet keine Schutzstoffe,
3. der vollantigene P₂-K-Komplex virulenter Pneumokokken bildet Schutzstoffe,

scheint zwangsläufig hervorzugehen, daß erst der Besitz eines Polysaccharids den Pneumokokkus virulent macht.

Nach *Schiemann*²⁾ gibt es auch typenspezifische Stämme ohne Mäusevirulenz. Vielleicht wird man einschränkender sagen müssen, daß es weniger der bloße Besitz einer K-Substanz ist, sondern der Umstand, daß die K-Substanz eine Kapsel bildet, es ist, der die Virulenz, d. h. die Unangreifbarkeit mittels Phagozytose bedingt. Die Schutzwirkung der Kapselsubstanz wird aufgehoben durch die Wirkung des spezifischen Anti-K-Serums. Ferner beschrieben *Avery* und *Dubos*³⁾ ein bakterielles Enzym, das in spezifischer Weise das die Kapselsubstanz darstellende Polysaccharid des Typ III-Pneumokokkus zerstört. Dieses Enzym vermochte Mäuse sowie auch Kaninchen [*Goodner*, *Dubos* und *Avery*⁴⁾] gegen eine tödliche Infektion mit III-Pneumokokken zu schützen.

Mit dem Besitz oder Verlust des typenspezifischen Polysaccharids hat man auch die bei Pneumokokkenkolonien beobachteten S- und R-Formen in Beziehung gebracht.

Die vollvirulenten Stämme sollen glatte S-Kolonien geben. Züchtet man diese auf Nährböden, die typenspezifisches Anti-K-Serum enthalten [*Friel*⁵⁾,

1) *Levinthal*, Zbl. Bakt. **110**, 30 (1929).

2) *Schiemann*, Zeitschr. f. Hyg. **110**, 175 (1929).

3) *Avery* und *Dubos*, Science **72**, 151 (1930); J. of exp. Med. **51**, 73 (1931); *Dubos*, ebenda **55**, 377 (1932).

4) *Goodner*, *Dubos* und *Avery*, J. of exp. Med. **55**, 393 (1932).

5) *Friel*, Publ. of South Afric. Inst. med. Research. Nr. 5 (1915), zitiert nach *Levinthal*. Zentrabl. f. Bakt. **110**, 30 (1929).

Stryker¹⁾], so wird der virulente Stamm avirulent [nach Levinthal²⁾] auch durch Zusatz frischer (überlebender) Kaninchenorgane zu flüssigen Kulturen und macht dann R-Kolonien („Degradation“), aber auch nach Kimura, Sukneff und H. Meyer³⁾ andere Varianten mit abweichenden Eigenschaften. 10 Proz. Zusatz eines Anti-Pr-Serums zur Bouillon kann nach Dawson⁴⁾ umgekehrt aus einem avirulenten Stamm einen virulenten machen, der wieder S-Kolonien gibt („Rehabilitation“). Auch bezüglich des Stoffwechsels sind die S- und R-Formen der Pneumokokken sowohl beim gleichen Stamm wie auch bei verschiedenen Typen verschieden. So verliert nach Ph. Finkle⁵⁾ der in die R-Form umgewandelte Typ I die Fähigkeit zu aerober Glykolyse, die umgekehrt der Typ III bei der Umwandlung in die R-Form erhält.

Bei diesem biologischen Abbau und Aufbau des Pr-K-Komplexes gibt es Zwischenformen aller Grade, analog wie bei den S- und R-Formen der Salmonellen. Aber nur solange bei der Degradierung noch Reste des Pr-K-Komplexes erhalten bleiben, besteht die Möglichkeit der „Rehabilitation“.

Besonders bedeutungsvoll ist der Befund von Griffith⁶⁾, daß es allgemein gelingt, durch subkutane Injektion des lebenden avirulent gewordenen, aber nicht zu hochgradig degradierten Pneumokokkenstammes des früheren Typus X gleichzeitig mit großen Mengen abgetöteter virulenter Pneumokokken des Typus y den avirulenten Stamm zu rehabilitieren, so daß er nunmehr dem Typus y entspricht. Diese Beobachtung von Griffith, die von Neufeld und Levinthal⁷⁾ sowie von H. Meyer³⁾ und Mitarbeitern bestätigt werden konnte, zeigt also die mögliche Umwandlung eines Pneumokokkentypus in den anderen.

Diese Umwandlung gelang neuerdings Dawson und Warbasse⁸⁾ auch in vitro. Sie impften kleine Mengen von II-Pneumokokken in ein Medium, das homologes Immuns Serum und größere Mengen abgetöteter III-Pneumokokken enthielt. Nach 48 Stunden konnten neben II-S-Kolonien auch einige III-S-Kolonien beobachtet werden. R-Formen kamen nicht vor.

Es ist vielleicht möglich, daß die Umwandlung auch gelingt, wenn man dem Nährboden das reine Polysaccharid, z. B. vom III-Pneumokokkus zusetzt und mit Pneumokokken I oder II beimpft, denen man vorher durch das typenspezifische Enzym von Avery und Dubos die Kapsel zerstört hat. In diesem Sinne scheint J. L. Alloway, Journ. exper. Med. 55, 91 (1932), kürzlich vorgegangen zu sein. Es gelang ihm, avirulente R-Formen von II durch Züchtung in Bouillon mit Zusatz von Anti-R-Serum und einem filtrierten Extrakt von III oder I in hochvirulente III- resp. I-Pneumokokken umzuwandeln. Die entsprechende Umwandlung von R-Formen von III und I gelang dagegen nicht. Jedenfalls ist kein Fall bisher beobachtet worden, wo ein avirulenter, kein Polysaccharid

¹⁾ Stryker, J. of exper. Med. 24, 49 (1916).

²⁾ Levinthal, Klin. Wschr. 1926, 2020.

³⁾ Kimura, Sukneff und H. Meyer, Ztschr. Hyg. 109, 51 (1928).

⁴⁾ Dawson, Journ. exper. Med. 47, 577 (1928).

⁵⁾ Ph. Finkle, Journ. exper. Med. 53, 661 (1931).

⁶⁾ Griffith, Journ. of Hyg. 27, 113 (1928).

⁷⁾ Neufeld und Levinthal, Ztschr. Immunitätsforsch. 55, 324 (1928).

⁸⁾ Dawson und Warbasse, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29, 149 (1931).

enthaltender Pneumokokkus in einen virulenten Typenstamm umgewandelt wurde.

Die Typisierung ist nun weiter fortgeschritten, indem es gelang, den bisherigen Typus IV in weitere 29 Typen aufzuspalten, wobei nur noch ein kleiner Rest von bisher nicht typisierbaren Pneumokokkenstämmen übrig blieb [*G. Cooper, C. Rosenstein, A. Walter* und *L. Peizer*¹⁾], so daß man heute die Typen I, II, III und 4—32 unterscheidet.

e) Die antigenen Eigenschaften der Pneumokokken-Kohlehydrate.

Avery und *Heidelberger*²⁾ und viele andere hatten durch Präzipitations- und Agglutinationsversuche die Typenspezifität der Polysaccharide von Kapselbakterien besonders der Pneumokokken festgestellt und gefunden, daß das Kapselkohlehydrat der Typ III-Pneumokokken als ein chemisch einheitlicher Körper angesprochen werden muß, der frei von N ist, spezifisch mit Antiseren reagiert, aber in Kaninchen keine in vitro nachweisbaren Antikörper bildet.

Bei der Prüfung der Spezifitätsverhältnisse speziell der Pneumokokken-Polysaccharide in vivo hatten Anaphylaxieversuche beim aktiv vorbehandelten Tier keinen Erfolg, wohl aber regelmäßig im Schockversuch, sowie am überlebenden Uterus beim passiv sensibilisierten Meerschweinchen [*Tomcsik*³⁾ und *Kurotchkin*⁴⁾]. *R. Lancefield*⁵⁾ fand ähnliches mit Streptokokken. Das art-spezifische Polysaccharid konnte ebensowenig wie das typenspezifische Protein aktiv sensibilisieren, wohl aber beim passiv sensibilisierten Tier Schock auslösen. Bei allen diesen Versuchen waren die benutzten Stoffe nicht N-frei. Wenngleich dieser Einwand kaum zu Zweifeln berechtigt, so spielt er keine Rolle bei der Arbeit von *Avery* und *Tillet*⁶⁾, die mit reinsten Polysacchariden aus Pneumokokken tödlichen und typischen Schock bei passiv mit dem homologen Anti-Pneumokokken-Kaninchenserum sensibilisierten Meerschweinchen auslösen konnten. War das Serum jedoch von Pferden hergestellt, so blieb bei den damit passiv sensibilisierten Tieren merkwürdigerweise jede anaphylaktische Reaktion nach Reininjektion der haptenen Antigene aus. Versuche, die Antikörper im aktiv immunisierten Tier abzusättigen, sind in vivo noch nicht genügend experimentell bearbeitet, wohl aber ist die Möglichkeit einer Absättigung in vitro u. a. bereits von *Cole*⁷⁾ sowie von *Gaspari, Fleming* und *Neill*⁸⁾ gezeigt worden.

Die Bindungsfähigkeit der K-Haptene für homologe Antikörper war demnach in vivo und in vitro erwiesen und ferner war bekannt,

¹⁾ *G. Cooper, R. Rosenstein, A. Walter* und *L. Peizer*, Journ. exper. Med. 55, 535 (1932).

²⁾ *Avery* und *Heidelberger*, Journ. exper. Med. 38, 81 (1923); 40, 301 (1924).

³⁾ *Tomcsik*, Proc. exper. Biol. a. Med. 24, 812 (1927).

⁴⁾ *Kurotchkin*, Journ. exper. Med. 47, 379 (1928).

⁵⁾ *Lancefield*, Journ. exper. Med. 47, 843, 857 (1928).

⁶⁾ *Avery* und *Tillet*, Journ. exper. Med. 49, 251 (1929).

⁷⁾ *Cole*, Journ. exper. Med. 26, 453 (1917).

⁸⁾ *Gaspari, Fleming* und *Neill*, Journ. exper. Med. 46, 101 (1927).

daß es durch Immunisierung mit K-Substanz allein nicht gelingt, Antikörper zu erzeugen. Doch mußte letzteres insofern auf in vitro nachweisbare Antikörper beschränkt werden, da es sich zeigte, daß die Immunisierung mit den K-Substanzen Schutzstoffe gegen die Infektion mit den homologen vollvirulenten Pneumokokken erzeugt, also eine typenspezifische Immunität verleiht, die passiv mit dem Serum übertragbar ist [Perlzweig und Steffen¹⁾, Meyer²⁾, Barach³⁾, Schiemann und Caspar⁴⁾, Schiemann⁵⁾].

Eine antigene Wirkung kann also der reinen typenspezifischen K-Substanz nicht abgesprochen werden; sie vermag Schutzstoffe zu bilden, aber keine Agglutinine oder Präzipitine. Eine gewisse Parallele dazu sind die bereits eingangs erwähnten Versuche von Klopstock und Selter⁶⁾, denen es gelang, mit Atoxyl und mit Metanilsäure nur bei subkutaner oder i. p. (nicht bei i. v.) Injektion chemospezifische, durch Anaphylaxieversuch nachweisbare Antikörper zu erzeugen, doch fehlt bei diesen Versuchen der Nachweis der passiven Übertragungsmöglichkeit. (Man könnte an eine Analogie mit Diphtherietoxin denken. Das Antitoxin ist ebenfalls ein Schutzstoff und kann in reiner Form keine Präzipitation auslösen.) Die weitere Frage ist nach dem Grunde, warum die K-Substanz keine Präzipitine bilden kann. Bekanntlich nützt die Addition von Pneumokokken + Eiweiß hier nicht in dem Sinne, wie Schweineserum für Lipide als Schlepper dienen kann. Das könnte an der Art der Adsorptionsbindung liegen. Lipide können bekanntlich Globulin adsorbieren (siehe bei Wa. R.), wobei man an eine Globulinadsorptionshülle um die Lipidteilchen denken kann. Im Falle der lyophilen Kohlehydratmizellen kommt eine unspezifische Globulinadsorption nicht zustande. Will man daher die K-Substanz doch zu einem Vollantigen machen, so muß man es entweder an eine lyophobe Phase zu adsorbieren versuchen oder aber die Kupplung mit Eiweiß auf chemischem Wege erzielen.

Beide Wege sind mit Erfolg beschritten, und wir wollen zunächst den letztgenannten Weg erörtern.

Zunächst hatten Goebel und Avery⁷⁾, Avery und Goebel⁸⁾ und Tillet, Avery und Goebel⁹⁾ durch Synthese von p-Aminophenol- β -Glukosid und p-Aminophenol- β -Galaktosid mit folgender Kupplung durch Diazotierung an Serumglobulin den Nachweis erbracht, daß es prinzipiell möglich ist, spezifische Anti-

¹⁾ Perlzweig und Steffen, Journ. exper. Med. **23**, 163 (1923).

²⁾ Meyer, Ztschr. Hyg. **107**, 416 (1927).

³⁾ Barach, Journ. exper. Med. **48**, 83 (1928).

⁴⁾ Schiemann und Caspar, Ztschr. Hyg. **108**, 220 (1928).

⁵⁾ Schiemann, Ztschr. Hyg. **110**, 567 (1929).

⁶⁾ Klopstock und Selter, Klin. Wschr. **1927**, 1662; Ztschr. Immunitätsforschg. **55**, 450 (1928).

⁷⁾ Goebel und Avery, Journ. exper. Med. **50**, 521 (1929).

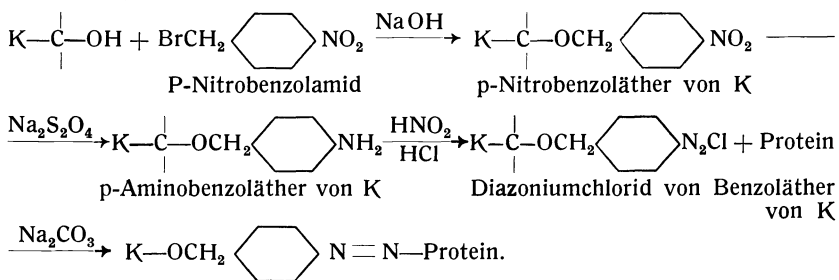
⁸⁾ Avery und Goebel, Journ. exper. Med. **50**, 533 (1929).

⁹⁾ Tillet, Avery und Goebel, Journ. exper. Med. **50**, 551 (1929).

körper gegen relativ einfach gebaute Kohlehydrate herzustellen, wobei der immunbiologische Nachweis *in vitro* und *in vivo* [Tillet, Avery und Goebel¹⁾] so empfindlich ist, daß schon die räumlich verschiedene Gruppierung eines C-Atoms bei Glukose und Galaktose eine völlige Änderung der antigenen Spezifität der betreffenden Verbindung bedingt. Die Natur des betreffenden Eiweißkörpers ist dabei ohne Belang.

Nun hatten Heidelberg²⁾ und Goebel²⁾ festgestellt, daß das besonders leicht in reiner Form darstellbare Polysaccharid der Typ III-Pneumokokken ein Polymerisationsprodukt der Aldobionsäure ist. Letztere hat die Bruttoformel $C_{11}H_{19}O_{10} - COOH$ und besteht aus Glukuronsäure und Glukose, und zwar in glukosidischer Stellung durch die Aldehydgruppe der Glukuronsäure und einer der C-Atome der Glukose. Dieses Polysaccharid haben Goebel und Avery³⁾ nun in analoger Weise als p-Aminobenzoläther synthetisiert und dann mit Serumglobulin vom Pferd gekuppelt. Das Polysaccharid hat neben den freien COOH-Gruppen noch 3 freie OH-Gruppen für je ein Aldobionsäuremolekül in der polymerisierten Form. Wird ein H in einer der drei OH-Gruppen durch eine Nitrobenzolgruppe ersetzt, die Nitroverbindung dann zur Aminoverbindung reduziert, so kann letztere durch Diazotierung an ein Eiweiß gekuppelt werden. Das Schema dieser Synthese war folgendes, wobei das Polysaccharid

durch $K-C-OH$ dargestellt sei:



Das so erhaltene Kuppelungsprodukt reagierte mit Typ III-Antiserum in Verdünnung von 1:500000. Im Präzipitat ließ sich die Azobindung $-N=N-$ nachweisen. Bei Immunisierungsversuchen mit diesem Produkt gelang es Avery und Goebel⁴⁾ bei Kaninchen typenspezifische Antikörper zu erzeugen, die *in vitro* nachweisbar waren und *in vivo* gegen virulente Typ III-Pneumokokken schützten. Daneben enthielt das Serum auch Präzipitine gegen das Pferdeglobulin, doch blieb dahingestellt, ob diese auf zufällig beigemengtem oder chemisch gebundenem Globulin beruhen.

Der zweite Weg, das reine Pneumokokken-Polysaccharid antigen zu machen, wurde mit Erfolg von J. Zozoya⁵⁾ beschritten. Zozoya beabsichtigte, das Kohlehydrat an eine feste Phase zu binden, ein Gedanke, der bereits schon vielfach früher angewendet war, um z. B. die Präzipitation

1) Tillet, Avery und Goebel, Journ. exper. Med. 50, 551 (1929).

2) Heidelberg und Goebel, Journ. biol. Chem. 70, 615 (1926); 74, 613 (1927).

3) Goebel und Avery, Journ. exper. Med. 54, 431 (1931).

4) Avery und Goebel, Journ. exper. Med. 54, 437 (1931).

5) Zozoya, Journ. exper. Med. 55, 325 (1932).

eines gelösten Antigens in die Agglutination einer festen Phase umzuwandeln. Solche Versuche werden uns noch später bei Toxin-Antitoxin beschäftigen, daher seien hier die früheren, in dieser Hinsicht unternommenen Versuche kurz erwähnt:

*Nicolle*¹⁾ hatte Typhusbazillen durch Digerieren mit Colikulturfiltrat agglutinabel für Coliantiserum gemacht und *Arkwright*²⁾ gelang das Umgekehrte, d. h. mit Typhuskulturfiltrat behandelte Colibazillen mit Typhusantiserum zu agglutinieren. *Coulter*³⁾ zeigte, daß die p_H von 4,75, bei der rote Blutzellen agglutinieren, nach deren Sensibilisierung nach p_H 5,3 verschoben wurde, was dann *Northrop* und *de Kruif*⁴⁾ allgemein dahin deuteten, daß in Mischungen von Zellen mit Eiweißlösungen der i. P. der Zellen derjenige des betreffenden Eiweißes ist, das adsorptiv die Zellen umgibt.

Loeb konnte nach Untersuchungen⁵⁾ über das Verhalten von Kolloidiumteilchen in Eiweißlösungen gegenüber Elektrolyten zeigen⁶⁾, daß nach Adsorption von Eiweiß an die Kolloidiumteilchen letztere die gleiche Salzkonzentration zum Ausfällen benötigten, wie das betreffende Eiweiß in wässriger Lösung. Seit diesen Untersuchungen haben gerade die Kolloidiumteilchen eine vielfache Anwendung in serologischen Problemen gefunden, da sie als eine disperse Phase relativ beträchtlicher Teilchengröße ziemlich hydrophob sind und leicht Eiweiße zu adsorbieren vermögen. Zunächst gehört hierher die Feststellung von der Säurefestigkeit von nach *Ziehl-Neelsen* gefärbten Kolloidiumteilchen durch *J. Freund*⁷⁾. Dann aber vor allem die Untersuchungen von *Jones*⁸⁾, der Kolloidiumteilchen sowie Bakterien mit Eiweiß sensibilisierte und sie dann mit dem homologen Antieißserum agglutinieren konnte, nachdem früher auch durch *Hitchcock*⁹⁾ die Adsorption von Eiweiß an Kolloidium gelang. *Jones*¹⁰⁾ machte dann ferner die Beobachtung, daß die Menge des an Kolloidiumteilchen adsorbierten Eiweißes, soweit die Agglutination ein Messen zuließ, über ein bestimmtes Maximum hinaus nicht von der Menge des betreffenden Eiweißes in Lösung abhängt, und weiterhin, daß Kolloidiumteilchen, die nacheinander in Berührung mit einer Vielheit von verschiedenem gelöstem Antigen waren, von allen homologen Antiseren agglutiniert werden konnten. *Bedson*¹¹⁾ gelang die Adsorption von Herpesvirus und dessen Antikörper an Kolloidium, und zwar wurde, wenn die Kolloidiumteilchen erst mit Antiserum behandelt waren, mehr Virus adsorbiert, wie mit den reinen Kolloidiumteilchen. *Mudd, Lucké, Mc Cutcheon* und *Strumia*¹²⁾ fanden mit Eiweiß behandelte Kolloidiumteilchen genau so phygozytierbar wie mit spezifischen Bakteriotropinen beladene Bakterien. *Zozoya* versuchte nun allgemein komplexe Kohlehydrate dadurch zu Vollantigenen zu machen, daß er sie an Kolloidiumteilchen adsorbierte. An und

1) *Nicolle*, Ann. Inst. Past. 12, 161 (1898).

2) *Arkwright*, Journ. of Hyg. 14, 261 (1914).

3) *Coulter*, Journ. gen. Physiol. 3, 309 (1920/21).

4) *Northrop* und *de Kruif*, Journ. gen. Physiol. 4, 655 (1921/22).

5) *Loeb*, Journ. gen. Physiol. 5, 109, 479 (1922/23).

6) *Loeb*, Journ. gen. Physiol. 5, 395 (1922/23).

7) *J. Freund*, Amer. Rev. Tuberc. 12, 124 (1925).

8) *Jones*, Journ. exper. Med. 46, 303 (1927).

9) *Hitchcock*, Journ. gen. Physiol. 8, 61 (1926/28).

10) *Jones*, Journ. exper. Med. 48, 183 (1928).

11) *Bedson*, Brit. Journ. exper. Path. 10, 364 (1929).

12) *Mudd, Lucké, Mc Cutcheon* und *Strumia*, Journ. exper. Med. 52, 313 (1930).

für sich sollten schon wegen des Mizellencharakters komplexe Kohlehydrate antigene Eigenschaften haben (*Wells*), doch war bisher Antikörperherstellung mit den reinen Stoffen nicht möglich. *Nishimura*¹⁾ berichtet zwar über positive Ergebnisse bei Versuchen zur Gewinnung spezifischer Antikörper auf Grund von Komplementbindung mit Inulin, löslicher Stärke und verschiedenen Dextrinen, doch waren seine Präparate alle nicht N-frei, so daß er selbst an mögliche Schlepperwirkung durch Eiweiß glaubt.

Zozoya benutzte Dextran. Als solches wird nach *Scheibler* (1875) ein kohlehydratartiges Fermentationsprodukt bezeichnet, welches unter dem Einfluß von Bakterien, besonders von *Leuconostoc mesenterioides* auf Saccharose, gebildet wird und nach *H. Hibbert* (noch unveröffentlichte Arbeiten) ein Gluko-Glukosid darstellt, das N- und aschefrei ist. An Kolloidiumteilchen adsorbiertes Dextran bewirkte bei Kaninchen und Pferden die Bildung von spezifischen Immunkörpern, die mit Dextranlösungen präzipitierten. Wurden die mit adsorbiertem Dextran umhüllten Kolloidiumteilchen in Immunsorumverdünnungen gebracht, dann erfolgte Agglutination, die bei Verwendung von Normalserum ausblieb. Wurde jedoch zunächst das Immunsorum an die Kolloidiumteilchen und diese dann in verschieden verdünnte Dextranlösungen gebracht, dann blieb die Agglutination aus (vgl. S. 43).

Nach *Zozoya* kommt die Adsorption von Immunsorum an Kolloidium mit den Gruppen zustande, die eine spezifische Beziehung zu dem Dextranantigen haben. Die hydrophile Gruppe des Immunkörpers bleibt in diesem Falle frei. Da auch das Dextran in wässriger Lösung mit der hydrophilen Gruppe gegen das Wasser orientiert ist, so bleibt die Agglutination aus, da keine Kohäsion zustande kommt. Das an Kolloidium adsorbierte Dextran hat aber seine aktive Gruppe frei nach außen orientiert und kann so die spezifische Serumgruppe binden, denn das Serum ist mit dem Wasser durch seine hydrophile Gruppe verbunden und läßt ebenfalls die spezifische Gruppe frei, so daß in diesem Falle Agglutination eintreten kann.

Diese Vorstellung von *Zozoya* geht von dem Gedanken aus, daß bei Eiweißstoffen in dem Molekül ein besonderes Radikal enthalten ist, welches die aktive Gruppe darstellt und dem Antikörper seine Spezifität gibt. Überkreuzreaktionen von Antikörpern lassen auf chemische Ähnlichkeit in der Struktur der aktiven Gruppen schließen, wie z. B. in den Polysacchariden der Typ II-Pneumokokken und den Friedländerbazillen [*Heidelberger* und *Avery*²⁾, *Heidelberger*, *Goebel* und *Avery*³⁾].

Andererseits könnte man auf Grund der Arbeiten von *H. Eagle* über den Mechanismus der Agglutination die Befunde von *Zozoya* auch so deuten:

Ist das Dextran an Kolloidium adsorbiert, so ist die Kolloidoberfläche imstande, Globuline des Immunsorums zu adsorbieren wegen der bestehenden chemischen Affinität der Spezifität. In solchem Falle werden, wenn nicht ausschließlich, so doch vorwiegend, Immunglobuline gebunden. Bringt man

¹⁾ *Nishimura*, Journ. exper. Med. **50**, 419 (1929).

²⁾ *Heidelberger* und *Avery*, Journ. exper. Med. **38**, 73 (1923); **40**, 301 (1924).

³⁾ *Heidelberger*, *Goebel* und *Avery*, Journ. exper. Med. **42**, 727 (1925).

aber das Kollodium allein mit Immuns Serum zusammen, dann werden, wegen des Fehlens einer immunologischen Spezifität, Globuline in unspezifischer Weise gebunden, darunter also vorwiegend (wegen des quantitativen Überwiegens) Globuline, die keine Antikörper enthalten. Solche Globuline behalten nach ihrer Adsorption eine gewisse Hydrophilie (im Gegensatz zum Immunglobulin) und daher können diese Globuline auch kein Dextran mehr adsorbieren. Selbst wenn aber Dextran spezifisch gebunden wird, so kann wegen dessen Hydrophilie eine Kohäsion der Teilchen nicht erfolgen und Agglutination muß ausbleiben.

Dextran hatte den Vorteil, daß es wirklich N-frei war. Auch mit den Polysacchariden von *B. Anthrax*, Meningokokken, Streptokokkus viridans, Proteusbazillen, Dysenteriebazillen, Pneumokokken u. a. gelang es durch Adsorption an Kollodium Antikörper zu erzeugen, so daß auf diese Weise Antisera erzeugt werden konnten, die keine Antieweißkörper enthielten. Immerhin enthielten alle bakteriellen Polysaccharide N, wenn sie auch ohne Adsorption an Kollodium keine Antikörper bildeten. Bemerkenswert sind die kleinen Mengen der bakteriellen Polysaccharide, die nötig sind, um bei Pferden zu hochwertigen Antisera zu gelangen. Bereits 0,5 bis 1,0 mg an Kollodium adsorbiert, kann genügen.

Die Annahme, daß übergreifende Reaktionen an und für sich typenspezifischer Antisera darauf beruhen, daß die verschiedenen Polysaccharide, die bekanntlich auch chemisch unterscheidbar sind, gewisse mizellare Strukturelemente (Rezeptoren) gemeinsam haben, findet eine weitere Stütze in den Beobachtungen von *Zozoya*¹⁾, denen zufolge Dextran immunologisch mit Antisera reagiert, die durch Immunisieren von Kaninchen mit Vollkulturen von Pneumokokken, Salmonellaarten und Streptokokkus viridans hergestellt waren. Das deutet darauf hin, daß einige Polysaccharide von Bakterien mit Dextran gemeinschaftliche oder sehr ähnliche Strukturelemente haben. Absorbiert man die spezifischen Polysaccharidantikörper durch ihre homologen Kohlehydrate, so bleibt in allen untersuchten Seren ein Antikörper gegen Dextran zurück, so daß dieser Stoff ein immunologisch einheitliches Antigen zu sein scheint, vielleicht aber von einfacherer Struktur, gewissermaßen eine Vorstufe zu den mehr komplexen bakteriellen Polysacchariden.

In diesem Zusammenhang müssen frühere Feststellungen von *Heidelberger*, *Avery* und *Goebel*²⁾ erwähnt werden, denen zufolge man durch Säurehydrolyse aus Gummiarabikum Kohlehydrate erhalten kann, die durch Typ II- und Typ III-Antisera präzipitiert werden. Diese Kohlehydrate sollen nach *Heidelberger* und *Kendall*³⁾ aus Glukuronsäure und Galaktose bestehen, also den Polysacchariden aus Typ III und Friedländer Typ A sehr ähnlich sein, die bei Hydrolyse Glukuronsäure und Glukose liefern.

¹⁾ *Zozoya*, Journ. exper. Med. 55, 353 (1932).

²⁾ *Heidelberger*, *Avery* und *Goebel*, Journ. exper. Med. 49, 847 (1929).

³⁾ *Heidelberger* und *Kendall*, Journ. biol. Chem. 84, 639 (1929).

f) Die funktionelle Neutralisation der Pneumokokken-Polysaccharide durch Antiserum.

Die Befunde von *Sia*¹⁾ über die antibakterizide Wirkung der spezifischen Penumokokken-Kohlehydrate konnten von *Ward*²⁾ bestätigt werden. Phagozytose-Versuche in vitro mit menschlichem Blut, Anti-Pneumokokkenserum, spezifischer Pneumokokken-K-Substanz und lebenden virulenten Pneumokokken zeigten mit starkem Anti-K-Serum eine Hemmungszone, die bei weiterer Verdünnung verschwand. Es trat dann deutliche Phagozytosewirkung auf, die bei weiterer Serumverdünnung in dem Maße abnahm, als das Serum zur Neutralisation der anti-phagozytischen Wirkung der K-Substanz nicht mehr ausreichte. Die Hemmungszone, die bei Typ III deutlicher wie bei Typ I ist, scheint der Präzipitationszone zu entsprechen, wobei die Präzipitateilchen vielleicht mechanisch die Phagozytose der Pneumokokken hindern. *Ward*³⁾ konnte durch den bakteriziden Plattenversuch zeigen, daß z. B. das Typ III-K noch bei $\frac{1}{75000}$ starke antibakterizide Wirkung ausübt, aber durch eine Antiserumverdünnung $\frac{1}{80000}$ noch neutralisiert werden konnte, während das gleiche Antiserum höchstens noch bei $\frac{1}{50}$ Verdünnung auf die K-Substanz präzipitierend wirkte. Das Auftreten der Präzipitation wirkte dadurch hemmend, daß, wie *Cromwell* und *Centeno*⁴⁾ zeigen konnten, die gebildeten spezifischen Präzipitate phagozytiert werden. Wenn man nach *Ward* versucht, sich an Hand der experimentellen Tatsachen ein Bild von den Faktoren zu machen, die die Virulenz und die Resistenz der Pneumokokken bedingen, so läßt sich folgendes sagen:

1. Die Kapsel ist der Panzer des virulenten Pneumokokkus, der, solange er intakt ist, vor der Phagozytose, als der einzigen Möglichkeit des Organismus den Pneumokokkus zu töten, schützt.

2. Der für den Pneumokokkus vitalste Bestandteil der Kapsel ist das spezifische Kohlehydrat.

3. Zur Zerstörung des Kohlehydratpanzers der virulenten Pneumokokken bleibt dem Organismus als einzige Waffe nur der spezifische Kohlehydrat-Antikörper, dessen spezifische Wirkung auf die Kapselsubstanz erst die folgende Phagozytose ermöglicht.

4. Freies im Organismus befindliches Kohlehydrat bindet den Kohlehydrat-Antikörper und vermindert dadurch die für die in 3. angegebene Wirkung benötigte Antikörpermenge.

Die Annahme von *Sabin*⁵⁾, daß es außer dem K-Antikörper noch andere Schutzstoffe geben muß, weil nach spezifischer Präzipitation mit dem homo-

¹⁾ *Sia*, Journ. exper. Med. 43, 633 (1926).

²⁾ *Ward*, Journ. exper. Med. 51, 675 (1930).

³⁾ *Ward*, Journ. exper. Med. 51, 685 (1930).

⁴⁾ *Cromwell* und *Centeno*, Journ. of Immun. 17, 53 (1929).

⁵⁾ *Sabin*, Journ. exper. Med. 53, 93 (1931).

logen K das übrigbleibende Serum noch schützt, ist wenigstens dadurch nicht bewiesen, denn erstens können sich nach einer spezifischen Präzipitation die einzelnen Komponenten noch in Lösung befinden und ferner können, wie im Abschnitt über Antikörper ausführlicher dargelegt ist, nur relativ lyophile Antikörperglobuline präzipitieren. Es können in einem Serum Antikörper vorhanden sein, die als lyophile Globuline gar nicht zur Präzipitation in physikalischem Sinne befähigt sind. *Ward*¹⁾ konnte experimentell beweisen, daß ein K-III-Antiserum nach Absorption durch Präzipitation mit K III noch eine, allerdings verminderte neutralisierende Fähigkeit gegenüber der antibakteriziden Wirkung von K III hat und bestätigte somit durch Invitroversuche die in vivo erhaltenen Ergebnisse von *Sabin*.

Wären die obigen Vorstellungen richtig, nach denen also der Verlauf einer Pneumonie nur von der Quantität des spezifischen antibakterizid wirkenden Kohlehydrates und der des aktiv gebildeten oder passiv zugeführten, die antibakterizide Wirkung des Kohlehydrates aufhebenden Antikörpers abhängt, dann würde also Kohlehydratüberschuß zum Tode, Antikörperüberschuß zur Heilung des Organismus führen.

Ward konnte nun nachweisen, daß die antibakterizide Wirkung des Kohlehydrates so leicht durch spezifische Antikörper aufgehoben wird, daß wohl in den meisten Fällen von Serumtherapie, sicher aber, wenn 200 ccm Antiserum wie in Amerika üblich war, gegeben wurden, das Serum imstande war, ein vielfaches der Kohlehydratmenge zu „neutralisieren“, die im günstigsten Falle überhaupt gebildet werden könnte. Nach *Ward* muß $2\frac{1}{2}$ mal mehr Kohlehydrat als Antiserum vorhanden sein, um noch eine antibakterizide Wirkung des Kohlehydrates nachweisen zu können. Würde also Überschuß von Kohlehydrat selbst nach therapeutischer Gabe von 200 ccm Antiserum den Tod bedingen (und es gibt bekanntlich Fälle, wo diese Serummenge nicht zur Heilung ausreichte), so müßten 500 g Kohlehydrat im Organismus produziert worden sein, was absurd ist, denn nach den Berechnungen von *Heidelberger*, *Sia* und *Kendall*²⁾ entspräche dies der Kohlehydraternte aus 12500 Liter autolysierter Pneumokokken-Bouillonkultur.

Das immunbiologische Geschehen bei der Pneumonie ist daher sicher komplizierter als die obige Annahme.

Versucht man sich von der Ursache der antibakteriziden Wirkung von K und der diese „neutralisierenden“ Wirkung des Antiserums eine Vorstellung zu machen, so müssen wir hier die in einem anderen Abschnitt erwähnte Theorie der Phagozytose berühren.

Leukozyten und andere Zellen mit phagozytierenden Fähigkeiten können Partikelchen nur dann aufnehmen, wenn sie adhären können. Dies können von vornherein hydrophile Stoffe nicht, sondern erst dann, wenn sie durch Adsorption von z. B. Eiweiß ihre Hydrophilie relativ eingebüßt haben. Die Bindung von Immunglobulin aus Antiserum an ein Antigen führt zu einer Adsorptionshülle aus denaturiertem, rel. hydrophobem Globulin, wie an anderem Orte ausgeführt, und ermöglicht dadurch erst eine Adhäsion des Antigens an einen Leukozyten, der dann die Phagozytose folgt. Die Wirkung von Opsoninen, Bakteriotropinen usw. ist nur der Ausdruck für diese physikalischen Vorgänge.

¹⁾ *Ward*, Journ. exper. Med. 55, 511 (1932).

²⁾ *Heidelberger*, *Sia* und *Kendall*, Journ. exper. Med. 52, 477 (1930).

Die Hydrophilie der Kapselsubstanz schützt die Pneumokokken vor Phagozytose. Ist durch die spezifische Bindung mit Immunglobulin des Antiserums die Kapselsubstanz mit einer Adsorptionsschicht von denaturiertem Globulin umgeben, kann der Pneumokokkus der Phagozytose anheim fallen. Es ist dabei nicht nötig, weder einen Neutralisationsvorgang anzunehmen noch eine Zerstörung der Kohlehydrate, ebensowenig wie (siehe später) Toxin von Antitoxin nicht neutralisiert wird, wie z. B. HCl durch NaOH unter Bildung einer neuen Substanz, sondern nur eine Adsorption eintritt unter bleibender Intaktheit beider Komponenten.

Wird nun angenommen, daß außer in der Kapselsubstanz an den Kokken die Kohlehydrate auch frei vorhanden sind und antibakterizid wirken, so läßt sich deren Wirkung leicht verständlich machen durch die Annahme, daß sie einen Teil derjenigen Antikörper binden (vielleicht unter Bildung von Präzipitaten, die als solche der Phagozytose anheim fallen), die sonst als „Opsonine“ die Pneumokokken phagozytierbar gemacht hätten.

Ward¹⁾ vermutet, daß die mit dem Antikörper im Waschwasser von Pneumokokken, im Bouillonkulturfiltrat und im Urin Pneumoniekranker reagierende Substanz komplexer und weniger stabil ist wie das reine Polysaccharid (K) selbst und durch die chemischen Prozeduren, die zur Isolierung von K führen, zerstört wird. Dafür spräche ja die Haptennatur des reinen K, aber schwer im Einklang damit ist dessen Aktivierung durch Adsorption an Kollodium zu bringen (*Zozoya*). Ward fand die in vitro demonstrierbare antibakterizide Fähigkeit beim Bouillonkulturfiltrat (Typ III) viel ausgeprägter als beim reinen K-Stoff, wobei auf gleiche Mengen K bezogen ersteres zur „Neutralisierung“ sehr viel (ca. 1000) mehr Antiserum erforderte als letzteres. Die Wirkung unspezifischer Bouillonstoffe ließ sich ausschließen. Eine typenspezifische andere Substanz, wie sie z. B. *Enders*²⁾ (siehe weiter oben) in Pneumokokkenkulturfiltraten fand, kam auch nicht in Frage, denn während diese im Absorptionsversuch den Anti-K-Titer des Serums nicht ändert, wird der antibakterizide Titer des Serums durch Absorption mit K geändert, so daß Ward eine Verwandtschaft der antibakteriziden Substanz mit der K-Substanz annimmt.

Auch diese Annahme erscheint unnötig. Das was im Lichte obiger Erklärung die Phagozytose hemmt, ist das hydrophile Kohlehydrat, sei es als Kapselsubstanz an den Bakterien oder im freien Zustand durch die Bindung von Antikörpern im Medium, und die „neutralisierende“ Fähigkeit des Antiserums ist stets der Ausdruck einer Bindung von K mit seinem homologen Antikörper. Der große Unterschied zwischen dem Bouillonkulturfiltrat und der reinen K-Lösung (bei gleichem Gehalt an K) ist vielleicht nur darauf zurückzuführen, daß im Kulturfiltrat die K-Mizellen durch Adsorptionen an andere

¹⁾ Ward, Journ. exper. Med. 55, 519 (1932).

²⁾ Enders, Journ. exper. Med. 52, 235 (1930).

Stoffe eine räumlich größere Anordnung haben und damit eine größere Oberfläche, die entsprechend mehr Antikörper zu binden vermag als die relativ kleinere Oberfläche der reinen K-Mizelle. Mit der verschiedenen großen Oberfläche läßt sich auch verständlich machen, warum die Absorption von K-Antikörpern aus dem Immuns Serum so leicht mittels intakten Pneumokokken und so schwierig mit der reinen K-Substanz gelingt, was eng mit dem am anderen Orte behandelten zahlenmäßigen Zusammenhang zwischen Agglutination und Präzipitation zusammenhängen dürfte.

Ward fand beim Rekonvaleszentenblut (Typ III) trotz schwachem Anti-K-Titer eine bessere neutralisierende Wirkung des starken antibakteriziden Effektes des Filtrates vom Preßsaft einer Lunge eines an Typ III-Pneumonie gestorbenen Patienten als bei einer Mischung von Normalblut mit Antiserum, die den gleichen Anti-K-Titer hatte.

Zweifellos enthalten bei der Komplexität des Pneumokokkenantigens der Lungenpreßsaft und das Rekonvaleszentenblut noch andere Antigene und Antikörper als die, welche sich auf das reine K beziehen und alle Antigene, die in freier Lösung befindlich, solche Antikörper zu binden vermögen, die sich mit der intakten Pneumokokkenzelle verbinden könnten, müssen in obigem Sinne die antibakterizide Fähigkeit des Milieus aufheben.

Immerhin zeigt diese Feststellung von *Ward*, daß bei Typus III-Pneumonien das reine Anti-K-typenspezifische Serum nicht den gleichen Effekt wie das Rekonvaleszenten Serum besitzt, was nach *Ward* das bisherige Versagen der Serumtherapie bei Typus III-Pneumonie dem Verständnis näher bringen kann.

g) Zusammenhang von Polysacchariden mit den R- und S-Formen der Kolonien.

Wenn die serologischen Beobachtungen mit den Polysacchariden der Pneumokokken berechtigen, in diesen Substanzen den Träger der Typenspezifität zu erblicken, so ist andererseits die Behauptung, daß nur die virulenten S-Formen das hitzestabile spezifische Polysaccharid (K) haben, die R-Formen dagegen der K-Substanz mehr oder weniger verlustig gingen, nicht zwingend. Zunächst zeigte *Schiemann*, daß Typenspezifität nicht unbedingt mit Virulenz einherzugehen braucht. Auch hat die Beziehung von Stabilität mit typenspezifischer Substanz keine allgemeine Gültigkeit, da bei der Coli-Typhus-Enteritisgruppe die spezifische Substanz labil ist. Dazu kommt, daß bei den Salmonellen ganz sicher die Art der Kolonien, ob S- oder R-Form, nichts mit der Spezifität zu tun hat.

Bei Versuchen, die Beziehung zwischen der Koloniform der Pneumokokken und der typenspezifischen K-Substanz zu erklären, sollte man den physikalischen Standpunkt mehr berücksichtigen. So ist das folgende den Arbeiten von *Tulloch*¹⁾ entnommene Beispiel von *Gengou*²⁾ recht

¹⁾ *Tulloch*, Journ. Army med. Corps 48, 435 (1927).

²⁾ *Gengou*, Arch. internat. Physiol. 7, H. 1 u. 2 (1908).

geeignet, die Thermostabilität der Antigene in anderer Beleuchtung zu sehen.

Eine Suspension von Ba_2SO_4 in Aqua dest. ist labil, indem die Teilchen sich schnell absetzen. Wird sie aber mit Gummiarabikum in geeigneten Mengen versetzt, so macht dieses Schutzkolloid durch Adsorption der Ba_2SO_4 -Teilchen an Gummiteilchen die Suspension stabil. Zentrifugiert man die stabile Suspension, so lassen sich die ausgeschleuderten und gewaschenen Teilchen wieder durch Aqua dest. in stabile Suspension bringen, während die überstehende Flüssigkeit eine frische Suspension von Ba-Sulfat nicht mehr stabilisieren kann. Wird nun die stabile Suspension der gewaschenen Bariumsulfat-Gummi-Komplexe erhitzt und noch heiß zentrifugiert, dann haben die ausgeschleuderten Teilchen von Bariumsulfat nicht mehr die Fähigkeit mit Aqua dest. in stabile Suspension zu gehen, aber die überstehende Flüssigkeit hat wieder die Eigenschaft erlangt, eine un stabile Suspension zu stabilisieren.

Dieser einfache Vorgang zeigt, daß durch Gruppierung der Teilchen und Trennung der Verbindung durch Hitzeeinwirkung sich die Eigenschaften der Suspension stark verändern können. Hat man eine Vielheit von kolloiden Substanzen, wie in einer Bakterienzelle, so kann eine bloße Umgruppierung der einzelnen Teile der Gesamtmizelle eine ganz verschiedene Reaktionsfähigkeit geben, und eine solche Möglichkeit ist bei dem verschiedenen Verhalten von S- und R-Formen und bei der Frage der verschiedenen Thermostabilität im Auge zu behalten.

Vergegenwärtigen wir uns die Rolle der K-Substanz der Pneumokokken bei der Immunisierung, so sahen wir, daß K allein nicht die typenspezifischen agglutinierenden Antikörper zu bilden vermag (die typenspezifischen Schutzstoffe sind in vitro nicht nachweisbar). Wohl aber kann die K-Substanz solche Antikörper bilden, wenn sie entweder an Kollodium adsorbiert oder an Eiweiß chemisch gebunden ist. Es sieht so aus, als wäre das Maßgebende bei dieser Aktivierung der K-Substanz durch andere Stoffe nicht die Art des betreffenden Stoffes, sondern die Konfiguration der betreffenden Verbindung. Im Falle des Kollodiums sitzt die K-Substanz außen, im Falle der Bindung an Eiweiß ist sie endständig und die leichte Bildung von typenspezifischen Agglutininen mittels der S-Formen sowie deren große Reaktionsfähigkeit mit Antikörpern könnte auch dadurch bedingt sein, daß der Protein-Kohlehydrat-Komplex in der Bakterienzelle in der S-Form so orientiert ist, daß die hydrophile K-Substanz nach außen zu liegen kommt und wegen ihrer Hydrophilie den „glatten“ Charakter der Kolonieform bedingt. In der R-Form könnte die K-Substanz auch enthalten sein, aber in strukturell anderer Form an das Protein gebunden, so daß es nicht in Lösung gehen kann und daher überhaupt chemisch schwer nachweisbar ist, und anderseits eben wegen dieser strukturellen Position nicht antigen wirken kann. Das Aussehen der R-Form wäre dann durch die relativ geringere Hydrophilie des Pneumokokkenproteins oder eines sich außerdem noch im Komplex befindlichen Lipoids bedingt. Diese Gedanken mögen hier

unter besonderer Betonung ihres hypothetischen Charakters Erwähnung finden.

In gewissem Zusammenhang stehen damit die Beobachtungen von *Bruce White*¹⁾ über die spontane Agglutination bei *Salmonella*arten, *Subtilis* u. a. Die Entfernung der die Spontanagglutination durch Elektrolyte bedingenden Lipide durch Alkoholextraktion hebt die Spontanagglutinabilität auf. R-Kulturen neigen besonders zur Spontanagglutination und besonders nach Erhitzen, während die von vornherein stabilen Suspensionen der S-Formen auch nach Erhitzen nicht spontan durch Elektrolyte agglutinieren. *White* fand in den S-Formen gewisser *Salmonellen* spezifisch lösliche Substanzen, die sich in den R-Formen nicht nachweisen ließen. Immerhin wird von anderer Seite (*Schütze* u. a.) gerade bei den *Salmonella*arten ein Zusammenhang zwischen Spezifität und Art der Kolonie abgelehnt. Aber in diesem Zusammenhang interessiert besonders, daß gerade die S-Formen diese löslichen spezifischen Substanzen in leicht extrahierbarer Form enthielten und im Einklang damit steht der frühere Befund von *Friedländer*²⁾, demzufolge Paratyphus-S-Formen 5—6 Proz. mehr Wasser enthalten als die korrespondierenden R-Formen.

2. Das Agglutinin.

Wenn im vorhergehenden Abschnitt über das Agglutinogen das Agglutinin als ein mit bestimmten Bindungsaffinitäten ausgestattetes Globulin angenommen war, so liegt das daran, daß wir über die Natur des Antikörpers im allgemeinen und des Agglutinins im speziellen Sinne zur Zeit mit Sicherheit noch nicht viel sagen können. Es ist bisher durch Eluierung mit schwach alkalischen Pufferlösungen gelungen, aus den gewaschenen, mit Agglutininen beladenen Bakterien die Agglutinine in einer sehr eiweißarmen, aber doch nicht eiweißfreien Lösung zu erhalten (*Olitzky, Huntoon* u. a.), so daß daraus nur der Schluß gezogen werden darf, daß in einem Immuns Serum nur ein außerordentlich geringer Teil des Serumglobulins die Eigenschaften hat, die dem spezifischen Agglutinin entsprechen. Ob es einen scharfen Unterschied zwischen diesem „Immunglobulin“ und den anderen Globulinen des Serums gibt, dürfte fraglich sein. Es scheint nicht unmöglich, daß manche Globuline des Serums zwar ähnliche, aber weniger ausgeprägte und daher weniger spezifisch wirkende Eigenschaften haben als das spezifische Immunglobulin, und in diesem Sinne ließe sich das Vorkommen sogenannter Normalagglutinine im Serum nicht immunisierter Tiere und Menschen erklären.

a) Normalagglutinine.

Bekanntlich haben manche Sera eine erhöhte Kolloidlabilität, die nach *Sachs* auf ein relatives Überwiegen von niederdisperssem, relativ hydrophobem Globulin, das sich leichter an Grenzflächen anlagert, beruht. Es sei z. B. an die unspezifische Agglutination von Y-Ruhrbazillen durch

¹⁾ *Bruce White*, Journ. of Path. **30**, 113 (1927); **31**, 423 (1928).

²⁾ *Friedländer*, Arch. Hyg. **91**, 287 (1922).

manche Sera von Schwangeren erinnert. Wie die weiter oben erwähnten Versuche von *Eagle* zeigen, bestehen zwischen den beiden Globulinen des Normal- und denen des Immunserrums bezüglich ihres adsorptiven Verhaltens alle Übergänge. Normalagglutinine könnten daher durch unspezifische Globulinadsorption erklärt werden, und es wäre denkbar, daß zwischen relativ beschleunigter Blutzellensedimentierung und Gehalt an Normalagglutininen Zusammenhänge bestehen.

b) Zusammenhang von Agglutination und Präzipitation.

Es besteht wohl heute kein Zweifel mehr darüber, daß der spezifischen Agglutination von Zellen und der spezifischen Präzipitation kolloider Lösungen der gleiche physikalische Mechanismus entspricht, und zwar der Mechanismus, wie er bei der Agglutination beschrieben wurde, und der folgende ineinandergreifende Prozesse umfaßt:

1. Bildung einer auf spezifischen Affinitäten beruhenden Adsorptionsschicht von antikörperhaltigen Globulinen des Immunserrums um die Zelle resp. um die in Lösung befindliche Kolloidmizelle, wobei das Immunglobulin (im Gegensatz zu unspezifisch adsorbierten Globulinen aus Normalserum?) eine Denaturierung (gewissermaßen durch Kondensierung auf der Oberfläche) im Sinne verminderter Hydrophilie erleidet.

2. Reduzierung der elektrischen Ladung der Mizelle auf die des adsorbierten Proteins entsprechend der jeweiligen p_H .

3. Weitere Reduzierung der noch vorhandenen Ladung durch die anwesenden Elektrolyte auf das kritische Potential.

4. Kohäsion der Teilchen, Agglomeration und Sedimentation.

Wenn sich bei einem Immunisierungsvorgang Präzipitine bilden, bilden sich auch Agglutinine und umgekehrt. Der Antikörper ist derselbe, z. B. kann das typenspezifische Agglutinin der Pneumokokken das Polysaccharid in Lösung präzipitieren und die homologen Pneumokokken agglutinieren. Es sei an das bereits erwähnte Beispiel erinnert, daß ein präzipitierendes Anti-Coliserum Typhusbazillen, die mit Coli-Kulturfiltrat behandelt sind, agglutinieren kann.

Nach *F. S. Jones*¹⁾ werden Bakterien sowie Kollodiumteilchen, die in einem verdünnten Serum suspendiert sind, durch ein gegen dieses Serum gerichtetes präzipitierendes Antiserum agglutiniert. Ferner werden Kollodiumteilchen, die mit Rinderserum oder kristallisiertem Eiweiß behandelt und dann ausgewaschen wurden, durch die entsprechenden Antisera agglutiniert. Bei Bakterien gelang der gleiche Versuch nur bei Vorbehandlung mit Serum, welches Globulin hatte und nicht bei Eier-eiweiß (weil die Grenzflächensubstanz der Bakterienmembran im Vergleich zum Kollodium hydrophiler sein dürfte und ein Haften des relativ hydro-

¹⁾ *F. S. Jones*, Journ. exper. Med. 45, 303 (1927).

philen Albumins weniger möglich ist als beim relativ hydrophoberen Euglobulin des nativen Serums). Mit Rinderserum behandelte Bakterien wurden bei Zusatz eines Anti-Rinderserums auch bedeutend stärker phagozytiert als unbehandelte Bakterien, aber noch stärker für die Phagozytose wirkt die Vorbehandlung der Bakterien mit einem spezifisch agglutinierenden Antiserum, weil dessen Globuline nach den eingangs entwickelten Anschauungen über den Mechanismus der Agglutination durch die Adsorption eine Denaturierung mit gesteigerter Hydrophilie erfahren im Vergleich zu den nicht oder nur geringgradig durch die Adsorption veränderten Globulinen des Normalserums (siehe bei Phagozytose).

Aber trotzdem gibt es Antigene, die vorwiegend Präzipitine, und solche, die vorwiegend Agglutinine bilden; das ist eine Sache der Struktur des betreffenden Antigens (vielleicht ausschließlich Sache der Größe der antigenen Mizelle). Auch kann man aus einem Serum die Agglutinine durch spezifische Absorption entfernen und doch noch Präzipitation erhalten, wie auch umgekehrt. Nichtsdestoweniger darf man daraus nicht auf eine Wesensverschiedenheit dieser Antikörper schließen, sondern bedingend für diese Absorption ist die Art der antigenen Mizelle sowie der physikalische Zustand der Antikörper tragenden Globuline.

Eins der hauptsächlichsten gegen die einheitliche Auffassung dieser Antikörper vorgebrachten Argumente ist die Tatsache, daß bei der Agglutination das Serum stark verdünnt werden kann, bei der Präzipitation jedoch höchstens bis 1:50, wohingegen hier das Antigen in großer Verdünnung wirksam ist. Diesen scheinbaren Gegensatz hat *H. Zinsser*¹⁾ folgendermaßen zu erklären versucht:

Angenommen, man hätte zwei gleiche Mengen eines gleichen Antigens nur einmal (a) in Bakteriengröße (Durchmesser: $5 \cdot 10^{-3}$ mm) und ein andermal (b) in Proteinmolekülgröße (Durchmesser: $5 \cdot 10^{-7}$ mm) aufgeteilt, so daß sich die Masse von (a) zur Masse (b) verhält wie $4/3 \pi \cdot \left(\frac{5 \cdot 10^{-3}}{2}\right)^3 : 4/3 \pi \cdot \left(\frac{5 \cdot 10^{-7}}{2}\right)^3 = 10^{-9} : 10^{-21}$. Also die Masse, die ein Bakterium bildet, entspräche der Masse von 10^{12} Proteinmolekülen. Die Oberfläche von a zu der von b verhält sich wie $10^{-6} : 10^{-14}$. Also ist die Oberfläche eines Bakteriums 10^8 mal größer als die eines Proteinmoleküls. Von der gleichen Antigenmasse gibt es nun 10^{12} mal mehr Teilchen von Molekülgröße wie von Bakterien. Dementsprechend verhält sich die totale Oberfläche einer gegebenen Antigenmasse, aufgeteilt in Teilchen von Bakteriengröße, zur Totaloberfläche derselben Antigenmasse in Teilchen von Molekülgröße aufgeteilt wie 1:10000. Das Immunglobulin würde also eine 10000 mal größere Oberfläche bei Proteinmolekülen wie beim Bakterienantigen zu bedecken haben. Daher ist erklärbar, warum ein Serum, um Bakterien zu agglutinieren, etwa 10000 mal mehr verdünnt sein kann, bevor es die agglutinierende Fähigkeit verliert, als bei der Präzipitation.

Wenn diese mit Absicht etwas extrem gehaltenen Verhältnisse auch nicht experimentell dargestellt werden können, so dürfte diese Erklärung von *Zinsser*

¹⁾ *Zinsser*, Journ. of Immun. 18, 483 (1930).

doch genügen, um das obige Argument gegen die unitarische Auffassung von Agglutination und Präzipitation zu entkräften.

Aus *Zinsser's* Darstellung wird auch erklärlich, warum eine Absorption mit homologem Antigen noch die Möglichkeit der einen oder anderen Reaktionsfähigkeit bestehen läßt.

Wenn wir nun versuchen, uns die Ursache der fein- und grobflockend oder körnig ausfallenden Agglutination verständlich zu machen, dann könnte man sich vorstellen, daß die Art der Ausfällung abhängt von der Art der Globuline, an die der Antikörper sitzt. Eine grobflockige Agglutination (oder Präzipitation) wird durch relativ hydrophobe Immunglobuline und eine feinflockige Agglutination durch relativ hydrophile Immunglobuline bewirkt, denn der Grad der Hydrophilie der an die Antigenmizelle adsorbierten Globuline bedingt unter gleichem Milieu und Elektrolytverhältnissen den Grad der Adhäsion der Teilchen aneinander.

III. Die Hämagglutination.¹⁾

Die Hämagglutination ist nur ein Spezialfall der Agglutination von Zellen, und daher müssen die gleichen physikalisch-chemischen Vorgänge auch dieser besonderen Zellenagglutination zugrunde liegen. Wie wir bei Bakterienagglutination eine unspezifische (Spontan-, Elektrolyt-, Säure-, usw.) Agglutination von einer durch Immuneserum bedingten unterscheiden können, so tritt auch die Hämagglutination einmal in streng spezifischer durch Antikörper bedingten Form (z. B. Iso-Hämagglutination), dann aber auch in unspezifischer Form als Kälte-, Auto- oder Pseudo-Hämagglutination auf, mit der die Beschleunigung der Blutzellensedimentation eng zusammenhängt.

¹⁾ Ausführliche Literaturangaben in: *Lattes*, Die Individualität des Blutes (Paris 1929). Übersetzt von *Schiff* (Berlin 1925). — *Landsteiner*, The human blood groups. In *Jordan und Falke*, The newer knowledge of Bacteriology and Immunology (Chicago 1928). — *O. Thomsen*, Hämagglutination mit Einschluß der Lehre von den Blutgruppen. Handb. d. path. Mikroorganismen, III. Bd., II₂ (Jena 1928), 1259. — *V. Friedenreich*, The Thomsen Hemagglutination phenomenon. (Kopenhagen 1930). — *Kettel*, Die Kältehämagglutinine im Menschen Serum (Kopenhagen 1930). — *Schiff*, Über die gruppenspezifischen Substanzen des menschlichen Körpers (Jena 1931). — *Levine*, Erg. inn. Med. **34**, 111 (1928).

A. Die unspezifische Hämagglutination.

Wenn man darunter solche Hämagglutinationen versteht, die nicht durch die α - und β -Gruppenisohämagglutinine hervorgerufen werden, dann bedarf es weiter einer Klärung der für die bleibenden unspezifischen Agglutinationsformen gebräuchlichen Bezeichnungen. Manche Autoren fassen alle diese Formen als Pseudoagglutination zusammen, während *Lattes* unter Pseudoagglutination nur das Phänomen der Geldrollenbildung versteht. Als Panagglutination wird sowohl die von *Mino* beobachtete Kältehämagglutination als auch das *Thomsen'sche* Phänomen bezeichnet. Ebenso wenig ist die Autoagglutination ein eindeutiger Ausdruck, denn die Hämagglutination eigener Blutzellen kann verschiedene Ursachen haben.

Die Einteilung der Hämagglutinationserscheinungen in spezifische und unspezifische findet Schwierigkeiten in unserem unzureichenden Wissen, insofern wir heute noch nicht mit Sicherheit entscheiden können, ob bei Kältehämagglutination oder dem *Thomsen'schen* Phänomen ein Antikörper im bisher üblichen Sinne mitspielt. Da ein wesentliches Charakteristikum eines Antikörpers seine Spezifität ist, so ist es sehr wahrscheinlich, daß die Kälteagglutination kein in diesem Sinne immunbiologischer Vorgang ist, sondern rein physikalisch erklärbar sein muß. Etwas anderes ist es mit dem *Thomsen'schen* Phänomen, auf das später näher eingegangen wird. Ganz sicher rein physikalisch bedingt ist die auch als Autoagglutination bezeichnete Geldrollenbildung, die dem Vorgang der beschleunigten Sedimentierung zugrunde liegt.

I. Die Sedimentation der roten Blutzellen¹⁾.

Bei dieser Erscheinung ist das Primäre die Geldrollenbildung. Diese findet sich nicht bei allen Tieren und da, wo sie vorhanden ist, ist sie sehr verschieden stark ausgeprägt: Beim Pferd sehr stark, beim Rind fast gar nicht. Die Ursachen der Verschiedenheit der S. G. beruhen auf Beeinflussung einerseits der Geldrollenbildung und andererseits der eigentlichen Sedimentation.

1. Ursache und Beeinflussung der Geldrollenbildung.

Die Geldrollenbildung ist ein Agglutinationsvorgang, für den die elektrische (negative) Ladung der Blutzellen, der Gehalt der Suspensionsflüssigkeit (Plasma oder Serum) an geeigneten adsorbierbaren Stoffen und schließlich die p_H des Mediums, die ihrerseits durch den Elektrolytgehalt mitbedingt ist, die maßgebenden Faktoren darstellen. Von besonderer Bedeutung sind die im Plasma vor-

¹⁾ Dieser Abschnitt kann hier nur in größter Kürze berührt werden. Literatur bei *Westergren*, Erg. inn. Med. 26, 577 (1924). — *Katz* und *Leffkowitz*, Erg. inn. Med. 33, 266 (1928). — *Leffkowitz*, Erg. Med. 17, 171 (1932).

handenen adsorbierbaren Stoffe. Adsorbiert man diese an andere negativ geladene Adsorbentien (wie Bolus, Kaolin), so wird dadurch die Stabilität der in einem solchen Plasma suspendierten Blutzellen (*Linzenmeier*) erhöht.

Ferner weisen gewaschene Erythrozyten, wenn in Fibrinogenlösung suspendiert, eine stark beschleunigte Sedimentierung auf, wenn in Globulin, eine weniger beschleunigte, und wenn in Albumin, eine am wenigsten beschleunigte Sedimentierung, was der Erfahrung entspricht, daß Defibrinieren des Blutes die S. G. herabsetzt. Es ist mit den bereits entwickelten Vorstellungen der Adsorption von Globulin an die Antigenmizellen bei der Agglutination und Präzipitation im Einklang, auch hier anzunehmen, daß das jeweils am meisten hydrophobe Eiweiß in der Suspensionsflüssigkeit an die Oberflächen der Blutzellen adsorbiert wird, und von den Eiweißen im Plasma hat das Fibringlobulin den labilsten Charakter und einen isoelektrischen Punkt, der von allen Eiweißen der neutralen Reaktion am nächsten liegt und durch seine bei der Adsorption bedingten Umwandlung in das Fibringel der neutralen Reaktion noch näher kommt, so daß solche Blutzellen nun durch die Elektrolyte des normalen Plasmas soweit entladen werden können, daß das kritische Potential erreicht und die Kohäsion ermöglicht wird. Gewöhnliche Blutzellen können, wenn überhaupt, eben nur ganz labile Globuline adsorbieren, daher auch kein Komplement (Serum nicht Plasma), während sensibilisierte Blutzellen stärker und mehr Globulin adsorbieren können, weswegen die S. G. sensibilisierter Blutzellen unter gleichen Versuchsbedingungen größer ist (*H. Schmidt*).

Auch die Austauschversuche von *Linzenmeier* und *Abderhalden*¹⁾ sprechen für den überwiegenden Einfluß der Plasmaeigenschaften. Aber so groß nun die Bedeutung gewisser Globuline des Plasmas für die S. G. zu sein scheint, so ist es wahrscheinlich, daß die betreffenden Eiweiße diese Rolle erst ausüben können durch Vermittlung von lipoiden Stoffen, mit denen sie im Plasma verbunden sind.

*Theorell*²⁾ zieht aus seiner gründlichen Arbeit über die Rolle der Lipide bei der S. G. den sehr wahrscheinlichen Schluß, daß nur an Eiweiß nicht gebundenes, freies Cholesterin und Lezithin die S. G. in negativem Sinne beeinflussen, aber da Lezithin (wie vermutlich alle Phosphatide) Cholesterin in dieser Hinsicht ersetzen könnte und doch nur das freie Cholesterin quantitativ erfaßbar ist, so ist deswegen auch keine strenge Parallelität zwischen S. G. und ausschüttelbarem Cholesterin zu erwarten. Daher auch die Möglichkeit, daß unter Umständen der Gesamtlipoidgehalt in rasch und langsam sedimentierendem Blute der gleiche sein kann. Aber je rascher die Sedimentierung, desto mehr Globuline im Plasma und je mehr Globuline im Plasma, desto mehr sind Lipide gebunden und desto geringer ist der hemmende Einfluß der freien Lipide auf die S. G. Aber auch eine Parallelität zwischen Fibrinogen- und Globulingehalt und der Menge von gebundenem Cholesterin ist in strengem Sinne nicht aufstellbar wegen der weitgehenden Variabilität der Festigkeit der Cholesterin-Eiweiß-Verbindung in den Plasmen verschiedener Menschen.

Wichtig ist der Einfluß der Verdünnung des Plasmas oder Serums, denn bei einem Serum, das starke Geldrollenbildung (Autohämagglutination) aufweist, die unter Umständen vom Bilde einer spezifischen Isohämagglutination schwer zu unterscheiden ist, genügt schon eine mäßige Verdünnung des Blutplasmas von 1:2 bis 1:3, um die Geldrollenbildung klar hervortreten zu lassen. Da gruppenspezifische Sera nicht in Verdünnungen von 1:30 bis 1:60 deutliche Agglutination

¹⁾ *Abderhalden*, Pflügers Arch. **193**, 236 (1922).

²⁾ *Theorell*, Biochem. Ztschr. **223**, 1 (1930).

zeigen, so ist durch die Verdünnung ein Mittel zur Unterscheidung der spezifischen von der unspezifischen Agglutination gegeben [*Shattock*¹⁾, *Wiltshire*²⁾].

2. Faktoren, die die Sedimentation der roten Blutzellen beeinflussen, seien hier nur aufgezählt, da Mangel an Raum näheres Eingehen darauf verbietet.

a) Die Zahl der Blutzellen in der Volumeneinheit. Je größer diese Zahl, desto langsamer und je kleiner die Zahl, desto schneller ist die S. G. relativ zur normalen.

b) Abweichung von der senkrechten Lage beschleunigt die S. G.

c) Die S. G. ist größer bei höherer Blutsäule und bezüglich der Weite der Röhren bedingen randständige Strömungen, daß bei 2—3 mm die S. G. größer sein kann als bei 5—10 mm Durchmesser.

d) Eine langsame gleichmäßige Bewegung des Blutes, ganz gleich in welcher Richtung, bewirkt eine Beschleunigung der S. G. (*Berczeller*).

e) Bei niedriger Temperatur ist im allgemeinen die S. G. größer (*Theorell*), aber die Verhältnisse werden durch Kälteagglutination kompliziert.

II. Die Kälteagglutination.

Von fast allen Autoren wird im Gegensatz zur Geldrollenbildung die Kälteagglutination als ein Vorgang aufgefaßt, dem die Wirkung von besonderen „Kälteagglutininen“ auf bestimmte „Rezeptoren“ an den Blutzellen zugrunde liegen soll.

Nach *Bialosuknia* und *L. Hirszfeld*³⁾ existiert für die auf die Wirkung von Agglutininen beruhende Hämagglutination ein bestimmtes Temperaturintervall, als thermische Amplitude (th. A.) bezeichnet. Bei den Iso- und Hetero-Agglutininen ist die th. A. 0—40°, bei höherer Temperatur (45—50°) spaltet sich die Verbindung wieder, indem das Agglutinin frei wird, bei noch höheren Temperaturen wird allmählich die agglutinierende Eigenschaft des Serums geschädigt (60—65°) und bei 70° vernichtet [*Yu* 4)]. Die sogenannten Kälteagglutinine haben meist eine kleine th. A. Im menschlichen Serum beträgt diese meist 0—5° und macht sich als Autoagglutination geltend, die auch bezüglich der Art der Agglutinate in Form von Haufen von der der Blutzellensenkung zugrundeliegenden Autoagglutination in Form von Geldrollen verschieden ist. In vereinzelt Fällen kann die th. A. 0—20° höher betragen, und dann ist eine Verwechslung mit Isoagglutination möglich.

Die Tatsache, daß es gelingt, die Kälteagglutinine aus dem Blutserum durch Absorption an Blutzellen zu entfernen und weiterhin durch Waschen der Blutzellen mit NaCl-Lösung in der Kälte und folgendem Erwärmen auf 37° in der NaCl-Lösung frei von Blutzellen zu erhalten (*Landsteiner*), dient als Beweis für die echte Antikörpurnatur der Kälteagglutinine. Hierher gehört die paroxysmale Hämoglobinurie von *Donath* und *Landsteiner* mit einer nur kleinen th. A. und die von *Mino*⁵⁾ be-

1) *Shattock*, Journ. of Path. 6, 303 (1900).

2) *Wiltshire*, Journ. of Path. 17, 282 (1913).

3) *Bialosuknia* und *L. Hirszfeld*, Compt. rend. Soc. Biol. 89, 1361 (1923).

4) *Yu*, Zbl. Bakt. 106, 388 (1928).

5) *Mino*, Dtsch. med. Wschr. 1924, 1533.

schriebene Panagglutination, deren th. A. sehr viel größer ist, die aber andererseits keine Spezifität hat, insofern nicht nur menschliche Blutzellen aller Gruppen, sondern auch Tierblutzellen agglutiniert werden.

Das Vorkommen dieser Kälteagglutinine scheint dem biologischen Gesetz zu widersprechen, demzufolge gegen körpereigene Substanzen keine Antikörper gebildet werden. Jedoch müßte dieses Gesetz nach *Hirszfeld* besser lauten: „Es entstehen niemals Antikörper gegen zirkulationseigene Zellen, die sich unter physiologischen Bedingungen mit ihrem Antigen verbinden können.“

Man verdankt *K. Kettel*¹⁾ eine sehr ausführliche Bearbeitung der Kälteagglutinine, der folgendes entnommen ist:

Agglutiniert ein Serum solche Blutzellen, die es nach sicherer Feststellung der Blutgruppe nicht agglutinieren dürfte, dann ist die Möglichkeit einer Kälteagglutination (K.-A.) vorhanden, die man nun besonders auswerten kann. Dazu sind nur ganz besonders dünne Blutzellensuspensionen (0,25—0,5 Proz.) zu benutzen, da zu dichte Suspensionen die Erkennung geringer Mengen von Kälteagglutininen vereiteln. Die K.-A. erreicht ihr Maximum bei 0° nach Verlauf von etwa 8 Stunden.

Gewaschene Blutzellen lassen sich nicht ganz so gut agglutinieren wie ungewaschene und verlieren bei längerem Aufenthalt in NaCl-Lösung überhaupt ihre Fähigkeit zur K.-A. Aufbewahren im eigenen Serum ist besser, noch besser ist es, stets ganz frische Blutzellen zu benutzen. Ein Serum braucht weder alle Blutzellen zu agglutinieren, noch brauchen Blutzellen von verschiedenen Seren gleich gut agglutiniert zu werden. Das erklärt *Kettel* mit der Annahme verschiedener Kälteagglutinine und denselben entsprechenden spezifischen Rezeptoren. In den meisten Fällen agglutiniert aber das gleiche Serum alle Blutzellen aller Gruppen, wenn auch in verschiedenem Grade.

Während der Gehalt an Isohämagglutininen durch die Gerinnungstemperatur des Blutes nicht beeinflußt wird, ist letztere für den Gehalt an Kältehämagglutininen von Einfluß, da je nach der th. Amplitude das K.-Agglutinin durch die eigenen Blutzellen gebunden werden kann. Will man Kälteagglutinine frei im Serum haben, so ist das Gerinnenlassen des Blutes bei 37° am vorteilhaftesten.

Einstündiges Erwärmen auf 56° schwächt weder die Kälte- noch die Iso-Agglutinine, aber von 60° an werden beide Arten Agglutinine geschwächt, allerdings sind die Isoagglutinine etwas widerstandsfähiger.

Bei sorgfältiger Technik gelang es, im Serum der allermeisten erwachsenen Menschen Kälteagglutinin nachzuweisen, aber einige wenige Sera scheinen solche nicht zu enthalten. Auch die Kälte-Autoagglutination

¹⁾ *Kettel*, Undersøgelse over Kuldehämagglutinin i Menneskeserum (Kopenhagen 1930).

erwies sich als eine überaus häufige Erscheinung. Der Iso- und der Kälte-Agglutinintiter gehen nicht miteinander parallel.

Will man die th. A. richtig bestimmen, so muß man bei jeder einzelnen Untersuchungstemperatur streben, den maximalen Titerwert zu erreichen. Je höher die Temperatur ist, um so schneller verläuft die Reaktion, geht aber auch um so schneller zurück und umgekehrt wird der Endtiter um so höher, je niedriger die Temperatur ist, da bei niedriger Temperatur auch die Dissoziation der Verbindung langsamer stattfindet. Daher empfiehlt *Kettel* zur Feststellung der th. A. bei 0—13° nach 12 Stunden, bei 20° nach 4, bei 37° nach 2, bei 45° nach 1 Stunde und bei 52° nach 20—30 Minuten das Resultat abzulesen. Wegen der verschiedenen Empfindlichkeit der Blutzellen gegenüber der K.-A. ist es besonders bei vergleichenden Untersuchungen zwischen Titer und th. A. verschiedener Sera notwendig, stets ein und dasselbe A- oder B-Blut und dieses in frischem Zustand zu benutzen.

Mit dieser Technik fand *Kettel*, „daß gleichviel, ob es sich um das Anti-A- oder das Anti-B-Agglutinin handelt, diejenigen Sera, die bei einer gewissen Temperatur den nämlichen Titer haben, auch eine und dieselbe th. A. haben. Der Titer steigt mit abnehmender Temperatur und ist bei 0° am höchsten. Die th. A. der Anti-A- bzw. der Anti-B-Agglutination übersteigt in den meisten Sera 45°, in zahlreichen sogar 52°“.

Im Gegensatz zu den Iso-Gruppenagglutininen, deren Titer von den Temperaturen 0°, 25°, 37° nicht beeinflußt wird, ist der Einfluß der Temperatur auf die K.-A. erheblich, in dem Sinne, daß der Titer bei 0° schon bei 10° abnimmt und mit steigender Temperatur immer geringer wird, und nur in ganz seltenen Fällen bei 20° noch nachweisbar ist. Bei 27° oder gar bei 37° fand keine K.-A. mehr statt. Die Größe der th. A. der K.-Agglutination ist zwar vielfach der Höhe des Titers bei 0° proportional, indem die th. A. um so größer ist, je höher der 0°-Titer ist, aber es gibt nicht nur Ausnahmen, wo diese Proportionalität fehlt, sondern sogar solche, wo das Verhältnis umgekehrt ist, so daß eine allgemeingültige Beziehung nicht besteht. Zeigt ein Serum eine hohe th. A. der K.-A., dann pflegt vielfach diese hohe th. A. gegenüber sämtlichen Blutzellen vorhanden zu sein, so daß *Kettel* von einer dem betreffenden Serum innewohnenden Eigenschaft spricht. Jedoch können sich auch die benutzten Blutzellen außerordentlich verschieden verhalten, indem bei einem Serum, auch wenn es einer Reihe verschiedener Blutzellen gegenüber bei 0° den gleichen Titer hat, doch die th. A. bei den verschiedenen Blutzellen verschieden hoch sein kann.

Die Frage: Ist das „Kälteagglutinin“ ein echtes absorbierbares Agglutinin? wird von *Kettel* auf Grund zahlreicher Versuche, bei denen das Serum mit Blutzellen behandelt und aus den abgeschleuderten und in NaCl resuspendierten Blutzellen das wieder abgesprengte Agglutinin nachgewiesen wurde, dahin beantwortet, daß mit Blutzellen, gleich welcher Gruppe, in jedem Serum das Agglutinin absorbierbar und abgesprengt wieder nachweisbar ist. In jedem Serum vermag das Kälteagglutinin Blutzellen aller Gruppen zu agglutinieren, auch die eigenen, die sich in dieser Hinsicht von allen anderen nicht unterscheiden, so daß es ein isoliertes „Autoagglutinin“ nicht gibt. Das bei 0° wirksame Auto-Kälteagglutinin ist das gleiche, das auch alle anderen Blutzellen agglutinieren

kann. *Kettel* erwähnt dann noch, daß die mit Kälteagglutinin beladenen Blutzellen sekundär auch spezifische Isoagglutinine binden können.

Man unterscheidet mindestens drei qualitativ verschiedene Kälteagglutinine, erstens das bei weitem am häufigsten vorkommende Agglutinin, das alle Blutzellen in fast gleichem Grade agglutiniert und ferner die beiden von *Landsteiner* als α_1 und α_2 beschriebenen Agglutinine, auf die wir später noch zurückkommen (Seite 70) und die im Gegensatz zu *Landsteiner*, der sie als Isoagglutinine annimmt, von *Kettel*, *Friedenreich* und *Thomsen* als relativ spezifische Kälteagglutinine betrachtet werden. Möglich, daß es noch mehr verschiedene Kälteagglutinine gibt, wofür eine Beobachtung von *Landsteiner* und *Levine*¹⁾ zu sprechen scheint. Entsprechend nimmt *Kettel* auch qualitativ verschiedene Rezeptoren für diese Kälteagglutinine an. „Alle Blutkörperchen, gleichviel welcher Gruppe, enthalten eine jede Eigenschaft dieser Rezeptoren, wenngleich in höchst verschiedener Menge. Es besteht kein qualitativer, sondern nur ein, mitunter allerdings erheblicher, quantitativer Unterschied in dem Rezeptorapparat der Blutkörperchen für Kälteagglutinin.“ Selbst wenn die Rezeptorenmenge so gering ist, daß die Blutzellen inagglutinabel sind, so vermögen diese doch nachweisbar Kälteagglutinine aus einem Serum zu absorbieren.

Da die Unterschiede der einzelnen Blutzellen nur quantitativer Art sind, mithin jede Blutzelle mit Rezeptoren für Kälteagglutinine ausgestattet ist, so sind alle Kälteagglutinine, also auch die α_1 und α_2 -Agglutinine als Panagglutinine im Sinne von *Mino* zu bezeichnen.

Ist man nun berechtigt, diese Kältehämagglutinine, nur weil sie durch Blutzellen absorbierbar sind, als „Agglutinine“ zu bezeichnen, also als Antikörper im Sinne der spezifischen immunisatorisch erzeugbaren Zellagglutinine?

Zum Antikörperbegriff gehört der Begriff der Spezifität. Aber bei den Kälteagglutininen ist von Spezifität, wie wir sie bei der Isohämagglutination innerhalb der bekannten Blutgruppen haben, keine Rede. Alle Blutzellen, auch manche tierische, vermögen Kälteagglutinine zu absorbieren. Wenn man sich diese Bindung vorstellt als eine unspezifische Adsorption gewisser Globuline des Serums oder Plasmas, wobei die Rolle der Lipide und der Elektrolyte (Ca^{++} -Ionen) noch näher zu untersuchen wäre, so wäre diese Adsorption analog der unspezifischen Globulinbindung an Bakterien und Lipoidmizellen, wie sie u. a. *Eagle* in seinen Arbeiten beschrieb und die durch Waschen wieder reversibel ist. Die Fähigkeit nativer roter Blutzellen, Globuline zu adsorbieren, ist von vornherein gering, was u. a. schon daraus hervorgeht, daß sie die als Mittelstück bezeichneten labilen Globuline des komplementfähigen Meerschweinchen-serums allein nicht adsorbieren können, sondern erst nach primärer Adsorption spezifischer Immunglobuline und der damit verbundenen Änderung der Oberflächenbeschaffenheit. Andererseits zeigt das Phänomen der Blutzellensedimentierung, daß Blutzellen eine gewisse Haftfähigkeit für Fibrinoglobuline oder

¹⁾ *Landsteiner* und *Levine*, Journ. of Immun. 17, 1 (1929).

diesen nahestehende labile Globuline haben, und es liegt daher nahe, dieses Phänomen mit der Kälteagglutination in Beziehung zu bringen. Die Dissoziationsmöglichkeit der Kälteagglutinine darf als solche kein Beweis für die echte Antikörpurnatur der Kälteagglutinine sein, denn es hat den Anschein, als ob die Bindung von Globulin an Antigenoberflächen in weitem Sinne alle Grade von Festigkeit durchlaufen kann: Von den durch bloßes Waschen leicht entfernbaren unspezifischen Globulinen zu solchen, die höhere Temperatur zur Dissoziation brauchen, bis zu den eigentlichen spezifischen Immunglobulinen, bei denen wir ebenfalls verschiedene Grade der Bindungsfestigkeit haben. Die Isohämagglutinine sind relativ lose gebunden, da ihre Dissoziation bei höherer Temperatur relativ leicht gelingt. Die spezifischen Immunhämolsine sind bereits fester gebunden, denn die Dissoziation der Antikörper von sensibilisierten Blutzellen bietet bekanntlich größere Schwierigkeiten und gelingt auch nur teilweise. Es erscheint wahrscheinlich, daß die relativ lose Bindung der Isohämagglutinine in der Regel nur wenig, und dann erst nach längerer Zeit zur Hämolyse führt, im Gegensatz zu der ungleich festeren Bindung der spezifischen Immunhämolsine, die eben dadurch auch eine stärkere Änderung der Blutzellenoberfläche bewirkt, die als solche stattgefunden haben muß, damit die Komplementhämolyse eintreten kann. Die bevorzugte Bindung bei niedriger Temperatur dürfte in der Komplementbindung in der Kälte nach *Jakobsthal* ein Analogon haben und für die Erklärung der Verschiedenheit der thermischen Amplitude dürfte das relativ verschiedene Alter der Blutzellen mit zu berücksichtigen sein.

Von diesen Gesichtspunkten aus scheint es nicht angebracht zu sein, die Kälteagglutinine als Antikörper im Sinne der Immunitätslehre aufzufassen.

B. Die spezifische Hämagglutination.¹⁾

Was physikalische Faktoren bei der spezifischen Hämagglutination betrifft, so fand *Vera Schröder*²⁾, daß die durch Elektroultrafiltration gewonnene Euglobulinfraktion des menschlichen Serums ebenso stark isoagglutinierend wirkt wie natives Serum, während die übrigen Fraktionen unwirksam sind. Dies ist in vollem Einklang mit der an anderen Stellen dieses Buches vertretenen Ansicht, daß nur solche Antikörper auf Antigenmizellen zusammenballend wirken können, die an relativ hydrophobes Globulin gebunden sind. Unterhalb von $p_H = 4$ findet Isohämagglutination nach *V. Schröder* nicht mehr statt, wobei $p_H = 4$ der isoelektrische Punkt der Isoagglutinin-globuline war.

Bei der spezifischen Hämagglutination handelt es sich um Antikörper im immunbiologischen Sinne, die als Heteroagglutinine artfremde und als Isoagglutinine arteigene Blutzellen zu agglutinieren vermögen. Isoagglutinine sind nicht nur beim Menschen, sondern auch bei vielen daraufhin geprüften Tieren, u. a. bei Pferden, Rindern, Kaninchen, Hunden nachgewiesen, haben aber bisher bei Tieren nicht zu Ergebnissen geführt, die für die Rassenbiologie derselben zu verwertbaren Ergebnissen geführt haben. Anders beim Menschen. Hier hat die Isohämagglutination

¹⁾ Zusammenfassende Literaturangaben auf S. 52.

²⁾ *V. Schröder*, Ztschr. Immunitätsforsch. 65, 81 (1930).

durch die Entdeckung der Blutgruppen eine sehr große Bedeutung für die Klinik bei der Bluttransfusion, für die forensische Medizin, für die Rassenkunde und noch für manches andere, wie z. B. die Transplantation, erlangt.

1. Die menschlichen Blutgruppen.

Die Isohämagglutination wurde 1900 zuerst von *Landsteiner*¹⁾ beschrieben, der 1901 drei Blutgruppen unterscheiden konnte. 1902 wurde von *Decastello* und *Sturli*²⁾ die vierte Gruppe festgestellt. In Japan und China soll nach *Furuhata*³⁾ die Kenntnis der Blutgruppen bei Menschen und deren forensische Verwertung schon sei 7 Jahrhunderten bekannt gewesen sein. Die einfachste Erklärung der 4 Blutgruppen gibt die Annahme von 2 Agglutinogenen A und B in den roten Blutzellen und zwei Agglutininen α und β im Serum.

Die Bezeichnung der Blutgruppen ist heute international geregelt, in der älteren Literatur finden sich aber noch die früher üblichen Bezeichnungen nach *Jansky* und *Moss*, weswegen die folgende Tabelle auch diese noch anführt.

Bezeichnung der Blutgruppen nach			Agglutinogene der Blutzellen	Agglutinine des Serums
<i>Jansky</i>	<i>Moss</i>	International		
I	IV	O	—	α und β
II	II	A	A	β
III	III	B	B	α
IV	I	AB	A und B	—

Die gegenseitige streng spezifische Agglutinierbarkeit der Blutzellen ist einerseits an das Vorhandensein der agglutinablen Substanz an den Blutzellen sowie an das korrespondierende Agglutinin im Serum gebunden und kann tabellarisch folgendermaßen wiedergegeben werden, wenn + Agglutination und — keine Agglutination bedeuten.

Serum der Gruppen agglutiniert.

	O	A	B	AB
Blutzellen der Gruppen O	—	—	—	—
A	+	—	+	—
B	+	+	—	—
AB	+	+	+	—

Hat man daher Serum der Gruppen A und B, dann kann man die Blutgruppenzugehörigkeit eines unbekanntes Blutes feststellen.

Die Antigene, die in den Blutzellen den Agglutinogenen A und B entsprechen, und die, da sie in spezifischer Weise die entsprechenden Agglutinine α und β binden, auch als Rezeptoren resp. hier als Iso-Rezeptoren bezeichnet

¹⁾ *Landsteiner*, Zbl. Bakt. **27**, 357 (1900).

²⁾ *Decastello* und *Sturli*, Münch. med. Wschr. **1902**, 1090.

³⁾ *Furuhata*, Jap. med. World **7**, 197 (1927).

werden, konnten von dem übrigen Stroma-Antigen der Blutzellen erst neuerdings getrennt werden (siehe weiter unter S. 63). Über die Besonderheiten des A-Rezeptors siehe S. 66. Dagegen gelingt es, durch spezifische Absorption aus dem Serum die betreffenden Iso-Agglutinine zu entfernen. Die Absorption vollzieht sich am besten in der Kälte. Von den abgeschleuderten und in NaCl-Lösung resuspendierten Blutzellen können sich in der Wärme bei 50° die Agglutinine wieder abtrennen und sind in der NaCl-Lösung nach Trennung von den Blutzellen durch ihre spezifische Wirkung auf die korrespondierenden Blutzellen nachweisbar. Diese Absorbierbarkeit und leichte Eluierbarkeit der Agglutinine wird in der forensischen Technik der Blutgruppenbestimmung benutzt.

Die folgende tabellarische Zusammenstellung gibt eine schnelle Orientierung über die verschiedenen Arten der Hämagglutination.

	Geldrollenbildung	Kälteagglutination	Iso-Gruppen-Agglutination
Art der Agglutinine	keine spezifischen Agglutinine. Unspezifische Eiweißwirkung	vielleicht spezif. Agglutinine aber Panagglutinine	gruppenspezifisch
Absorbierbarkeit der Blutzellen	nicht absorbierbar (?), aber durch Kaolin adsorbierbar.	durch alle Blutzellen absorbierbar	absorbierbar nur in spezifischer Weise
Einfluß der Temperatur	bei niedriger Temperatur gesteigert (Theorell)	nur bei niedriger Temperatur, nicht bei Temp. üb. 25–37°	fast keine Temperaturbeeinflussung zwischen 0–37°
Einfluß der Verdünnung	verschwindet bei stärkerer Verdünnung von $\frac{1}{5}$ an	bleibt je nach Titer erhalten	bei Verdünnung

2. Entstehen der Agglutinogene und Agglutinine.

Die Entwicklung der Agglutinogene setzt schon im intra-uterinen Leben ein, so daß mit wenigen Ausnahmen die Blutzellen Neugeborener agglutinierbar sind. Die gruppenspezifische Differenzierung der Organe soll nach *Semzova* und *Terechova*¹⁾ etwa mit dem 6.—7. Fötalmonat beginnen. Es ist aber eine einwandfreie Bestimmung der Blutgruppe des Säuglings nicht vor 2 Wochen nach der Geburt möglich [*Smith*²⁾] und auch da nur mittels der Blutzellen, nicht mittels des Serums.

Die Agglutinine entwickeln sich später, so daß nach *Hamburger*³⁾ zwischen 3—6 Monaten nur 50 Proz., bei 12 Monaten 75 Proz. und mit Ende des 2. Jahres erst 100 Proz. der Kinder ihre definitiven Agglutinine

¹⁾ *Semzova* und *Terechova*, *Klin. Wschr.* **1929**, 206.

²⁾ *Smith*, *Amer. Journ. Dis. Childr.* **36**, 54 (1928).

³⁾ *Hamburger*, *Presse méd.* **1928**, 186.

haben, und nach *Hara* und *Wakao*¹⁾ erst im 3. Jahre eine einwandfreie Zuteilung zu einer der vier Gruppen möglich ist. Die Differenzierung von A und A¹ ist erst nach Abschluß der Pubertät möglich (siehe unter Untergruppen). Dabei sind die β -Agglutinine in der Entwicklung meist früher nachweisbar als die α -Agglutinine [*Halber*, *Hirszfeld* und *Mayzner*²⁾] und auch meist stärker vorhanden, während das Umgekehrte nur ausnahmsweise vorkommt. [*Kettel*, *Karsten* und *O. Thomsen*³⁾]. Die beim Neugeborenen nachweisbaren Isoagglutinine werden nach *Smith* durch die Plazenta übertragen, und zwar elektiv, so daß nur solche Agglutinine auf das Kind übergehen, die mit seiner definitiven Blutgruppe verträglich sind. *S. H. Polayes*, *M. Lederer* und *A. S. Wiener*⁴⁾ nehmen bestimmte Hemmungsmechanismen an, die das Auftreten von Isoagglutininen gegen das mütterliche Blut verhindern. Die von der Mutter intra-uterin erhaltenen Agglutinine können in den ersten Monaten wieder verschwinden [*Kaboth*⁵⁾].

Nur ganz ausnahmsweise ist der Fötus imstande, von der Mutter verschiedene Agglutinine zu bilden. *Collon*⁶⁾, *N. Liedberg*⁷⁾. Gelegentlich kann das mütterliche Blut für das Kind unverträglich sein, so daß eine vorherige Probe auf Verträglichkeit bei Fällen von Bluttransfusion zwischen Mutter und ihren Neugeborenen angebracht ist, auch wenn im allgemeinen Mütter für ihre Neugeborenen als Blutspender dienen können [*B. de Biari*⁸⁾]. Ausführliche Literatur bei *M. Francotte*⁹⁾.

Die einmal bestimmte Blutgruppe bleibt zwar zeitlebens bestehen, doch wechselt die Stärke der Agglutinine. Nach *O. Thomsen* und *K. Kettel*¹⁰⁾ hat der Agglutinintiter nach einem Anstieg von 1—5 Jahren seine Höhe zwischen 5—10 Jahren und nimmt dann ganz langsam und gleichmäßig ab, so daß mit 90 Jahren der Titer gleich dem bei Säuglingen ist. Die durch die Agglutinationsempfindlichkeit gegen Standardserum gemessene Rezeptorenentwicklung erreicht ihr Maximum erst im 15.—20. Jahre, dann hält sich unter Berücksichtigung geringer Verschiedenheiten in den einzelnen Gruppen der Empfindlichkeitsgrad bis ins höchste Alter.

Zeitliche Schwankungen des Agglutinintiters sind von *W. Fischer*¹¹⁾ bei Frauen im Zusammenhang mit der Menstruation festgestellt worden. Das β - schwankt mehr wie das α -Agglutinin. Obwohl bei der Menstruation

¹⁾ *Hara* und *Wakao*, *Jahrb. Kinderheilk.* **64**, 114, 313, 3. Folge (1926).

²⁾ *Halber*, *Hirszfeld* und *Mayzner*, *Ztschr. Immunitätsforsch.* **53**, 391 (1927).

³⁾ *Kettel*, *Karsten* und *O. Thomsen*, *Ztschr. Immunitätsforsch.* **65**, 245 (1930).

⁴⁾ *S. H. Polayes*, *M. Lederer* und *A. S. Wiener*, *Journ. of Immun.* **17**, 545 (1929).

⁵⁾ *Kaboth*, *Zbl. Gynäk.* **1929**, 1789.

⁶⁾ *N. G. Collon*, *Compt. rend. Soc. Biol.* **96**, 144 (1927).

⁷⁾ *N. Liedberg*, *Acta path. scand.* **6**, 1 (1929).

⁸⁾ *B. de Biari*, *Journ. amer. med. Assoc.* **81**, 1776 (1923).

⁹⁾ *M. Francotte*, *Rev. franc. Pédiatr.* **5**, 109 (1929).

¹⁰⁾ *O. Thomsen* und *K. Kettel*, *Ztschr. Immunitätsforsch.* **63**, 67 (1929).

¹¹⁾ *W. Fischer*, *Arbeiten aus dem Staats-Institut Frankfurt 1929*, H. 20, 49.

die Senkungsgeschwindigkeit am größten ist, besteht doch keine strenge Parallelität zwischen S. G. und Agglut.-Titer. Die Agglutinabilität der roten Blutzellen, gemessen durch die noch eben deutliche Agglutination bewirkende Verdünnung eines hochwertigen Antiserums, bleibt, wenn einmal im Pubertätsalter der Höhepunkt erreicht, anscheinend konstant. Auf Grund der Untersuchungen von *O. Thomsen* und Mitarbeitern, sowie von *Brahn* und *Schiff* besteht die Tatsache, daß die Blutzellen aller erwachsenen Menschen nahezu den gleichen Grad der Agglutinabilität haben (vorausgesetzt, daß frische Blutzellen untersucht werden).

3. Isohämolysine, Iso-Präzipitine und Iso-Opsonine.

Isohämolysine wurden von *Landsteiner* und *Leiner* [1905¹⁾] in Verbindung mit den Blutgruppen festgestellt. Mit der üblichen Technik sind sie schwerer nachweisbar als die Agglutinine, wohl aber gut nachweisbar, wenn mehr Serum [*W. C. Williams*²⁾, *B. B. Jones*³⁾] oder ältere Blutzellen [*Hesser*⁴⁾] genommen werden. Besser ist es, möglichst frisch gewonnene Blutsera zu nehmen [*O. Thomsen*⁵⁾ und *A. Thisded*⁶⁾] und bei 37° zu prüfen. $\frac{1}{2}$ stündiges Erwärmen auf 55° hebt die hämolytische Wirkung irreversibel auf [nicht irreversibel nach *S. Higuchi*⁷⁾], während 20 Minuten auf 50° noch ein Reaktivieren zuläßt, wobei als Komplement entweder menschliches Serum diente, das vorher mit A- und B-Blutzellen absorbierend behandelt war, oder entsprechend behandeltes Meer-schweinchenserum. Die Iso-Hämolysine verhalten sich systematisch ganz wie die Isoagglutinine, indem O-Serum ein Anti-A- und Anti-B-Hämolysin enthält und AB-Serum stets frei von Lysinen gefunden wurde. *O. Thomsen* hält Lysin und Agglutinin für identisch und der Unterschied im Titer (Lysintiter viel geringer als Agglutinititer) liegt nur an der an und für sich viel weniger empfindlichen Reaktion der Lyse bei mit Antikörper beladenen Blutzellen, als es die Agglutination ist.

Die agglutinogenen Substanzen A und B sind aus den Stromata in wässrige Lösung zu bringen und geben dann mit Testserum Präzipitation in der gleichen gruppenspezifischen Weise wie die Agglutination [*Dold* und *Rosenberg*⁸⁾]. Auch werden die Erythrozyten unter dem Einfluß der entsprechenden gruppenspezifischen Antisera im Tropinversuch [*Schiff*⁹⁾] von Leukozyten sehr stark phagozytiert. Mit größter Wahrscheinlichkeit (vgl. Abschnitt XIV) handelt es sich bei den Isoagglutininen, Hämolysinen, Präzipitinen, Opsoninen um die gleichen Antikörper und im Grunde um den gleichen Mechanismus.

1) *Landsteiner* und *Leiner*, Zbl. Bakt. **38**, 548 (1905).

2) *W. C. Williams*, Journ. exper. Med. **32**, 159 (1920).

3) *B. B. Jones*, Amer. Journ. Dis. Childr. **22**, 386, 598 (1921).

4) *Hesser*, Acta med. scand. (Stockh.) **9**, 1 (1924).

5) *O. Thomsen*, Compt. rend. Soc. Biol. **99**, 1599, 1603 (1928).

6) *A. Thisded*, Hosp. tid. (dänisch) **2**, 1367 (1928).

7) *S. Higuchi*, Dtsch. Ztschr. gerichtl. Med. **13**, 428 (1929).

8) *Dold* und *Rosenberg*, Klin. Wschr. **1928**, 394.

9) *Schiff*, Med. Klin. **1925**, 1238.

4. Gruppenspezifische Eigenschaften anderer Zellen und Gewebe¹⁾.

Im Sinne der vier Blutgruppen gruppenspezifisch verhalten sich beim Menschen Spermatozoen [Landsteiner und Levine²⁾, Steuring³⁾], Leukozyten [Wichels und Lampe⁴⁾, Martley⁵⁾, O. Thomsen⁶⁾, der das Bindungsvermögen viel schwächer als bei Erythrozyten fand], jedoch nicht die Blutplättchen [Toda⁷⁾]. Für fixe Organzellen ist von Witebsky und Okabe⁸⁾ für die Gruppe A in Niere und Leber, und von Kritschewsky und Schwarzmann⁹⁾ auch für die Gruppe B, der Nachweis zu erbringen versucht worden, daß sie die A- und B-Antigene enthalten können. Die Art des Nachweises war verschieden: entweder durch spezifische Hemmung der entsprechenden Isoagglutination oder (Witebsky) durch Komplementbindung mit alkoholischen Organextrakten. Kan-Iti Yosida¹⁰⁾ fand gruppenspezifische Antigene in Schilddrüse, Thymus, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Ovar, Lymphdrüsen, Pankreas, Darm, Muskel, nicht in Knorpel, Knochen, Linse, Glaskörper und Gehirn. Schwierig bleibt bei diesen Versuchen die völlige Ausschließung von Blutzellen in den Organen, doch erlauben die Berechnungen von Kritschewsky und Schwarzmann diesen möglichen Fehler ausschließen zu können. Bestätigt wurde die Gruppendifferenzierung der Organe durch Komiya¹¹⁾, L. Hirszfeld, W. Halber u. J. Laskowski¹²⁾. Alkoholische Extrakte von Gehirn und Hoden reagierten niemals gruppenspezifisch. Karzinome, nicht Sarkome, enthielten stets Gruppenantigene, was auch O. Thomsen¹³⁾ für gut- und bösartige Tumoren bestätigen konnte. Die Sachlage wird dadurch sehr kompliziert, daß mit der Komplementbindungsmethode alkohol-lösliche B-Strukturen nicht festgestellt werden können und andererseits nach Schiff das A-Antigen sehr enge Beziehungen zu dem Forssman'schen Antigen hat, wie wir weiter unten sehen werden.

Nach v. Oettingen und Witebsky¹⁴⁾ soll das Plazentagewebe nicht gruppenspezifisch differenziert, also gewissermaßen als neutrale Zone zwischen Mutter und Kind eingeschaltet sein, doch ist Schiff¹⁵⁾ später in wässrigeren Extrakten der Plazenta und Eihäuten der Nachweis der Gruppendifferenzierung geglückt.

Auch in Körperflüssigkeiten sind gruppenspezifische Rezeptoren nachgewiesen worden, so im Blutserum [Schiff¹⁶⁾], Sachs¹⁷⁾], in der Milch [Land-

¹⁾ Ausführliche Literaturangaben auch bei O. Thomsen, Über Gruppenmerkmale des Organismus außerhalb d. Erythrozyten. Med. Welt 1931, Nr. 15.

²⁾ Landsteiner und Levine, Journ. of Immun. 12, 415 (1926).

³⁾ Steuring, Compt. rend. Soc. Biol. 103, 430 (1930).

⁴⁾ Wichels und Lampe, Klin. Wschr. 1928, 1741.

⁵⁾ Martley, Lancet 1, 126 (1924).

⁶⁾ O. Thomsen, Compt. rend. Soc. Biol. 104, 499 (1930).

⁷⁾ Toda, Journ. of Path. 26, 303 (1923).

⁸⁾ Witebsky und Okabe, Ztschr. Immunitätsforsch. 52, 359 (1927).

⁹⁾ Kritschewsky und Schwarzmann, Klin. Wschr. 1927, 2090; 1928, 896.

¹⁰⁾ Kan-Iti Yosida, Ztschr. exper. Med. 63, 331 (1928).

¹¹⁾ Komiya, Ztschr. Immunitätsforsch. 65, 502 (1930).

¹²⁾ L. Hirszfeld, W. Halber und J. Laskowski, Klin. Wschr. 1929, 1563; Ztschr. Immunitätsforsch. 64, 61 (1929).

¹³⁾ O. Thomsen, Ugeskr. Laeg. 1, 409 (1930).

¹⁴⁾ v. Oettingen und Witebsky, Münch. med. Wschr. 1928, 385.

¹⁵⁾ Schiff, Zbl. Bakt. (Ref.) 98, 92 (1930).

¹⁶⁾ Schiff, Klin. Wschr. 1924, Nr. 16.

¹⁷⁾ Sachs, Klin. Wschr. 1930, 2002.

steiner¹⁾, Happ²⁾, Brahn und Schiff], im Urin [Sachs³⁾, O. Thomsen⁴⁾, Yosida⁵⁾], im Speichel [Yosida⁵⁾, Cuboni⁶⁾, Greenfield⁷⁾, Lehrs⁸⁾, Schiff], in der Spermaflüssigkeit [Landsteiner und Levine⁹⁾, Yamakami¹⁰⁾], was wegen des negativen Befundes im Hoden (Hirszfeld) bemerkenswert ist, in Exsudaten [Emile-Weil und Isch-Wall¹¹⁾], im entzündeten Kammerwasser [Mylius¹²⁾], in Tränen und Schweiß [Yosida⁵⁾], in den Verdauungssekreten [Brahn und Schiff], in Fruchtwasser [T. Putkonen¹³⁾]. Dagegen wurden niemals im normalen Liquor, wohl aber im Liquor bei meningitischen Prozessen [Aronowitsch¹⁴⁾] Gruppenrezeptoren nachgewiesen. Weitere Angaben finden sich bei Schiff „Über die gruppenspezifischen Substanzen des menschlichen Körpers (1931)“¹⁴⁾. Schiff hat darüber ausgedehnte Untersuchungen gemacht mit u. a. folgendem Ergebnis:

In Organen wie Niere, Herz- und Skelettmuskeln, Lunge, Aorta und in geringer Menge im Gehirn (insbesondere große Mengen bei einem Fall im Pankreas) fanden sich A- und B-Substanzen, und zwar zu einem wesentlichen Teile in wasserlöslicher Form, ebenso in Körperflüssigkeiten. Alkohollösliche Gruppenstoffe wurden in Blut- und Organzellen, nicht aber in Se- und Exkreten gefunden. Es werden also ständig vom Organismus wasserlösliche Gruppenstoffe durch den Harn (vielleicht auch mit den Fäzes) ausgeschieden.

5. Die Natur der A- und B-Substanzen.

Aus Harn und Speichel ließen sich hoch wirksame gruppenspezifische wasserlösliche Substanzen darstellen, die langsam dialysierbar und hitzebeständig waren. Schiff fand diese Stoffe auf Grund chemischer Untersuchung frei von Eiweiß, sowie, allerdings nur auf Grund der Unlöslichkeit in Alkohol und Chloroform, frei von Lipoiden, jedoch gaben dieselben Reaktionen von Kohlehydraten, und in den gereinigten Lösungen ließen sich Aminosäuren nachweisen. Ferner gaben sie eine starke Reaktion auf Pyrrole. Durch Pepsin- und Trypsineinwirkung wurde die Gruppensubstanz nicht zerstört.

Entsprechend der Hitzebeständigkeit der agglutinogenen Substanz konnten Manteufel und Zantop¹⁵⁾ mit kochkoagulierten Blutzellen von Menschen bei Kaninchen immunisatorisch hochwertige gruppenspezifische Hämagglutinine erhalten, allerdings nur Anti-A-Agglutinine. Mit B-Zellen gelingt die Immunisierung von Kaninchen sehr viel schwerer, was aber im Lichte der weiter unten

¹⁾ Landsteiner, Wien. klin. Rundschau 1902, Nr. 40.

²⁾ Happ, Journ. exper. Med. 31, 313 (1930).

³⁾ Sachs, Klin. Wschr. 1930, 2002.

⁴⁾ O. Thomsen, Ugeskr. Laeg. 1, 468 (1930).

⁵⁾ Yosida, Ztschr. exper. Med. 63, 331 (1928).

⁶⁾ Cuboni, Boll. Ist. sieroter. Milan. 7, 15 (1928).

⁷⁾ Greenfield, Ztschr. Immunitätsforsch. 56, 107 (1928).

⁸⁾ Lehrs, Ztschr. Immunitätsforsch. 66, 175 (1930).

⁹⁾ Landsteiner und Levine, Journ. of Immun. 12, 415 (1926).

¹⁰⁾ Yamakami, Journ. of Immun. 12, 185 (1926).

¹¹⁾ Emile-Weil und Isch-Wall, Compt. rend. Soc. Biol. 88, 173 (1923).

¹²⁾ Mylius, Klin. Mbl. Augenheilk. 85, 88 (1930).

¹³⁾ T. Putkonen, Acta path. scand. (Københ.) 5, 64 (1930).

¹⁴⁾ Aronowitsch, Ztschr. Immunitätsforsch. 49, 466 (1926).

¹⁵⁾ Manteufel und Zantop, Arch. Hyg. f. 103, 75 (1930).

berichteten Erkenntnisse über den Zusammenhang der A-Substanz mit dem *Forssman'schen* Antigen verständlich erscheint.

Die wasserlösliche und die lipoide Fraktion der A-Substanz sollen nach *Schiff* die gleichen wirksamen Gruppen enthalten, denn sie vermögen ein und dasselbe A-spezifische Hämolyisin in der gleichen Weise zu hemmen. Aber während die Lipoide, als Haptene mit Schweineserum kombiniert, als Antigen zu immunisieren vermochten, gelang es mit der gereinigten wasserlöslichen Form weder allein noch in Kombination mit Schweineserum Antikörperbildung hervorzurufen [vielleicht gelingt dies aber durch Adsorption an Kolloidiumteilchen]. In einem gewissen Gegensatz dazu konnte *Hallauer*¹⁾ in Bestätigung früherer Angaben von *Schütz* und *Wöhlich*²⁾ durch bloßes, oftmals wiederholtes Waschen der menschlichen Erythrozyten mit NaCl-Lösung die agglutinogenen A- und B-Substanzen in Lösung erhalten, und es gelang ihm durch Immunisierung von Kaninchen mit der Waschflüssigkeit stark wirksame gruppenspezifische Immunsera ohne Artspezifität herzustellen, doch behaupten letzthin *Plattner* und *Hintner*³⁾ wieder die Unauswaschbarkeit der agglutinogenen Substanzen.

1924 hatten *Schiff* und *Adelsberger*⁴⁾ entdeckt, daß durch Immunisierung von Kaninchen mit A-Blutzellen des Menschen Hämolyisine für Hammelblut entstehen, was zunächst damit erklärt wurde, daß die A-Blutzellen mit den Hammelblutzellen das *Forssman'sche* Antigen gemeinsam haben, und dementsprechend war die Verwendung von Immunhämolyisinen gegen Hammelblutzellen von Kaninchen an Stelle des Anti-A-menschlichen Testserums möglich. Anstatt nun eine Identität der A-Substanz mit dem *Forssman'schen* Antigen anzunehmen, lag es nahe, daß die zur Immunisierung der Kaninchen benutzten Hammelblutzellen A-haltig waren, nachdem schon früher *Bialosuknia* und *Kaczkowski*⁵⁾ festgestellt hatten, daß die Blutgruppe A beim Hammel vorkommt, insofern gewisse Blutzellen das Anti-A-Agglutinin aus den hämolysierenden Immunsereen der Kaninchen absorbieren konnten, und wiederum andere Hammelblutzellen, ebenso wie die menschlichen A-Blutzellen, von dem Kaninchenserum agglutiniert wurden. Eine A-Gemeinschaft ist von *Witebsky*⁶⁾ und *Okabe*⁷⁾ auch zwischen Mensch, Schwein, Kaninchen und Rind nachgewiesen worden, und diese Befunde sprechen gegen eine Identität mit dem *Forssman'schen* Antigen, da letzteres bei Tieren sich nicht findet, die die A-Substanz besitzen, und da andererseits die A-Substanz

¹⁾ *Hallauer*, Schweiz. med. Wschr. 1929, 121.

²⁾ *Schütz* und *Wöhlich*, Ztschr. Immunitätsforsch. 63, 287 (1929).

³⁾ *F. Plattner* und *H. Hintner*, Wien. klin. Wschr. 1931, II, 882.

⁴⁾ *Schiff* und *Adelsberger*, Ztschr. Immunitätsforsch. 40, 335, 367 (1924).

⁵⁾ *Bialosuknia* und *Kaczkowski*, Compt. rend. Soc. Biol. 90, 1196 (1923); Journ. of Immun. 9, 6 (1924).

⁶⁾ *Witebsky*, Ztschr. Immunitätsforsch. 49, 1 (1927).

⁷⁾ *Okabe*, Klin. Wschr. 1927, Nr. 23.

bei diesen Tieren nicht stets vorhanden ist, sondern nur als Gruppenmerkmal vorkommt. Eine gründliche Untersuchung des A-Rezeptors des Hammels stammt von *Komiya*¹⁾. Nach ihm „ist in dem A-Rezeptor des Menschen eine Teilquote des Forssman'schen Antigens, wie es in Hammelblutzellen enthalten ist, nachzuweisen. Dabei können Hammelblutkörperchen noch weitere Teilquoten des A-Rezeptors enthalten, die eine weitgehende, aber keineswegs völlige Identität mit dem A-Rezeptor des Menschen aufweisen. Es empfiehlt sich also zur Erzeugung gruppenspezifischer, auf Menschenblut der Gruppe A wirkender Hammelblut-antisera A-haltiges Hammelblut zu verwenden“.

Nach *Schiff* enthalten die Hammelblutzellen den A-Anteil nur in der lipoiden Form. Es gelang ihm aber durch Kochen mit Alkali die lipoide A-Substanz in wirksame wasserlösliche Form zu bringen, so daß in scheinbarem Gegensatz zu der Annahme, daß der wasserlösliche A-Stoff kein Lipoid enthält, doch die Möglichkeit besteht, daß die Gruppensubstanzen A und B selbst Lipoide sind, die erst durch Alkali wasserlöslich werden. Andererseits steht die Möglichkeit noch zur Diskussion, daß die Alkohol- und Ätherlöslichkeit der Gruppenstoffe (wie auch des *Forssman*'schen Antigens) nur darauf beruht, daß an und für sich unspezifische Lipoide als Lösungsmittel dienen und der spezifischen Substanz einen scheinbaren Lipoidcharakter verleihen, der der gereinigten wasserlöslichen Substanz nicht zukommt (*Schiff*).

6. Immunisatorische Gewinnung gruppenspezifischer Agglutinine.

Mit dem vorausgegangenen steht in engstem Zusammenhang die Möglichkeit, durch Immunisierung von Tieren und Menschen zu hochwertigen Isoagglutininen zu kommen, da die beim Menschen natürlich vorkommenden selten einen höheren Titer als 1:64 haben. Merkwürdigerweise haben alle diesbezüglichen Versuche beim Menschen nicht zu einer Steigerung des Titers der natürlichen Isoagglutinine geführt. Allerdings hat man aus naheliegenden Gründen nicht systematisch gruppenfremdes Blut intravenös geben können. *O. Thomsen*²⁾ nimmt an, daß bereits aus genotypischer Ursache die Konzentration der Isoantikörper für das betreffende Individuum maximal ist und nicht durch Immunisierung überschritten werden kann. Maßgebend für die verschiedene Konzentration bei verschiedenen Menschen sind nach *Thomsen* die genetische Konstitution und das Alter.

Versuche, von Tieren spezifische menschliche Gruppenagglutinine durch korrespondierende Immunisierung zu erlangen, waren zunächst fehl geschlagen [*Kolmer* und *Trist*³⁾], gewannen aber durch die Entdeckung von *Schiff* und *Adelsberger* der bei Hammel- und Menschenblutzellen gemeinsamen A-Substanz greifbare Form. Wie oben erwähnt, ist es also unter Benutzung von Hammel-A-Blutzellen möglich, geeignete Immunsera

¹⁾ *Komiya*, Ztschr. Immunitätsforsch. 67, 319 (1930).

²⁾ *O. Thomsen*, Ztschr. Rassenphysiologie 2, H. 3 (1930).

³⁾ *Kolmer* und *Trist*, Journ. of Immun. 5, 89 (1920).

von Kaninchen zu gewinnen. Nach *Witebsky*¹⁾ und *Dölter*²⁾, sowie *E. Mai*³⁾ sind jedoch nur solche Kaninchen, die schon normale Anti-A-Antikörper enthalten, zu deren immunisatorischen Bildung befähigt. Wegen der nur partiellen Rezeptoren-Gemeinschaft von Hammel- und Menschen-A-Blutzellen wirkt eine kreuzweise Absorption nicht erschöpfend. Durch Hammelblutzellen läßt sich ein α -Agglutinin ebensowenig unwirksam machen wie ein Hammelhämolysin mit A-Blutzellen. Immerhin kommt es zu einer quantitativen Abschwächung.

Manchmal können nach *Witebsky* auch O-Blutzellen Hammelhämolyse bei Kaninchen erzeugen, so daß es den Anschein hat, als wäre das *Forssman*'sche Antigen ein Komplex, dessen Einzelbestandteile selbst bei O-Blutzellen vorhanden sein können, und daß daher *Forssman*'sche Antikörper nicht untereinander kongruent sind, sondern die Sera Partialantikörper gegen das F. A. enthalten, je nach den Partialquoten des F. A., die in dem antikörperspendenden Tier gerade nicht vorhanden sind.

Da man heute zwei Untergruppen von A unterscheidet, so bedarf es weiterer Klärung über deren Zusammenhänge mit Partialquoten des *Forssman*'schen Antigens. Nochmals erwähnt seien in diesem Zusammenhänge die Versuche von *Hallauer* mit den durch Waschen der Blutzellen in Lösung gegangenen A- und B-Rezeptoren bei Kaninchen streng gruppenspezifische Antikörper zu erhalten, aber auch hier gelang dies nur gegen A. B-Antikörper wurden nur in sehr geringem Maße von Kaninchen gebildet und ganz allgemein ist die immunisatorische Erzeugung hochwertiger Anti-B-Sera bei Tieren bisher nicht gelungen. Die mit B- oder O-Blutzellen von Kaninchen erhaltenen Seren erwiesen sich in den Versuchen von *Okabe*⁴⁾ als mehr oder weniger artspezifisch und nicht gruppenspezifisch. Wieweit die Beobachtung von *L. Hirszfeld* und *Halber*⁵⁾, daß das Serum zahlreicher Hühner O- und AB-Blutzellen wesentlich stärker agglutiniert als A-Blutzellen, zur Gewinnung brauchbarer Anti-O- und Anti-B-Sera führen kann, muß weitere Forschung zeigen. *Rosenthal*⁶⁾ und *Rosenthal* und *Salomon*⁷⁾ immunisierten Meerschweinchen mit O-Blutzellen und fanden zunächst, daß das Serum in artspezifischer Weise die Blutzellen aller Gruppen agglutinierte. Nach der Absorption mit A-Blutzellen agglutinierte das Serum aber noch B- und O-Blutzellen, nicht aber AB-Blutzellen, woraus *Rosenthal* folgert, daß das Anti-O-Serum spezifische Agglutinine gegen die Gruppe O besitzt, und daß andererseits in den Blutzellen A oder B noch unbekannte Rezeptoren vorhanden sein dürften, die mit den Rezeptoren der O-Gruppe identisch sind. Diese Versuche werden bis zu einem gewissen Grade ergänzt durch die Feststellungen von *Dujarric de la Riviere* und *Kossovitsch*⁸⁾, daß normales Meerschweinchenserum regelmäßig Blutzellen der A- und AB-Gruppe bei geeigneter Verdünnung hämolysiert, nicht aber solche der B- und O-Gruppe.

¹⁾ *Witebsky*, Ztschr. Immunitätsforsch. **59**, 139 (1928).

²⁾ *Dölter*, Ztschr. Immunitätsforsch. **43**, 95 (1925).

³⁾ *Mai*, Ztschr. Immunitätsforsch. **66**, 213 (1930).

⁴⁾ *Okabe*, Ztschr. Immunitätsforsch. **58**, 22 (1928).

⁵⁾ *L. Hirszfeld* und *Halber*, Compt. rend. Soc. Biol. **99**, 1166 (1928).

⁶⁾ *Rosenthal*, Fol. haemat. **38**, 86 (1929).

⁷⁾ *Rosenthal* und *Salomon*, Compt. rend. Soc. Biol. **101**, 890 (1929).

⁸⁾ *Dujarric de la Riviere* und *Kossovitsch*, Ann. Inst. Pasteur **45**, 107 (1930).

7. Untergruppen.

a) M-, N- und P-Rezeptoren.

Landsteiner und *Levine*¹⁾ berichteten 1927 in einer vorläufigen Mitteilung folgendes:

„Digeriert man eine Anzahl von Seren von Kaninchen, die mit menschlichen Blutzellen immunisiert waren, mit Blutzellen gewisser Menschen ohne Berücksichtigung ihrer Gruppenzugehörigkeit, dann erhält man in einigen Fällen Sera, die eine scharfe Differenzierung menschlicher Blutzellen innerhalb der bekannten vier Gruppen erlauben.“

Die agglutinablen Blutzellen haben einen mit M bezeichneten Faktor. Die Reaktion ist scharf unterscheidbar von Kälteagglutinationserscheinungen, die ebenfalls innerhalb der gleichen Gruppen Unterscheidungen ermöglichen.

Auf die gleiche Weise fanden *Landsteiner* und *Levine*²⁾ noch zwei andere Faktoren, die sie mit N und P bezeichnen, von denen N mit M genetisch in Beziehung steht, P dagegen für Negerblut charakteristisch zu sein scheint. Es fanden sich aber keine entsprechenden Agglutinine in den Seren der Menschen, so daß für den Nachweis der M-, N und P-Rezeptoren nur von Kaninchen gewonnene Immunsere in Betracht kommen.

Der P-Faktor nimmt nach *Schiff*³⁾ eine Sonderstellung ein. Kaninchenimmunsere enthalten ihn nur selten, und da er beim Menschen in wechselnder Stärke vorkommt, so war es nach *Schiff* bisher nicht immer möglich, „P“ und „nicht P“ scharf zu trennen. Sehr viel größere Bedeutung haben aber die M- und N-Rezeptoren erlangt, die, wenn vorhanden, in der Regel kräftig ausgebildet sind und eine scharfe Differenzierung erlauben.

Soweit bisher festgestellt wurde, enthalten alle Menschen entweder M oder N oder beides, während nach *Landsteiner* und *Levine* die Kombination von nicht M und nicht N noch nicht beobachtet wurde, was auch von anderer Seite (*Schiff*) bestätigt werden konnte.

Für die Häufigkeit der M- und N-Faktoren bei uns finden sich folgende Zahlen:

*Schockaert*⁴⁾ fand unter 559 Personen den M-Rezeptor 407 mal, am häufigsten in der AB-, dann in der O-, B- und relativ am wenigsten in der A-Gruppe. Auch bei einigen Föten wurde M in frühen Stadien der Gravidität nachgewiesen. Nach *Schiff* haben bei uns 50 Proz. aller Menschen ++, 30 Proz. +— und 20 Proz. —+, und *Thomsen* und *Clausen*⁵⁾ fanden M bei 74,6 Proz., N bei 70,1 Proz., und 44,6 Proz. hatten beide Rezeptoren.

¹⁾ *Landsteiner* und *Levine*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **24**, 600, 941 (1927).

²⁾ *Landsteiner* und *Levine*, Journ. exper. Med. **47**, 757 (1927); **48**, 731 (1928).

³⁾ *Schiff*, Journ. of Immun. **15**, 589 (1928); **16**, 123 (1929); Dtsch. Ztschr. gerichtl. Med. **18**, 41 (1931).

⁴⁾ *Schockaert*, Compt. rend. Soc. Biol. **100**, 445 (1929).

⁵⁾ *Thomsen* und *Clausen*, Hosp. tid. **1**, 321 (1931).

Da sich bezüglich der Vererbung nach allen bisherigen Untersuchungen die Eigenschaften M und N als voneinander unabhängige dominierende Eigenschaften erwiesen haben, so haben wir, wenn man vorläufig von dem P-Faktor absieht, der noch wenig durchforscht und anscheinend für die europäische Bevölkerung keine besondere Rolle spielt, zwei Möglichkeiten, die Menschen in Gruppen einzuteilen, und zwar in die bekannten vier Gruppen (A, B, AB, O) und unabhängig davon in drei Gruppen: M+N+, M+N-, M-N+. Damit ist die Individualisierungsmöglichkeit eines Blutes beträchtlich gesteigert.

b) Untergruppen von A.

V. *Dungern* und *Hirsfeld*¹⁾ hatten gelegentlich gefunden, daß die α -Agglutinine aus einem B-Serum durch A-Blutzellen nur zum Teil absorbiert wurden. Die übrigbleibende Flüssigkeit agglutinierte noch gewisse aber nicht alle A-Blutzellen. Zu analogen Feststellungen gelangten auch *H. Schütze*²⁾, *Guthrie* und *Huck*³⁾ sowie *Coca* und *Klein*⁴⁾. Während *Lattes* und *Cavazzutti*⁵⁾ zwar die tatsächlichen Befunde bestätigen konnten, die zur Aufstellung eines weiteren Agglutinogen-Agglutininpaars (C, γ) führten, konnten sie doch, ebenso wie *Mino*, die meisten Beobachtungen durch quantitative Unterschiede in der Agglutinabilität der A-Blutzellen sowie durch Annahme der Kälteagglutination (Pseudo-Agglutination) erklären. Besonders bemerkenswert war, daß die Blutkörperchen, die nach *Guthrie* und *Huck* das Antigen C enthalten und deswegen durch mehr Sera als die gewöhnlichen Blutzellen der Gruppe A agglutiniert werden sollen, auch besonders leicht der Pseudoagglutination unterliegen. Immerhin blieb die weiterhin von *Kline*, *Ecker* und *Young*⁶⁾ bestehende Tatsache, daß z. B. bei 162 von 200 Erwachsenen der Gruppe A eine agglutinable Substanz gefunden wurde, die bei den restlichen 38 fehlte.

Nun gelang es *Landsteiner* und *Witt*⁷⁾ in O- und B-Seren zwei Agglutinine nachzuweisen. Die einen vom α -Typ wirkten auf alle Blutzellen, die anderen, mit α_1 bezeichneten, wirkten nur auf A-Blutzellen, die einen besonderen A₁-Rezeptor enthielten, so daß also in der A-Gruppe zwei Arten von Blutzellen: AA und AA₁ zu unterscheiden waren. Durch die Methodik der Kälteagglutination konnten dann *Landsteiner* und *Levine*⁸⁾ eine weitere Untergruppe nachweisen, so daß sich die Annahme zweier besonderer Agglutinine α_1 und α_2 ergab mit entsprechenden A₁- und

¹⁾ V. *Dungern* und *Hirsfeld*, Ztschr. Immunitätsforsch. 13, 52 (1911).

²⁾ *H. Schütze*, Brit. Journ. exper. Path. 2, 26 (1921).

³⁾ *Guthrie* und *Huck*, Bull. Hopkins Hosp. 34, 128 (1923); 35, 23 (1924).

⁴⁾ *Coca* und *Klein*, Journ. of Immun. 13, 477 (1923).

⁵⁾ *Lattes* und *Cavazzutti*, Journ. of Immun. 9, 407 (1924).

⁶⁾ *Kline*, *Ecker* und *Young*, Journ. of Immun. 10, 595 (1925).

⁷⁾ *Landsteiner* und *Witt*, Journ. of Immun. 11, 221 (1926).

⁸⁾ *Landsteiner* und *Levine*, Journ. of Immun. 12, 441 (1926); 17, 1 (1929).

A₂-Rezeptoren. Da außerdem beiden Untergruppen der Rezeptor A gemeinsam ist, wurden die Gruppen mit AA₁ und AA₂ bezeichnet.

O. Thomsen¹⁾ und seine Mitarbeiter *Friedenreich*, *Worsaae* und *Kettel* konnten ebenfalls bei den Blutzellen der A- und AB-Gruppe zwei Typen streng unterscheiden, die sie A und A¹ nannten. Ihre Auffassung weicht aber von der *Landsteiner's* ab, was sich schon in der Bezeichnung ausdrückt. Nach *Landsteiner* müßte das dem Rezeptor A¹ entsprechende α_1 -Agglutinin regelmäßig im Serum der O- und B-Gruppe nach Absorption mit AA₂-Blutzellen übrig bleiben. *Thomsen* und Mitarbeiter halten die A₁- und A₂-Rezeptoren für zwei verschiedene Kälteagglutinine, die in stärkerer Konzentration nur selten vorhanden sind. Das α_1 -Agglutinin von *Landsteiner* wird als Kälteagglutinin aufgefaßt und kann mit einer angemessenen Menge AA₂-Blutzellen (wie auch mit allen anderen Blutzellen) aus O- und B-Serum absorbiert werden. Was vom Agglutininrest übrig bleibt, bezeichnet *Thomsen* mit α_1 -Agglutinin, das aber mit dem von *Landsteiner* so bezeichneten Agglutininrest nach Absorption nicht identisch ist. Was also *Landsteiner* mit AA₁- und AA₂-Untergruppen bezeichnet, entspricht den von *Thomsen* mit A und A¹ bezeichneten Gruppen.

Die Untersuchungen von *Thomsen* haben nun bewiesen, daß die A- und A¹-Gruppen zwei durchaus voneinander unterscheidbare Gruppen sind. Es gelang dies mit der folgenden von *Friedenreich* und *Worsaae*²⁾ ausgearbeiteten Technik.

Um A von A¹ zu trennen, wird bei der Verdünnungsreihe des B-Serums anstatt physiol. NaCl als Verdünnungsmittel Serum der Gruppe A genommen. Die zu prüfenden A-Blutzellen werden gewaschen und in 2 Proz. Aufschwemmung zugegeben: 0,1 ccm der Blutsuspension + 0,1 ccm der Serumverdünnung. Der Serumverdünnung soll der Blutzellenzusatz unmittelbar folgen.

Man nimmt sechs kleine Reagenzröhrchen. In das erste bringt man 0,1 ccm eines starken B-Serums, dann in sämtliche Röhrchen 0,1 ccm des zu prüfenden A-Serums und verdünnt, indem man 0,1 ccm aus dem ersten Röhrchen in das zweite bringt und so fort.

Man verdünnt also ein Anti-A-Serum mit einem A-Serum, das man auf die Agglutinine für A und A¹ prüfen will. Die Agglutination der Blutkörperchen A¹ wird in einem viel stärkeren Maße gehemmt als bei A.

Die graphische Darstellung ergibt Kurven, die die Titer (y) eines B-Serums angeben, das mit dem im Verhältnis zum Serumvolumen dicht zusammengeballten Blutzellenzentrifugat (x) absorbiert ist. Die eine Gruppe bindet erheblich stärker als die andere. Dabei ist wesentlich, daß die Kurven keinen Übergang zeigen. Immerhin besteht natürlich eine gewisse geringfügige Variation in der Bindungsfähigkeit der Agglutinine innerhalb jeder der beiden Gruppen.

¹⁾ O. Thomsen, Compt. rend. Soc. Biol. **130**, 1301 (1930); Klin. Wschr. **1930**, 67; Hosp. tid. **2**, 1077 (1929); Med. Welt **1930**, Nr. 16 und 17.

²⁾ *Friedenreich* und *Worsaae*, Hosp. tid. **2**, 1077 (1929).

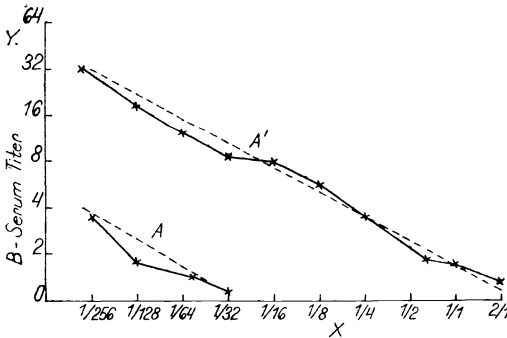


Fig. 4.
Verhältnis von
Blutzellenzentrifugat
zum Serumvolumen.

Ein weiterer Unterschied zwischen A und A¹ besteht nach *Thomsen*¹⁾ im Verhalten der Blutzellen gegenüber dem im O- und B-Serum enthaltenen Anti-A-Lysin. Bei Zimmertemperatur werden die A-Blutzellen schwach oder gar nicht von einem Serum mit angemessenem Lysingehalt agglutiniert, gehen aber mehr oder weniger vollständig in Lösung. Das A¹-Blut wird dagegen kräftig agglutiniert, geht aber entweder gar nicht oder nur zu einem sehr kleinen Teil in Lösung. Bei 37° geht dieser Unterschied zum größten Teil verloren.

Nach allem, was wir heute wissen, bleibt die Blutgruppe eines Menschen zeitlebens konstant und alle Angaben von Änderungen der Blutgruppe unter dem Einfluß von Krankheiten oder Medikamenten halten der Kritik nicht stand. Dieser Umstand, sowie die nach bestimmten Gesetzen sich vollziehende Vererbung haben erst die große Bedeutung der Blutgruppen für Rassenkunde und gerichtliche Medizin zur Folge gehabt.

C. Das Thomsen'sche Phänomen.

O. Thomsen (1926) entdeckte ein bakterielles Agens, das imstande ist, die Blutzellen aller Gruppen in charakteristischer Weise so zu verändern, daß sie von allen menschlichen Seren (auch von denen der AB-Gruppe) agglutiniert werden. Dieses Phänomen wurde dann in der folgenden Zeit von *O. Thomsen* und *V. Friedenreich* gründlich bearbeitet und weitgehend geklärt. Bezüglich der Literatur über diesen Gegenstand sei auf die monographische Darstellung des *Thomsen'schen* Phänomens von *V. Friedenreich*, 1930 (englisch, bei *Levine* und *Munksgaard*, Kopenhagen) hingewiesen, und wegen der großen Bedeutung, die das Th.-Phänomen über die einer Fehlerquelle bei der Isoagglutination hinaus ganz allgemein zum

¹⁾ *Thomsen*, Münch. med. Wschr. 1930, 1190.

Antigen- und Spezifitätsproblem gewonnen hat, sei ausführlicher an Hand des zitierten Buches auf dasselbe eingegangen:

Die das Th.-Phänomen am besten bewirkenden Bakterien M- und J-Bazillen sind coryne-artige Bakterien. Aber es sind noch einige andere Bakterien gefunden worden wie einige Cholerastämme, *Vibrio Nasik* u. a. Vibrionen, sowie einige phosphoreszierende (zufällig?) Bakterien wie der *Vibrio phosphorescens* und der *Coccobacillus Pierantonii*. Die die Blutzellen „transformierende“ Eigenschaft ist demnach weder außerordentlich selten noch auf bestimmte Gruppen von Bakterien beschränkt. Der Mechanismus der Wirkung auf die Blutzellen scheint bei allen diesen Mikroorganismen der gleiche zu sein.

Das bakterielle Agens agglutiniert selbst nicht, bewirkt auch keine Hämolyse, sondern bewirkt, daß die Blutzellen in selbst $\frac{1}{40}$ verdünntem Serum in einer Art agglutinierbar sind, die von dem Bilde der Isohämagglutination nicht zu unterscheiden ist. Die einmal erworbene Agglutinabilität ist durch Waschen nicht entfernbar. Nur die lebenden und sich vermehrenden (bei 22° nicht bei 37°) Bazillen können diese Veränderung bewirken, die sich besonders wirksam in dem keimfreien Bouillonkulturfiltrat der J- oder M-Bazillen nachweisen läßt und mittels dieses Filtrates schon in etwa 10—20 Minuten hervorgerufen werden kann. Das Agens ist bei 65° irreversibel inaktiviert, ist aber andererseits in getrocknetem Zustand monatelang haltbar.

Die Agglutination wird nun durch einen Faktor im Serum bedingt, der, und zwar nur durch transformierte Blutzellen (T-Blutzellen), aus dem Serum in spezifischer Weise absorbiert werden kann, weswegen dieser Faktor als T-Agglutinin bezeichnet wird. Z. B. T-Blutzellen der Gruppe O können aus O-Serum nur das T-Agglutinin ohne praktischen Verlust der α - und β -Agglutinine entfernen, und umgekehrt können A- und B-Blutzellen aus O-Serum die β - und α -Agglutinine absorbieren, ohne dem Serum die Fähigkeit zu nehmen T-O-Blutzellen zu agglutinieren. Schließlich reagieren T-A- und T-B-Blutzellen sowohl auf β - und α - wie auch auf T-Agglutinine. Das sieht also ganz so aus, als ob die Agglutination von T-Blutzellen von einem besonderen (T)-Agglutinin bedingt ist, das in allen menschlichen Seren vorkommt und von den α - und β -Agglutininen unabhängig ist. Mit der gleichen Berechtigung, mit der wir die den α - und β -Agglutininen entsprechenden B- und A-Rezeptoren als Partialantigene in den Blutzellen annehmen, können wir von einem T-Rezeptor sprechen, der sich durch die Behandlung mit den J-Kulturfiltraten an der Blutzelle gebildet hat. Welcher Art ist nun der Prozeß, der sich zwischen den J-Bazillen und der Blutzelle abspielt?

Durch die Tatsache, daß sich das Th.-Phänomen am reinsten mit keimfreiem Bakterienfiltrat darstellen läßt, ist jedes Mitspielen von agglutinatorischen Phänomenen auszuschließen. Dazu kommt, daß ein gegen J- oder M-Bazillen gerichtetes Kaninchen-Immunsorum T-A-Blutzellen nicht stärker agglutiniert, als ein normales Kaninchen es tut; und anschließende Absorption des Bakterienagglutinins durch die betr. Bazillen nimmt dem Serum nicht die Fähigkeit,

T-Blutzellen zu agglutinieren [Hallauer¹]. Das wesentliche ist also eine Veränderung der Blutzellen.

Die vorher gewaschenen und dann nach Behandlung mit dem J-Filtrat nochmals gewaschenen Blutzellen zeigen weder eine morphologische Verschiedenheit noch eine Resistenzveränderung gegen Hypotonie im Vergleich zu unbehandelten Blutzellen. Wenn auch im Filtrat das Agens fertig an die Blutzellen herantreten kann, so vergeht bis zur Erwerbung der Agglutinabilität doch eine gewisse Latenzperiode, deren Länge aber symbat mit Zunahme der Filtratmenge abnimmt. Zu beachten ist, daß die maximale Bindung der wirksamen Substanz bereits zu einer Zeit erfolgt, in der die Blutzellen noch nicht agglutinierbar sind. In dem Maße, in dem der Prozeß fortschreitet, wird die Bindung reversibel, so daß zu der Zeit maximaler erworbener Agglutinabilität das transformierende Agens wieder fast vollständig in der Flüssigkeit vorhanden ist. Also wie bei einem katalytischen Prozeß ist das Agens nicht in das Endprodukt der Reaktion eingetreten. An der Blutzelle muß während dieses Prozesses etwas stattgefunden haben, was man serologisch als Rezeptorbildung bezeichnen muß, und der neugebildete Rezeptor hat für das Agens keine weitere Affinität mehr.

Das Agens ist durch Alkohol fällbar, nicht dialysierbar, durch Erwärmen inaktivierbar, wobei die Inaktivierungstemperatur von der p_H abhängt. Die Transformierung der Blutzellen hat ein p_H -Optimum bei p_H 6—7. Das Agens wird von den lebenden Bakterien nur bei 22°, nicht bei 37° gebildet. Nach alledem scheint das wirksame Agens, das den T-Rezeptor bildet, ein Ferment zu sein.

Das T-Agglutinin fehlt im Serum Neugeborener und kleiner Kinder, ist aber stets im Serum Erwachsener vorhanden in Mengen, die individuell stark schwanken und weder mit dem Titer der Isoagglutinine zusammenhängen (*Kettel*) noch irgendeine Proportionalität zu Kälteagglutininen zeigen. Iso- und Kälteagglutinine können aus dem Serum absorbiert werden ohne Titeränderung für die T-Agglutinine und umgekehrt.

Vergleicht man T-, Iso- und Kälte-Agglutinine in Seren, bei denen diese Agglutinine bei 0° den gleichen Titer haben (*Kettel*), so sieht man (Fig. 5), daß alle drei Agglutinine ihr Maximum bei 0° haben und mit steigender Temperatur in verschiedenem Grade abnehmen, T-Agglutinine am meisten, Kälteagglutinine am wenigsten.

Wir haben also in dem *Thomsen*'schen Phänomen die Tatsache vor uns, daß durch einen der Sachlage nach scheinbar fermentativen Prozeß ein als solches unbekanntes Substrat der roten Blutzellen in seiner Spezifität so geändert wird, daß es nun spezifisch auf einen Antikörper im Serum reagiert, wobei die Bindungsfähigkeit nur quantitativ durch die Menge des in den Blutzellen gebildeten Reaktionsproduktes (T-Rezeptor) bestimmt zu sein scheint. Diese Änderung der antigenen Spezifität durch

¹) Hallauer, Ztschr. Immunitätsforschg. 67, 15 (1930).

fermentative Eingriffe paßt zwar durchaus in den Rahmen der von *Obermeyer*, *Pick* und *Landsteiner* ermittelten experimentellen Tatsachen über Änderung der Spezifität, nur mit dem Unterschied, daß für die Feststellung der neuen Spezifität keine Immunisierung nötig ist, sondern daß der spezifische Antikörper bereits vorhanden ist. Dieser letztere Umstand ist allerdings sehr merkwürdig, aber nach *Friedenreich* nicht mehr, als das Vorhandensein von Normalantikörpern überhaupt.

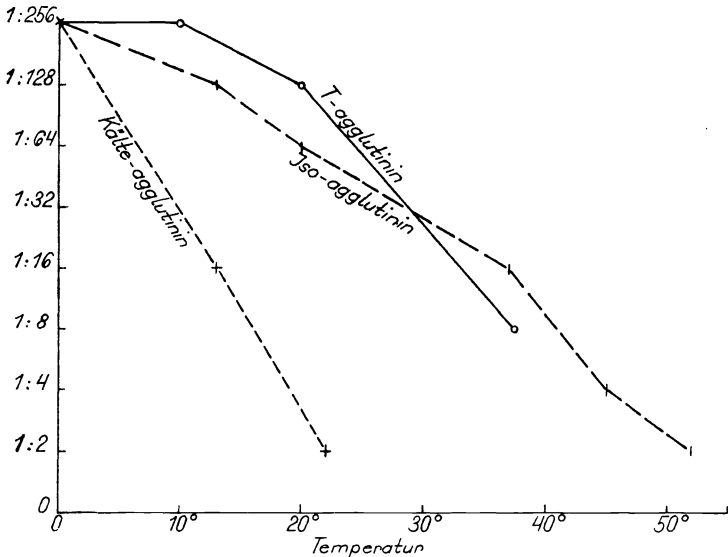


Fig. 5. Abnahme des Titers mit steigender Temperatur von T-, Iso- und Kälte-agglutininen, die bei 0° den gleichen Titer haben. [Aus *Friedenreich*, The Thomsen Hemagglutinationphenomenon (1930), 66.]

Nun vermag das Agens der M- und J-Bazillen in gleichem Sinne die Blutzellen aller soweit geprüften Tierarten (Meerschweinchen, Schaf, Pferd, Hund, Schwein, Ratte, Huhn, Rind, Kaninchen), zu transformieren, wobei sich die gebildeten T-Rezeptoren nur quantitativ, aber nicht qualitativ von den T-Rezeptoren menschlicher Blutzellen unterscheiden. Mithin erhalten alle diese Blutzellen das gleiche Substrat, welches als solches keine, bisher nachweisbare, serologische Spezifität aufweist.

Ob auch andere Gewebezellen diese neue Spezifität erwerben können, ist noch wenig untersucht. Versuche von *Friedenreich* und *Thune Andersen*¹⁾ scheinen bei Meerschweinchen-Organzellen negativ ausgefallen zu sein.

Wenn im vorhergegangenen die T-Rezeptor-Agglutininbeziehung als spezifisch bezeichnet wurde, so ist damit nach *Friedenreich* die durchaus

¹⁾ *Friedenreich* und *Thune Andersen*, Acta path. scand. (Kopenh.) 6, 236 (1929).

nicht absolute Spezifität der Agglutinine und der Antikörper überhaupt gemeint. *Eisler* und *Fujioka*¹⁾ und *Hirota*²⁾ ziehen eine mehr physikalisch-chemische Deutung der T-Agglutination vor, doch ist im Grunde eine physikalisch-chemische Serumfunktion mit einer gewissen spezifischen Wirkung nur ein anderer Ausdruck für den serologischen Antikörperbegriff. Die Schwierigkeit liegt darin, daß wir weder über die Natur der beteiligten Molekülgruppen in der neu erworbenen Antigenstruktur der Blutzellen etwas wissen, noch über den Chemismus, der der serologischen Spezifität zugrunde liegt. Nur ist für die Erkenntnis des letzteren schon viel mit der *Landsteiner*'schen³⁾ Idee gewonnen, daß anscheinend eine Spezifität schon durch die kombinierte Wirkung einer begrenzten Zahl von an sich unspezifischen Serumfunktionen zustande kommen kann.

IV. Die spezifische Präzipitation.

1. Die verschiedenen Erscheinungsformen der Präzipitation.

Es gibt bekanntlich drei Methoden zur Anstellung der spezifischen Eiweiß-Antieiß-Präzipitation: Entweder wird zu einer konstanten Antigenmenge fallende Mengen von antikörperhaltigem Serum zugesetzt oder zu konstanten Mengen von Immuns Serum fallende Mengen des Antigens. In beiden Fällen werden die Komponenten gemischt und der Präzipitintiter des Serums wird in der Regel durch die größte Verdünnung des varierten Eiweißes ausgedrückt, bei der die Mischung nach bestimmter Zeit und bei bestimmter Temperatur noch eine deutliche Trübung aufweist. An Stelle der Trübung kann auch die Ringbildung verwertet werden wie bei der dritten Methode, bei der konstante Immunsereumengen mit steigenden Verdünnungen von Antigen vorsichtig überschichtet werden.

Die Präzipitation ist als Ausdruck der gegenseitigen Beeinflussung zweier kolloider Lösungen am deutlichsten bei den Mischungen von Antigen- und Antikörperlösungen, wo man auch die typischen Flockungsoptima beobachten kann, während die Ringmethode die Empfindlichkeit des Immunglobulins durch die Mindestmenge von Antigen mißt, mit der es noch zusammen durch Elektrolyte an der Kontaktstelle eine zur sichtbaren Trübung genügende Dispersitätsvergrößerung erleidet oder mit anderen Worten, man mißt durch die Antigenverdünnung das Minimum

¹⁾ *Eisler* und *Fujioka*, Wien. klin. Wschr. **1928**, 912.

²⁾ *Hirota*, Ztschr. Immunitätsforsch. **58**, 78 (1928).

³⁾ *Landsteiner*, Münch. med. Wschr. **1905**, 1902; Ztschr. Hyg. **58**, 213 (1908).

an Kondensationskernen, an denen sich das verfügbare Immunglobulin soweit kondensieren kann, daß das zum Sichtbarwerden nötige Minimum an Agglomeration der A. A.-Komplexe eintritt.

2. Die quantitativen Verhältnisse bei der Präzipitation.

Nur wenn Antigen und Antikörper in gewissen Verhältnissen ihrer Konzentrationen zueinander stehen, kommt eine sichtbare Präzipitation zustande, und diese bleibt aus, wenn eine der beiden Komponenten im Überschuß vorhanden ist. Es sind also zweifellos quantitative Beziehungen zwischen den beiden Reaktionskomponenten vorhanden, und nach *Dean*¹⁾ kann man sagen, daß für eine bestimmte Menge Immuneserum es eine bestimmte Antigenmenge zur optimalen Präzipitation gibt. Als besonders prägnantes Beispiel für das Bestehen eines festen Konzentrationsverhältnisses bei optimaler Präzipitation sei das folgende von *Dean* hier wiedergegeben:

Antigen:

Je 5 ccm norm. Pferdeserum
verdünnt 1:

Antikörper:

Je 5 ccm Kaninchen-Antipferdeserum
verdünnt 1:5
1:10

	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	K
70	140	190	200	110	160	46	30	20	10	7,5	0	
5	30	65	80	120	60	25	15	7,5	5	2,5	0	

Die Zahlen geben das Volumen des Präzipitates in cmm nach 4stündigem Stehen des Reaktionsgemisches.

Diese optimale Proportion wurde von *Dean* und *Webb*²⁾ zu einem Verfahren der gegenseitigen Auswertung von Immuneserum und Antigen ausgearbeitet. Wesentlich ist dabei, die Antisera verdünnt anzuwenden, meistens 1:20 verdünnt, bei hochwertigen Sera auch 1:40. Dabei konnten im Falle von Pferdeserum als Antigen noch quantitative Unterschiede von 0,0001 ccm nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Antigen zu Antiserum ist bei sehr wirksamen Immuneseren etwa 1:10, bei schwächeren ca. 1:100, d. h. zur optimalen zeitlich am schnellsten eintretenden Flockung muß in der Mischung auf eine bestimmte Antiserummenge etwa der 10. bzw. der 100. Teil dieser Menge an Antigen vorhanden sein. Diese Verhältniszahl kann bei bekanntem Antikörper ein Maß für das Antigen sein und umgekehrt. *Dean* und *Webb* nehmen z. B. als Präzipitineinheit diejenige Serummengde, welche mit 0,00001 ccm Pferdeserumantigen optimal flockt. Ist diese Serummengde gerade in 1 ccm Serum, so wäre dies Serum 1fach, in 0,5 ccm 2fach. War z. B. bei einem Pferdeeiweiß präzipitierenden Serum das Antigen-Antiserum-Verhältnis 1:200, so würden 0,00001 ccm Pferdeserumantigen mit der 200fachen Menge Antiserum optimal flocken, also mit 0,02 ccm Serum, welche Serummengde also eine Präzipitineinheit enthielt. Mithin wäre das Serum 500fach.

¹⁾ *Dean*, Ztschr. Immunitätsforsch. **11**, 58 (1911).

²⁾ *Dean* und *Webb*, Journ. of Path. **29**,, 473 (1926); **31**, 89 (1928).

Auch *Cromwell*¹⁾ hatte quantitative Messungen ausgeführt und fand, daß sich, allerdings nur mit einfachen Antigenen, wie z. B. krist. Eialbumin, nicht mit komplexem Antigen wie Serum, der Antikörpergehalt eines Immunsersums ziemlich genau nach einer Formel berechnen läßt, wenn man den Antigentiter und die größte Präzipitatmenge (stärkste Reaktion) mit einer Serumverdünnung bestimmt hat. Der Antigentiter variiert mit dem Antikörpertiter und bei maximaler Präzipitation glaubt *Cromwell* multiple Proportionen annehmen zu dürfen.

Zu einer anderen Auffassung der quantitativen Beziehungen kamen *M. Heidelberger* und *F. E. Kendall*²⁾, die den Präzipitationsvorgang an einem für quantitative Messungen besonders geeignetem Versuchsbeispiel studierten. Sie benutzten als Antigen das hoch gereinigte N-freie spezifische Polysaccharid des Pneumokokkus Typ III und als Antikörper ein nach der Methode von *Felton* gereinigtes und konzentriertes Anti-III-Pneumokokken-Pferdeserum und untersuchten die experimentell ermittelten Daten der Zusammensetzung des spezifischen Präzipitats und der übrigbleibenden Lösung unter dem Gesichtspunkte des chemischen Massenwirkungsgesetzes. Aus ihren Versuchen ging hervor, daß bei konstanter Antikörpermenge (A) und zunehmender Menge des Polysaccharids (S) das Verhältnis der beiden Komponenten im Präzipitat bei dessen geringster nachweisbarer Bildung 120:1 und etwa 60:1 im Zustand des Gleichgewichtes war, wenn sowohl A wie S in der überstehenden Flüssigkeit nachweisbar waren. Es sieht also so aus, als ob eine geringe Menge von B mit viel A ein Präzipitat im Verhältnis 120:1 liefert. Zunahme von S bildet dann eine Verbindung im Verhältnis 60:1. Symbolisch ausgedrückt sind die Grenzverbindungen, die sich bei geeigneten Mengenverhältnissen bilden können: $A + S \rightleftharpoons AS$ (120:1) und $AS + S \rightleftharpoons AS_2$ (60:1). Ist AS_2 gebildet, ist insofern ein Gleichgewicht gebildet, als sich S leicht ausschütteln läßt und dann mit A wieder reagieren kann. Dieses Gleichgewicht kann man ausdrücken mit der Formel:

$$\frac{[A] \cdot [S]^2}{[AS_2]} = K.$$

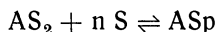
Unter einigen vereinfachenden Voraussetzungen gelangten die Autoren zu einem annähernden Wert von K (0,0135), mittels dessen sich die Mengenverhältnisse von A und S in Größenordnungen berechnen ließen, die den Experimenten entsprachen.

Wird nun S über diesen Gleichgewichtszustand hinaus zugesetzt, dann löst sich das Präzipitat wieder, und wenn in den Versuchen der Autoren mindestens 100mal soviel S vorhanden war als zum Erreichen des Gleichgewichtes genügte, kam überhaupt keine Präzipitation mehr zustande. Dieser Lösungseffekt ist genau so spezifisch wie die A-S-Reak-

¹⁾ *Cromwell*, Journ. inf. Dis. **37**, 321 (1925).

²⁾ *M. Heidelberger* und *F. E. Kendall*, Journ. exper. Med. **50**, 809 (1929).

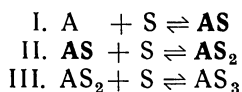
tion, denn das spezifische Typ I-Präzipitat ist in S III-Lösung ebenso unlöslich, wie das Typ III-Präzipitat in S I-Lösung, während in homologer Lösung das Präzipitat leicht löslich ist. Diese Lösung ist bei Verringerung der Konzentration von S reversibel. Nimmt man daher das Präzipitat im Gleichgewicht wie oben mit AS_2 an, dann schreitet die Reaktion bei weiterer Zugabe von S im Sinne der folgenden Formel vor:



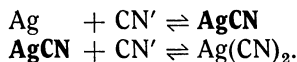
und für die Lösungsbedingung muß gelten:

$$\frac{[AS_2] \cdot [S]^n}{[A Sp]} = K.$$

Auch diese Bedingung ließ sich unter vereinfachenden Voraussetzungen rechnerisch mit den experimentellen Ergebnissen in Einklang bringen, wobei sich für n der Wert 1 ergab. So gelangten *Heidelberger* und *Kendall* zu der Auffassung, daß sich die spezifische Pneumokokkus III-Polysaccharid-Präzipitation in den folgenden 3 Phasen abspielt:



wobei die fett gedruckten Verbindungen Präzipitate darstellen. Wegen der schweren Löslichkeit von AS strebt die Reaktion dahin, nach I zu verlaufen. Steigt die Konzentration von S, dann bildet sich AS_2 auf Kosten von AS, bis das Gleichgewicht erreicht ist. AS_2 hat eine gewisse Löslichkeit und Dissoziationsbestreben, weswegen in diesem Punkte A und S in der Lösung nachweisbar sind. Wird in diesem Stadium A zugefügt, dann bildet sich wieder AS, und wenn S zugefügt wird, dann geht die Reaktion im Sinne von II weiter, bis alles A und S in Form der AS_2 -Bindung vorhanden ist. Bei weiterem Zusatz von S bildet sich das lösliche AS_3 . Diese einfache Erklärung der spezifischen Präzipitation hat manche Analoga in der Chemie, und die Autoren erwähnen ein solches in der folgenden Reaktion:



Das erste Stadium dieser Reaktion entspricht den obigen I und II und die Wiederauflösung des Silbercyanids im Überschuß von CN' dem obigen Stadium III. Dabei ist, um die Analogie vollständig zu machen, zu beachten, daß in diesem Falle S das Anion der Aldobionsäure ist. In diesem Falle ist also die sog. Vorzone oder Hemmungzone (siehe S. 148) bei der spezifischen Präzipitation durch Annahme der Bildung löslicher Reaktionsprodukte erklärt.

Analog wie in dem III. Stadium der A-S-Präzipitation der Überschuß von S wirkt, ist wahrscheinlich auch die Beobachtung von *Th. Francis*¹⁾ zu erklären, der zufolge durch Immuneserum agglutinierte Pneumokokken durch Zusatz größerer Mengen des löslichen homologen Polysaccharids wieder dispergiert werden und nach Entfernung des Polysaccharidüberschusses erneut agglutinabel sind.

3. Die Zusammensetzung des Präzipitates.

Wir müssen die Präzipitine wie die Agglutinine als mit spezifischen Bindungsaffinitäten versehene Serumglobuline auffassen. Wird durch Thoriumsulfat [*Doerr*²⁾] das Globulin eines schwach präzipitierenden Immuneserums gefällt, und der Niederschlag in einem anderen Immuneserum wieder gelöst, so wird dessen Präzipitintiter gesteigert. Der Präzipitationsvorgang ist höchstwahrscheinlich wie der bei der Agglutination eine adsorptive Bindung des Immunglobulins an die als Kern dienende Antigenzelle. Werden nach *F. S. Jones*³⁾ Kolloidiumteilchen mit Antigen adsorptiv beladen, dann nach Waschen resuspendiert in NaCl-Lösung, so kann sich Immunglobulin aus zugesetztem antikörperhaltigem homologem Serum an die Kolloidiumteilchen binden, die dadurch agglutinieren. Wenn man aber umgekehrt verfährt, also die Kolloidiumteilchen erst mit dem Immuneserum behandelt und dann nach Waschen derselben mit der Antigenlösung, so wird zwar Antigen gebunden, die Teilchen aber nicht agglutiniert (weil die Schicht denaturierten Globulins hier sich nicht außen befindet und daher die Teilchen nicht gegen die Kationen des Milieus empfindlich genug sind).

Da die Antigenmizelle bei der Präzipitation relativ viel kleiner ist wie bei der Agglutination, worauf schon auf S. 51 verwiesen wurde, so besteht das Präzipitat vorwiegend aus den Globulinen des Immuneserums, enthält aber natürlich auch Antigen, wie das u. a. von *Weil*⁴⁾ durch Anaphylaxieversuche hat nachgewiesen werden können.

Auch durch chemische Analyse ist der Nachweis erbracht worden, daß das Präzipitat sowohl Antigen als auch Antikörper enthält. Es seien von den letzten Arbeiten über diese Fragen, die von *Hsien-Wu*, *Lan-Hua Cheng* und *Chen-Pien Li*⁵⁾ sowie die von *Fr. Breinl* und *F. Haurowitz*⁶⁾ erwähnt. Die Erstgenannten arbeiteten mit Hämoglobin als Antigen und fanden, daß das Präzipitat nur aus Hämoglobin und Eiweiß des Immuneserums bestand, aber der fast konstante Gehalt des Präzipitates an Hämoglobin in ihren zahlreichen Versuchen läßt die Verfasser eher eine chemische (stöchiometrische) Reaktion bei der Präzipitation annehmen als eine mehr physikalische Reaktion zwischen Kolloiden. Ebenfalls mit Hämoglobin als Antigen arbeiteten *Breinl* und *Haurowitz*. Bei

¹⁾ *Th. Francis*, Journ. exper. Med. **55**, 55 (1932).

²⁾ *Doerr*, Koll.-Ztschr. **27**, 277 (1920).

³⁾ *F. S. Jones*, Journ. exper. Med. **46**, 303 (1927); **48**, 183 (1928).

⁴⁾ *Weil*, Journ. of Immun. **1**, 19, 35, 47 (1926).

⁵⁾ *Hsien-Wu*, *Lan-Hua Cheng* und *Chen-Pien Li*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **25**, 853 (1928).

⁶⁾ *Fr. Breinl* und *F. Haurowitz*, Hoppe-Seylers Z. **192**, 45 (1930).

ihnen enthielt das Präzipitat außer Hämoglobin, dessen Gehalt zwischen 6 und 24 Proz., je nach dessen Konzentration im Fällungsversuch, schwankte, und einem dem Serumglobulin entsprechenden Eiweiß noch 2—8 Proz. Lipide. Die Lipide halten die Autoren wegen ihres unregelmäßigen Gehaltes für Belegstoffe, die an und für sich mit dem Präzipitationsvorgang nichts zu tun haben, doch dürfte diese Annahme die früheren Feststellungen von *P. Hartley*¹⁾ nicht genügend berücksichtigt haben, denen zufolge die spezifische Präzipitation ausbleibt trotz Vorhandenseins von Antikörpern, wenn Antigen und Antiserum vor ihrer Vermischung gründlich von den ätherlöslichen Bestandteilen befreit wurden. Die im Verhältnis zum Antigen sehr viel stärkere Beteiligung des Immunsereumeiweißes an dem Präzipitat erhellt aus dem Beispiel von *Welsh* und *Chapman*²⁾. Diese mischten 2,5 mg getrocknetes Hühnereiereiweiß mit 19 ccm homologen Antiserums und erhielten ein Präzipitat von 18 mg Trockengewicht.

4. Beziehung der Präzipitatzmenge zum Antigen-Antikörper-Verhältnis.

Allgemein bildet sich die größte Präzipitatzmenge nicht dort, wo das Verhältnis von Antigen zu Antiserum für die Reaktionsgeschwindigkeit optimal ist. Wird nach *Dean* und *Webb*³⁾ zu einer konstanten Immunsereummenge Antigen in steigenden Mengen zugesetzt, dann nimmt die Präzipitatzmenge zu, bis das für die Reaktionsgeschwindigkeit optimale Mengenverhältnis erreicht ist. Darüber hinaus nimmt mit steigender Antigenmenge die Reaktionsgeschwindigkeit ab, aber die Präzipitatzmenge kann noch weiterhin zunehmen, bis etwa die Antigenmenge das doppelte des obigen Optimums erreicht, dann nimmt bei weiterem Antigenzusatz die Masse wieder ab, und die Reaktionsgeschwindigkeit wird sehr gering.

Zur Erläuterung diene die Wiedergabe des folgenden Versuchs einer Pferde-serumeiweiß-Präzipitation der Arbeit von *Dean* und *Webb*, bei der das optimale Mengenverhältnis von Antigen zu Antiserum 1:50 war.

Zu 2 ccm Antiserum Zusatz von Pferde-serum in ccm	Antigen zu Antiserum wie:	Aussehen der übersteh. Flüssigkeit nach 48 Stunden	Trockengewicht des Präzipitates in mg
0,24	1: 8,3	deutl. Opaleszenz	28,6
0,16	1:12,5	trüb	26,5
0,08	1:25	schwache Opaleszenz	36,8
0,04	1:50	praktisch wasserklar	27,6
0,03	1:66	praktisch wasserklar	23,3
0,02	1:100	praktisch wasserklar	18,1
0,01	1:200	praktisch wasserklar	11,1
0,005	1:400	praktisch wasserklar	6,8

Worauf beruht nun diese Massenzunahme des Präzipitates mit steigender Antigenmenge? *Heidelberger* und *Kendall* haben, wie oben an-

¹⁾ *P. Hartley*, Brit. Journ. exper. Path. 6, 180 (1925).

²⁾ *Welsh* und *Chapman*, Journ. of Hyg. 6, 251 (1906); Brit med. Journ. 11, 510 (1910); Proc. roy. Soc. Lond. (B) 80, 161 (1908).

³⁾ *Dean* und *Webb*, loc. cit.

gegeben, bei der spezifischen Präzipitation des Pneumokokkus III-Polysaccharids die Präzipitationsmassenzunahme mit der Formel $AS + S = AS_2$ erklärt. Folgerichtig müßte daher die Vergrößerung durch Zunahme der Antigenmasse erfolgen, was aber mit der schon mehrfach erwähnten Auffassung der Bildung von Adsorptionshüllen von Immunglobulin um die Antigenmizelle nicht im Einklang steht. In dem obigen Versuchsbeispiel von *Dean* und *Webb* erfolgte die Massenzunahme bei gleicher Antikörpermenge durch Verringerung der Antigenmenge, woraus zu folgern wäre, daß die bereits gebildeten A. A.-Komplexe noch weiterhin zunächst spezifisches Immunglobulin anzulagern imstande sind, dann aber nach Absättigung der spezifischen Affinitäten noch unspezifisch Serumeiweiße adsorbieren können, was durchaus im Einklang mit experimentellen Ergebnissen von *Eagle* ist. Auch das Massenoptimum ließe sich erklären, weil ja mit abnehmendem Antigen-Antiserum-Verhältnis auch die spezifische Präzipitatbildung als solche nachläßt. Dafür würden auch frühere Beobachtungen von *Dean* u. a.¹⁾ sprechen, daß Zusatz von normalem Meerschweinchen- oder Kaninchen- oder Rinderserum die Präzipitmasse vergrößern kann, diese Massenzunahme aber ausbleibt oder wenigstens wesentlich verringert wird, wenn das betreffende Normalserum vorher auf 56° erhitzt wurde. Auch die Fähigkeit des A. A.-Komplexes, Komplement zu adsorbieren (siehe S. 118) gehört hierher. Andererseits wäre aber zu beachten, daß für das Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit auch das Milieu bezüglich der Konzentration und der Art der Elektrolyte eine Rolle spielt, und es wäre zu untersuchen, ob bei geeigneten Milieubedingungen nicht das Reaktionsgeschwindigkeits- und das Präzipitatenmassenoptimum bei dem gleichen Antigen-Antiserum-Verhältnis zusammenfallen könnten. Eine unspezifische Adsorption von Normalserumeiweiß durch den A. A.-Komplex wird von *J. Marrack* und *Frank Campbell Smith*²⁾ abgelehnt.

Diese Autoren benutzten zu ihren Versuchen als Antigene entweder Kuppelungsprodukte aus diazotiertem Atoxyl mit Pferdeserumglobulin und Eieralbumin oder Jodeiweiße, wobei sie in den spezifischen Präzipitaten, die sie mit den entsprechenden Antiseren erhielten, den Azofarbstoff spektrometrisch und das Jod chemisch nachwies. Sie fanden, daß das Verhältnis von Antigen zu Gesamteiweiß im Präzipitat anstieg, wenn die zu konstanter Serummenge gegebene Antigenmenge zunahm, und schlossen, daß die vermehrte A.A.-Bindung nicht auf unspezifische Adsorption bezogen werden kann. Je mehr also die Antigenmenge stieg, je weniger stieg im gleichen Maß die Gesamteiweißmenge. Nehmen wir das Antigen als Mizellen an, die oberflächlich Antikörperglobulin anlegen, dann kann man sich vorstellen, daß eine Agglomeration der A.A.-Komplexe nicht erst eintritt, wenn die Gesamtoberfläche der Mizellen von Antikörperiweiß bedeckt ist, sondern bereits, wenn die Umhüllung erst eine teil-

¹⁾ *Dean*, Journ. of Hyg. **12**, 259 (1912).

²⁾ *J. Marrack* und *Frank Campbell Smith*, Brit. Journ. exper. Path. **12**, 182 (1931).

weise ist, so daß dann mit zunehmender Agglomeration auch die noch anlagerungsfähige Oberfläche der Mizellen verkleinert wird, was zur Folge hat, daß der Quotient $\frac{\text{Antigenmizellenzahl}}{\text{adsorbierte Eiweißmenge}}$ kleiner wird, auch wenn die Gesamtmasse des Präzipitates zunimmt. In diesem Zusammenhang seien Versuche von *F. S. Jones*¹⁾ erwähnt. *Jones* hatte an Kollodiumteilchen 5 verschiedene Eiweißantigene adsorbiert und fand, daß diese Teilchen mit den entsprechenden 5 homologen Antiseren agglutinierten. Das wäre nicht vorstellbar, wenn die Umhüllung eine vollständige wäre, denn dann hätte nur der Antikörper agglutinieren können, dessen Antigen die Außenhülle des Kollodiumteilchens bildete. So nimmt *Jones* eine Adsorption in „patches“, d. h. in umschriebenen Flecken an und hält es für eine folgende Agglutination für ausreichend, wenn der an das Antigen gebundene Antikörper mindestens $\frac{1}{5}$ der Mizellenoberfläche einnimmt.

Nach *Marrack* und *Campbell-Smith* geben stärkere Sera einen stärkeren Niederschlag und einen höheren Antigen-Gesamtprotein-Quotienten im Präzipitat als schwächere (weil, um im obigen Bild zu bleiben, stärkere Sera mehr von der Mizellenoberfläche umhüllen). Zugabe von Normal-Kaninchenserum vermehrt die Präzipitatomasse, da aber der Antigen-Gesamteiweißquotient dadurch nicht verändert werden soll, lehnen die Autoren eine unspezifische Adsorption ab. Dann ist aber die Ursache der Präzipitatzunahme durch normales Serum schwer einzusehen. Man müßte dann zu der gezwungen erscheinenden Annahme greifen, daß sich nach Art von Normalagglutininen auch Normalpräzipitine an der Reaktion beteiligen, also auch Antigen (unspezifisch) umhüllen und die spezifischen A. A.-Komplexe mit den unspezifischen Antigen-Globulin-Komplexen agglomerieren. Dann würde in der Tat möglich bleiben, daß der Antigen-Gesamteiweißquotient unverändert bleibt. Es erscheint wünschenswert, an anderen Antigen-Antikörpersystemen diese Versuche zu wiederholen.

5. Antigen und Antikörper in der überstehenden Flüssigkeit.

Die Frage, ob nach stattgefundener A. A.-Präzipitation Antigen oder Antikörper oder beide oder keines von beiden in der überstehenden Lösung vorhanden sind, und die je nach der benutzten Technik von verschiedenen Autoren (*Eisenberg* 1902, v. *Dungern* 1903, *Welsh* und *Chapman* 1906, 1910, *Weil* 1913, *Bayne-Jones* 1917, *Opie* 1923) in zum Teil gegensätzlichem Sinne beantwortet war, ist durch die Arbeiten von *Dean* und *Webb* (1926, 1928) geklärt worden. Danach hängt die Möglichkeit, eine der beiden Reaktionskomponenten nach der Präzipitation in der Flüssigkeit frei nachweisen zu können, davon ab, ob der Versuch in optimalen Proportionen angesetzt war oder nicht. Lagen solche vor, so verschwanden mit der Präzipitation beide Komponenten aus der Lösung. War Antigen im Überschuß vorhanden, so blieb das Gemisch trübe und der Antigennachweis war schwierig.

¹⁾ *F. S. Jones*, Journ. exper. Med. 48, 183 (1928).

Antigen war aber verschwunden, wenn Antiserum im Überschuß war und vom Antiserum war soviel verbraucht, als der Proportion nach mit dem vorhandenen Antigen reagieren konnte. Nach den oben angeführten Versuchen von *Heidelberger* und *Kendall* sind die Reaktionskomponenten dann in Lösung, wenn das Reaktionsgleichgewicht eingetreten ist und das Reaktionsprodukt eine gewisse Löslichkeit besitzt, jedoch müßte im Rahmen dieser Annahme in erster Linie Antigen in der überstehenden Flüssigkeit vorhanden sein. Die Versuche von *Heidelberger* und *Kendall* haben den Vorzug relativ einfach gebauter Komponenten, während Serum kein einheitliches Antigen darstellt.

6. Komplexität der Antigene.

a) Gleichzeitiges Vorkommen von Antigen und Antikörper in vivo.

Zumindest besteht Serum aus Globulinen und Albuminen, deren unterschiedliches antigenes Verhalten *Dale* und *Hartley* sowie *Doer* und *Berger* im Anaphylaxieversuch erwiesen zu haben annehmen, und auf deren Unterschiedlichkeit man u. a. auch das schubweise auftretende und klinisch verschiedenartige Exanthem bei der Serumkrankheit zurückführen will.

Ob wirklich Globuline und Albumine der gleichen Tierart verschiedene Antikörper bilden oder einen gleichen Antikörper, der aber mit mehr im physikalischen Sinne verschiedenen Globulinen verbunden, sich serologisch verschieden äußern kann, bleibt eine noch offene Frage. Jedenfalls ist die Rolle der besonders mit den Globulinen verbundenen Lipotide bei dieser Fragestellung noch nicht genügend berücksichtigt und Wiederholung dieser Versuche müßte mit besonders gereinigten Eiweißpräparaten unternommen werden.

Die Komplexität des Serumantigens ist vielfach zur Erklärung für die Schwierigkeit herangezogen worden, die man bei genau quantitativen Präzipitationsversuchen findet. Dagegen betonen *Dean* und *Webb* die sehr genaue Übereinstimmung optimaler Proportionen bei einem Kaninchen-Antipferdeserum mit Pferdeserumantigen verschiedener Pferde, ebenso bei Antiserum, hergestellt mit normalem Pferdeserum oder mit Pferdeserum, welches Diphtherie-Antitoxin enthält, das also durch die Immunisierung nicht nur besondere Immunglobuline enthält, sondern bei dem durch die Immunisierung bekanntlich der Albumin-Globulinquotient im Vergleich zum Normalserum verändert ist. Das Antitoxin hat die antigenen Eigenschaft des Pferdeserums bezüglich Bildung präzipitierender Antikörper in keiner Weise geändert (über die Beteiligung verschiedener Antikörper bei der Präzipitation siehe weiter unten). Es ist also wahrscheinlich gar nicht die angenommene Komplexität der Antigene schuld an der Verschiedenheit der Ergebnisse bei der Untersuchung der überstehenden Flüssigkeit nach Präzipitationsvorgängen, sondern nach *Dean* der Umstand, daß die Technik der Herstellung prä-

zipitierender Antisera es mit sich bringt, daß sich stets noch eine unbekannt Menge Antigen im Serum von der letzten Antigen-Einspritzung herrührend befindet. Dafür spricht, daß präzipitierende Sera oft ganz kurz nach der Entnahme vom Kaninchen Präzipitatbildung zeigen und ferner, daß beim Vermischen an und für sich klarer gleicher Antieweißsera verschiedener Kaninchen Ausfällungen auftreten können.

Nach *T. Oguchi*¹⁾ sollen zwar Antigen und Antikörper in vivo niemals gleichzeitig vorhanden sein. Injiziert man nämlich einem Kaninchen Pferdeserum intravenös, so sollen sich nacheinander wenigstens 7 Präzipitinogene abspalten, die der Autor x, a, b, c, d, e, f nennt. Durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat läßt sich feststellen, daß x, a und b zur Globulinfraktion, d, e und f zur Albuminfraktion gehören, c jedoch zu beiden Fraktionen. Die im Globulin befindlichen Präzipitinogene werden zuerst abgespalten. Wenn ein Präzipitinogen verschwunden ist, erscheint ein entsprechendes Präzipitin im Serum, so daß beide zusammen, d. h. Antigen und der zugehörige Antikörper, in vivo niemals gleichzeitig vorhanden sein können. Nimmt man aber an, daß doch in vivo gleichzeitig Antigen und Antikörper vorkommen können, dann bleibt die Frage zu beantworten, warum in vivo keine Reaktion eintritt. Diese Frage steht im engen Zusammenhang mit den Fragen nach dem Verbleib eingespritzten Antigens und der Bildung von Antikörpern, die im Rahmen dieses Buches nicht behandelt werden können.

Immerhin fand *Opie* [1923²⁾] bei Benutzung gereinigter Antigene, wie z. B. krist. Eiereiweiß niemals Antigen und Antikörper gleichzeitig im Serum und kam daher zu der Annahme, daß gleichzeitige Anwesenheit beider auf komplexen Antigenen mit entsprechender Vielheit von Antikörpern beruhen müsse.

Warum nun keine Reaktion in vivo zwischen dem gleichzeitig vorhandenen Antigen und Antikörper eintritt, wissen wir nicht. Vielleicht kommt es doch zu Präzipitatbildungen, die sofort der Phagozytose anheim fallen. Vielleicht tritt Präzipitatbildung erst bei optimalen Proportionen ein und ist dann die Ursache der Serumkrankheit. Vielleicht kann im Plasma eine Präzipitatbildung nicht stattfinden, sondern erst im Serum, das durch den Gerinnungsvorgang erst die dafür nötige Eignung der Globuline erhält. Entsprechend nahmen *Zinsser* und *Young*³⁾ ein indifferentes Schutzkolloid im Plasma an, das jedoch ganz hypothetisch ist, aber wofür die Beobachtung spricht, daß frisch entnommenes zunächst klares präzipitierendes Serum von Kaninchen nach einigen Stunden Präzipitation zeigen kann. Um mit *Dean* zu sprechen, wissen wir noch nicht genug über die im lebenden Blut und im lebenden Gewebe herrschenden Bedingungen, um sagen zu können, ob oder ob nicht ein Präzipitationsvorgang in vivo stattfinden kann. Andererseits haben *Doerr* und *Russ*⁴⁾ experimentell gezeigt, daß ein Antiserum in dem Maße gegen die Injektion eines Eiweißes ein Meerschweinchen passiv zu sensibilisieren vermag, als es Präzipitine

¹⁾ *T. Oguchi*, Jap. med. world 5, 53 (1925).

²⁾ *Opie*, Journ. of Immun. 8, 55 (1923).

³⁾ *Zinsser* und *Young*, Journ. exper. Med. 17, 396 (1913).

⁴⁾ *Doerr* und *Russ*, Ztschr. Immunitätsforsch. 3, 181 (1909).

gegen dieses Eiweiß enthält, so daß aus diesen, wie auch aus anderen Versuchen von *Weil*¹⁾ u. a. geschlossen werden kann, daß das passiv sensibilisierende Agens im Immuns Serum mit dem Präzipitin identisch ist.

b) Gleichzeitige Einverleibung verschiedener Antigene.

Die gleichzeitige Einverleibung verschiedener Antigene vermag bei Kaninchen nach *Hektoen* und *Boor*²⁾ auch die gleichzeitige Bildung aller entsprechenden Präzipitine auszulösen. Eine Antigenmischung bestand aus 14 verschiedenen Antigenen, und wenigstens eins der damit behandelten Kaninchen hatte Präzipitine gegen alle (mit Ausnahme gegen Menschenserumalbumin) gebildet. Eine andere Mischung hatten 35 verschiedene Antigene, und wenigstens eins der Kaninchen hatte Präzipitine gegen alle mit Ausnahme von Hoganprotein [ein aus Urin gewonnenes besonderes Eiweiß, *Hektoen*, *Kretschmer* und *Walker*³⁾]. Es schien aus den Versuchen hervorzugehen, daß die Antigenmischung, obwohl gewichtsmäßig weniger eingespritzt wurde als es sonst bei der Präzipitengewinnung üblich ist, eine größere Menge von Präzipitinen gebildet hat, als man hätte erwarten können. Ist eine bestimmte Antigen„masse“, ob in Form von einheitlichem oder gemischtem Antigen nötig, um Antikörperbildung anzuregen, und ist es vielleicht dem primären Masseneffekt zuzuschreiben, daß bei multipler simultaner Immunisierung relativ geringe Mengen eines einzelnen Antigens so reichlich Antikörper bilden? oder ist das nur einer sich rasch entwickelnden Allergie zuzuschreiben? [*Hektoen*⁴⁾]. Die Titer der Antisera in *Hektoen*'s Versuchen gaben keinen Anhalt dafür, daß zwischen den Mengen eines einzelnen Antigens in der Mischung und der Menge des homologen Präzipitins ein konstantes Verhältnis vorkommt. Immerhin war in den Antigenmischungen die antigene Wirkung der einzelnen Antigene verschieden; vielleicht wegen ihres verschiedenen Alters, vielleicht spielt eine Art Konkurrenz der Antigene eine Rolle.

7. Die für die Präzipitation erforderlichen Mindestmengen an Antigen und Antikörper.

Hektoen und *Cole*⁵⁾ versuchten die kleinste Menge Antigen festzustellen, mit dem sich Präzipitine erzeugen und nachweisen lassen. *Wells*⁶⁾ hatte gefunden, daß zur Sensibilisierung eines Meerschweinchens 0,00000005 g von krist. Ovalbumin genügten und 0,000001 g nötig war, um einen Sensibilisierungsgrad herbeizuführen, der zum tödlichen anaphylaktischen Schock genügte. *Branham* und

¹⁾ *Weil*, Journ. of Immun. 1, 19, 35, 47 (1916).

²⁾ *Hektoen* und *Boor*, Journ. inf. Dis. 48, 488 (1931).

³⁾ *Hektoen*, *Kretschmer* und *Walker*, Journ. amer. med. Assoc. 83, 1154 (1924).

⁴⁾ *Hektoen*, Journ. inf. Dis. 21, 279 (1917).

⁵⁾ *Hektoen* und *Cole*, Journ. inf. Dis. 50, 171 (1932).

⁶⁾ *Wells*, Journ. inf. Dis. 9, 147 (1911).

*Humphreys*¹⁾ zeigten, daß Kaninchen durch eine Injektion von löslichem Antigen aus Enteritisbazillen immunisiert werden konnten, die Dosen von etwa 0,000003—0,000004 g Protein entsprechen. Im Gegensatz zu dem Versuch von *Wells* war hier ein gemischtes Antigen benutzt worden. *Hektoen* und *Cole* immunisierten zwei Kaninchen mit hoch gereinigtem krist. Ovalbumin, und zwar erhielt Kaninchen A 0,000047 und Kaninchen B 0,00027 g von Proteinstickstoff, die etwa 0,00029 resp. 0,0017 g Eiweiß entsprechen. Das Präzipitationsergebnis war, daß Serum A nur bei einer Antigenverdünnung von 1:10000 und Serum B bei 1/10000—1/100000 Flockung gab. Da die Verfasser in früheren Versuchen mit Ovoglobulin Antisera erhalten hatten, die erst bei 1/100000—1/1000000 mit Ovalbumin präzipitierten, so schließen sie, daß das Ovoglobulin mit Spuren von Ovalbumin verunreinigt war. Also kann die Gegenwart von nur wenigen Promille Protein als Verunreinigung in angeblich reinen Eiweißpräparaten, unmöglich auf physikalischem oder chemischem Wege nachzuweisen, genügen, um Antisera zu liefern, die mit verschiedenen Antigenen reagieren, was unbedingt zur Vorsicht in der serologischen Bewertung von Überkreuzreaktionen mit verschiedenen Antigenen und Antisera mahnt.

8. Die Beteiligung verschiedener Antikörper bei der Präzipitation.

Kraus und *Eisenberg*²⁾ hatten bereits 1902 versucht, „Anti-Antikörper“ zu dem Immunkörper dadurch zu erzeugen, daß sie Kaninchen mit normalem Pferdeserum immunisierten. Wurde dann mit antitoxinhaltigem Serum als Antigen eine Präzipitation vorgenommen, so könnte diese stattfinden ohne Abnehmen des Antitoxingehaltes des Serums. Später konnten jedoch *Dehne* und *Hamburger* [1904³⁾] zeigen, daß dies nur auf Nichtberücksichtigung optimaler Verhältnisse beruht. Bei starker Verdünnung des antitoxinhaltigen Antigens fanden sie, daß das Präzipitat Antitoxin enthielt, das dann bei Zusatz von normalem Pferdeserum wieder gelöst werden konnte. Immerhin war eine große Menge von Antipferdeserum nötig, um eine erkennbare Menge von Antitoxin auszufällen, was leicht begreiflich ist, wenn man bedenkt, daß nur ein sehr geringer Teil des antigenen Globulins antitoxinhaltig ist. Zwar liegen darüber noch keine genaueren Angaben vor, aber *Gay* und *Chickering*⁴⁾ hatten 1915 zeigen können, daß die Antikörper im Pferdeantipneumokokkenserum vollständig durch spezifische Präzipitation mit Pneumokokkenextrakt entfernt werden können, und diese mit Antikörper beladenen Präzipitate enthielten nur einen Teil, vielleicht $\frac{1}{60}$ des Originalserumproteins. Aus diesem Grunde war dieses Verfahren, Antikörper zu konzentrieren, in diesem Falle praktisch verwertbar, wie *Chickering*⁵⁾ (1915) und später *Huntoon*⁶⁾ zeigten, die durch Eluierung dieser Präzipitate hochgereinigte Antikörperlösungen bekamen.

¹⁾ *Branham* und *Humphreys*, Journ. inf. Dis. **40**, 516 (1927).

²⁾ *Kraus* und *Eisenberg*, Zbl. Bakt. **31**, 208 (1902).

³⁾ *Dehne* und *Hamburger*, Wien. klin. Wschr. **1904**, 807.

⁴⁾ *Gay* und *Chickering*, Journ. exper. Med. **21**, 389 (1915).

⁵⁾ *Chickering*, Journ. exper. Med. **21**, 248 (1915).

⁶⁾ *Huntoon*, Journ. of Immun. **6**, 117 (1921).

Alten Versuchen von *Camus* und *Gley*¹⁾ sowie von *Bordet*²⁾ zufolge soll bei Mischung eines hämolysierenden Serums als Antigen mit einem durch Immunisierung mit diesem hämolysierenden Serum von Kaninchen gewonnenen Antiserum die hämolysierende Wirkung verloren gehen. Wenn man hier annimmt, daß ein mehr oder weniger großer Teil des hämolysintragenden Globulins als Antigenmizelle eine Adsorptionshülle von Antieiweißimmunglobulinen erhielt, ist die Ausschaltung des Hämolysins verständlich.

Auch die von *Pfeiffer* und *Friedberger*²⁾ und *Bordet*³⁾ beobachtete „Heilung“ bereits sensibilisierter Blutzellen durch angebliche „Antily sine“ ist ohne Annahme solcher hypothetischer Gebilde in gleichem Sinne erklärbar. Das Hämolysin hat zunächst die Blutzelle sensibilisiert, was durch eine Adsorptionshülle des Immunglobulins bedingt wird. Wenn nun daraufhin das Immunglobulin des Serums A durch einen Anti-Eiweißimmungkörper sekundär adsorptiv umhüllt wird, dann ist dadurch das Hämolysin ausgeschaltet (und vielleicht auch die Einwirkung auf die Blutzellenmembran restituiert). vgl. S. 117. Durch diese Doppelbindung kommt also eine Art Maskierung zustande und eine Adsorption von Lysinen an Präzipitate braucht nicht angenommen zu werden und wurde auch von *Zebrowski*⁴⁾ sowie von *Gay* und *Stone*⁵⁾ abgelehnt.

Werden agglutinierende Anti-Typhussera von Pferden mit Antipferdeeiweißseren von Kaninchen gemischt, so braucht durch diese Präzipitation die agglutinierende Fähigkeit nicht aufgehoben zu sein. Es kann natürlich das Agglutinin tragende Immunglobulin des Pferdeserums als Antigen für das präzipitierende Kaninchenserum dienen. Da aber nach allem, was wir bisher wissen, das Immunglobulin nur einen relativ kleinen Teil des Serumeiweißes ausmacht, so wird die Beteiligung der Agglutinine an der Präzipitation im obigen Beispiel mit bedingt sein von der relativen Menge des Immunglobulins im Antityphusserum, mithin von dessen Titer, und dies dürften die z. T. entgegengesetzten Erfahrungen von *Pick*, *Kraus*, *Landsteiner* u. a. erklären. Letzthin hatten *Gay* und *Stone*⁶⁾ bei solchen Versuchen keine Abnahme des Agglutinititers beobachtet.

9. Physikalische Einflüsse auf die Präzipitation.

Da im Grunde der Mechanismus der Präzipitation der gleiche ist, wie der der Agglutination, so haben natürlich die gleichen physikalischen Faktoren, die bei der Agglutination eine Rolle spielen, auch auf die Präzipitation einen Einfluß.

¹⁾ Ann. Inst. Past. 13, 273, 779 (1899).

²⁾ *Pfeiffer* und *Friedberger*, Berl. klin. Wschr. 1902, 4.

³⁾ *Bordet*, Ann. Inst. Past. 18, 593 (1904).

⁴⁾ *Zebrowski*, Zbl. Bakt. 45, 49 (1908).

⁵⁾ *Gay* und *Stone*, Journ. of Immun. 1, 83 (1916).

⁶⁾ *Gay* und *Stone*, Journ. of Immun. 1, 83 (1916).

a) Die H⁺-Ionen-Konzentration.

Mason¹⁾ fand einen p_H-Bereich von 4,5 bis 9,5, innerhalb dessen Präzipitation erfolgte. Darüber nach beiden Seiten hinaus wird das Präzipitat wieder gelöst.

b) Die Temperatur.

Die Reaktionsgeschwindigkeit, die bei 0—5° sehr gering ist, nimmt mit steigender Temperatur zu, so daß die Präzipitation am schnellsten bei 55° verläuft. Darüber hinaus wird das Serumglobulin im Sinne der Hitzedenaturierung verändert. Erhitzt man das Immenserum auf 72° für eine halbe Stunde, so ist die präzipitierende Fähigkeit vollständig aufgehoben, so daß auch keine Komplementbindung mehr eintritt. Aber trotzdem hat nach R. Weil²⁾ merkwürdigerweise das so erhitzte Serum noch die Fähigkeit, normale Tiere passiv sensibilisieren zu können. Ob allerdings der daraus von Weil gezogene Schluß, daß der Anaphylaxiereaktion kein Präzipitationsvorgang zugrunde liegt, berechtigt ist, bleibt, solange wir über den Vorgang in vivo nicht mehr wissen, fraglich.

Wird das Serum als Antigen erhitzt, so gibt es nach Jones³⁾ mit spezifischem Antiserum eine viel massigere Präzipitation als unerhitztes Serum, weil anzunehmen ist, daß die denaturierten Eiweißmizellen des Antigens bessere Adsorptionskerne für das Immunglobulin geben als die nicht denaturierten. Jones nimmt zwar an, daß die massigere Fällung darauf beruht, daß im erhitzten Serum die koagulierten Eiweißteilchen von einer Schicht unkoagulierten Antigens umgeben sind, das von dem Präzipitin ausgeflockt wird und die koagulierten Eiweißteilchen mit sich reißt. Es ist aber schwer einzusehen, warum bei Hitzeeinwirkung nur ein Teil des Antigens koagulieren soll und nicht alles.

Vielfach erfährt das Antigen durch langes und starkes Erhitzen eine Änderung seiner Spezifität, so daß mit nativem Antigen hergestellte Immunsera das erhitzte Antigen nicht mehr präzipitieren, wohl aber vermag ein mit erhitztem Antigen gewonnenes Immenserum sowohl erhitztes als auch nicht erhitztes Antigen zu präzipitieren.

c) Verdünnung.

Wird als Verdünnungsmittel die übliche NaCl-Lösung (0,85 Proz.) benutzt, dann steigt mit zunehmender Verdünnung die Zeit bis zum Eintritt einer erkennbaren Trübung. Dieser Verdünnungseinfluß ist aber nach Versuchen von Dean und Webb⁴⁾ von der NaCl-Konzentration im Milieu abhängig. Das zur Flockung optimale Antigen-Antiserum-Verhältnis ändert sich zwar nicht zwischen 0,02 bis 1 Proz. NaCl, aber die Reaktionsgeschwindigkeit nahm mit fallender NaCl-Konzentration zu, so daß 0,2 Proz. NaCl für das Zustandekommen der Präzipitation eine besonders günstige Konzentration ist. Mit steigender NaCl-Konzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab, und gleichzeitig ändert sich bei über 1,0 Proz. NaCl im Milieu auch das optimale A. A.-Verhältnis.

Wird die Verdünnung von Antigen und Antikörper anstatt mit NaCl-Lösung mit einem normalen Serum vorgenommen, dann ändert sich nach Opie⁵⁾ der Charakter der Präzipitationsreaktion nicht.

¹⁾ Mason, Bull. Hopkins Hosp. 33, 116 (1922).

²⁾ R. Weil, Sci. Proc. Soc. Serology a. Hematology New York, 3. Dez. 1915.

³⁾ Jones, Journ. exper. Med. 46, 303 (1297).

⁴⁾ Dean und Webb, A system of bacteriology medical Research Council VI (London 1931), 431.

⁵⁾ Opie, Journ. of Immun. 8, 19 (1923).

d) Einfluß von Elektrolyten.

Bei der engen Zusammengehörigkeit der Präzipitation mit der Agglutination ist zu erwarten, daß die von *Bordet* erwiesene und später von vielen anderen bestätigte Bedeutung der Elektrolyte für die Agglutination in gleichem Umfange für die Präzipitation gültig ist. Dies wurde von *Rochaix*, *Le Bourdelles* und *Chevallier*¹⁾ auch bestätigt, die bei Versuchen mit Pferdeeiweiß-Antiserum folgendes fanden:

Wurde sofort bei Eintritt der Präzipitation stark zentrifugiert und das Präzipitat in Aqua dest. resuspendiert, so blieb die Suspension stabil. Wurde das Präzipitat in physiol. NaCl-Lösung aufgeschüttelt, so kam es zu erneuter Präzipitation, und erst bei nochmaligem Ausschleudern und energischem Resuspendieren in NaCl-Lösung blieb die Suspension stabil. Wurden Antigen und Antikörper mit NaCl-Lösung steigender Konzentration von 1—5—10—15—20—100 und 200:1000 verdünnt, und bei jeder dieser Verdünnung zu gleichen Antiserummengen fallende Antigenmengen zugesetzt, so trat bei NaCl 1/1000 Präzipitation in der ganzen Reihe auf, sonst aber nahm die Flockung regelmäßig in dem Maße ab, in dem die NaCl-Konzentration zunahm (vgl. die oben erwähnten Versuche von *Dean* und *Webb* über den Einfluß der NaCl-Konzentration auf das optimale Verhältnis der Reaktionskomponenten). Maßgebend für den Elektrolyteinfluß ist das Kation; denn wurde das NaCl durch CaCl₂ vertauscht, dann flockte unter sonst gleichen Bedingungen bei 1:1000 die ganze Reihe, aber die Flockung fiel sehr schnell ab und fand bei 20:1000 bereits nicht mehr statt. Das gleiche fanden die obigen Autoren bei BaCl₂, so daß sie sich berechtigt fühlten, die von *Fleischmann* und *Michaelis* (1907) aufgestellten Gesetze dahin zu vervollständigen: „Für konstante Proportionen der zwei reagierenden Körper und für ein konstantes Flüssigkeitsvolumen ist die Menge des erhaltenen Präzipitates eine Funktion der Elektrolytkonzentration und für eine gegebene Konzentration der Valenz der Kationen.“

10. Beziehung zwischen Präzipitation und Komplementbindung.

Seitdem man erkannt hatte, daß es bei der Wassermann'schen Reaktion zu einer Flockenbildung kommt, hat man die Komplementbindung mit bestimmten Phasen des Präzipitationsvorganges in Verbindung gebracht (*Meier* 1909, *Sachs* und *Altmann* 1909, *Dean* 1912, *Sachs* 1913, *Zinsser* 1923, *Wells* 1925 u. a.). Sehr eingehend wurde diese Beziehung von *Goldsworthy*²⁾, einem Schüler von *Dean*, untersucht. Ohne hier auf die Ursache der Adsorption von Komplement an spezifisches Präzipitat und auf das Wesen des Komplementes einzugehen, sei einer der Versuche von *Goldsworthy* hier wiedergegeben, der in gleicher Weise und mit dem gleichen Ergebnis bereits 1912 von *Dean* ausgeführt war.

Das Antiserum (Antipferdeeiweißserum von Kaninchen) hatte für die größte Reaktionsgeschwindigkeit das Antigen-Antikörper-Verhältnis 1:4 (Röhrchen 6). Die Hammelblutsuspension war 5 Proz., das Hämolyisin 1:400 verdünnt, und damit war die Mindestdosis von Komplement zur Hämolyse 1:80.

¹⁾ *Rochaix*, *Le Bourdelles* und *Chevallier*, Compt. rend. Soc. Biol. **102**, 447 (1929).

²⁾ *Goldsworthy*, Journ. of Path. **31**, 220 (1928).

Zu einem bestimmten Volumen von Antigenverdünnungen kam das gleiche Volumen des 1:10 verdünnten Antiserums und unmittelbar danach Komplement. Nach 1 Stunde bei 40° wurden die sensibilisierten Blutzellen zugefügt, und die Reihen A, B, C nach 60, 45 resp. 30 Minuten aus der Wärme entfernt, 1 Stunde bei Zimmertemperatur gelassen und weitere 12 Stunden im Eisschrank, bevor die Ablesung erfolgte.

Komplementverdünnung				A 1:10	B 1:5	C 2:5
Zeit der Inkubation bei 40° nach Zusatz der sensibilisierten Blutzellen in Minuten:				60	45	30
Röhrchen Nr.	0,5 ccm Antigen verd. 1 zu	Verhältnis von Antigen zu Antikörper	Verhältnis von Antigen zu der Antigenmenge in Röhrchen Nr. 6			
1	2,5	Antigenkontrolle	16	—	—	—
2	2,5	4:1	16	—	—	—
3	5	2:1	8	—	—	—
4	10	1:1	4	±	—	—
5	20	1:2	2	±	—	—
6	40	1:4	1	±	—	—
7	80	1:8	$\frac{1}{2}$	±	—	—
8	160	1:16	$\frac{1}{4}$	++++	±	—
9	320	1:32	$\frac{1}{8}$	+++++	+++	+
10	640	1:64	$\frac{1}{16}$	+++++	+++	±
11	1280	1:128	$\frac{1}{32}$	+++++	++	—
12	2560	1:256	$\frac{1}{64}$	+++++	+	—
13	5120	1:512	$\frac{1}{128}$	+++	—	—
14	10240	1:1024	$\frac{1}{256}$	—	—	—
15	—	Antiserumkontr.	—	—	—	—

Grade der Komplementbindung ausgedrückt durch Ausbleiben der Hämolyse.
 +++++ keine Hämolyse; — völlige Hämolyse.

Man sieht aus diesem Versuch, daß sich das Gebiet der besten Komplementbindung dort befindet, wo sich der Antikörper im relativen Überschuß befindet. Beim optimalen Antigen-Antikörper-Verhältnis, wie auch dort, wo sich Antigen im relativen Überschuß befindet, hat keine Komplementbindung stattgefunden. Das Optimum der Komplementbindung war im 9. Röhrchen, in dem die Antigenmenge nur $\frac{1}{2}$ von der für die Präzipitation optimalen Menge war. Während des Versuchs bildeten sich schon nach 15 Minuten größere Flocken in den Röhrchen 3 bis 8, wohingegen in den Röhrchen 9 bis 13 die Teilchen kleiner waren und es nur zu einer Opaleszenz kam. Also in den Röhrchen, in denen die Präzipitation schnell verlief, fand praktisch keine Komplementbindung statt.

Man kann als sicher feststehend annehmen, daß der Präzipitationsvorgang in einer Agglomeration der zunächst wegen ihrer Kleinheit nicht

sichtbaren A. A.-Komplexe besteht, und daß je nach dem Grade der Agglomeration alle Stadien von leichtester Opaleszenz — deutlicher Opaleszenz — Trübung — Flockenbildung — Sedimentierung und Klärung der überstehenden Flüssigkeiten vorkommen können. Durch mikroskopische Untersuchung des Vorganges im Dunkelfeld läßt sich diese Annahme bestätigen.

Nimmt man nun zunächst an, daß sofort beim Zusammenbringen von Antigen und Antikörper der eigentliche Bindungsprozeß vollzogen ist, und sich dann an der Gesamtmasse der A. A.-Komplexe, also an der Präzipitationsmasse, nichts mehr ändert, ob diese nun sichtbar oder zunächst unsichtbar ist, dann bedeutet die folgende Agglomeration der Teilchen eine zunehmende Verkleinerung der Gesamtoberfläche der A. A.-Komplexe. Der obige Versuch zeigt, daß im gleichen Maße, in dem der Präzipitationsvorgang fortschreitet, die Menge an gebundenem Komplement abnimmt. Variiert man bei gleichem Antiserum die Zeit zwischen der Antigen-Antikörpermischung und dem Zusatz von Komplement, oder nimmt man unter sonst gleichen Bedingungen verschiedene Antisera, so ist klar, daß der Zeitpunkt, in dem der Präzipitationsvorgang das physikalisch gleiche Stadium erreicht, verschieden ist und somit auch die Zone maximaler Komplementbindung sich verschieben kann.

Da nun die Größe der A. A.-Komplexagglomerate und die Gesamtoberfläche miteinander funktionell verbunden sind, so folgt aus dem Versuch, daß die Komplementbindung ein Adsorptionsvorgang ist, wobei es gleich bleibt, zu sagen, daß für diese Adsorption die Oberflächenentwicklung maßgebend ist oder eine bestimmte Teilchengröße der A. A.-Agglomerate. Die zeitliche Entwicklung des physikalischen Präzipitationsvorganges ist nun proportional dem Antikörpergehalt des Serums und damit im Einklang ist die experimentelle Erfahrung, daß die stärkste Komplementbindung bei schwachen und mittelstarken Antisera dort ist, wo Antigen zu Antikörper im optimalen Verhältnis stehen, daß aber bei starken Antisera die Komplementbindung optimaler ist, wenn sich das Antiserum in relativem Überschuß befindet. Jedenfalls ist die Komplementbindung am besten, wenn eine gewisse Opaleszenz der A. A.-Mischung nicht überschritten wird, und in diesem Sinne ist die Komplementbindung eine Funktion der Partikelgröße des Präzipitates (*Dean*).

V. Das Komplement.

Mit Komplement hat man das labile Agens nativer normaler Sera bezeichnet, welches in der Terminologie *Ehrlich's* von als Ambozeptoren bezeichneten Immunkörpern gebunden wird, wodurch dann erst die spezielle Wirkung des betreffenden Immunkörpers auf das Antigen zustande kommen kann (Lyse).

Wir können heute sagen, daß jeder A. A.-Komplex unter geeigneten Bedingungen aus nativem Serum gewisse Globuline zu adsorbieren imstande ist, und daß diese Adsorption bewirkt, daß einerseits in manchen Fällen von zelligen Antigenen der A. A.-Komplex eine solche Änderung erleidet, daß er im gleichen Milieu belassen, der sogenannten „Lyse“ anheimfällt (Bakteriolyse, Hämolyse), und daß andererseits das native Serum nach dieser Adsorption die gleiche Rolle nicht mehr spielen kann. Behalten wir für diese nativen Seren (wahrscheinlich ihren Globulinen) anhaftende Fähigkeit die Bezeichnung Komplement bei, so steht zunächst fest, daß unter geeigneten Bedingungen jedes mit seinem spezifischen Antikörper verbundene Antigen in der Lage ist, aus einem nativen Serum das Komplement zu adsorbieren.

Das Wesen des Komplementes ist bis heute noch nicht geklärt, wenn auch die vielen Arbeiten, die darauf verwendet wurden, soviel haben erkennen lassen, daß es nur zwei Möglichkeiten zu geben scheint: entweder gibt es überhaupt keine solche Substanz wie Komplement, und die Komplementfähigkeit eines Serums ist nur der Ausdruck eines für die Haftung seiner labilen Globuline an gewisse Grenzflächen besonders geeigneten physikalischen Zustandes des betreffenden Serums, oder dem Komplement liegt ein stoffliches Substrat zugrunde¹⁾, das aber einmal zu seiner Auswirkung auf den A. A.-Komplex ebenfalls besonderer physikalischer Milieueigenschaften bedarf und ferner über die verschiedenen Serumeiweißfraktionen in qualitativer und quantitativer Weise verschiedenartig verteilt ist, wie die sogenannten Fraktionierungen des Komplementes in mehrere Komponenten zeigen.

Eine Entscheidung ist heute noch nicht möglich.

¹⁾ Nach *M. Bergonzini* [Ztschr. Hyg. 114, 11 (1932)] werden, im Dunkelfeld sichtbar, Lipoidteilchen an die sensibilisierten Blutzellen adsorbiert, die dann erst der Lyse anheimfallen. Es wird angenommen, daß sich diese Lipoidteilchen mit Komplement beladen haben und so die Komplementwirkung vermitteln (frühere Versuche von *Dean* zeigten aber Komplement-m-stückwirkung auch noch nach völliger Entfernung der Lipoide aus dem Serum).

1. Allgemeine Eigenschaften des Komplementes.

Benutzt man sensibilisierte Blutzellen als Indikator zum Nachweis der Komplementfähigkeit eines Serums, so läßt sich als die wesentlichste Eigenschaft des Komplementes seine Labilität nachweisen.

Es wird inaktiviert durch Lagern, durch Erwärmung, durch Licht (bes. ultraviolette, nicht Röntgenstrahlung), durch Änderung der Reaktion nach der sauren und alkalischen Seite hin, durch Proteasen, durch Salzverarmung, durch Schlangengift, durch Digerieren mit gewissen Bakteriensuspensionen (Prodigiosus, Hefe), durch Kolloide wie Inulin-Kieselsäure-Lösungen, durch Schütteln usw. Ausführlich berichtet hierüber *Sachs*¹⁾, der das Wesentliche in allen diesen verschiedenartigen Verfahren in einer Veränderung des physikalischen Zustandes gewisser Globuline des nativen Serums sieht.

Vielen dieser Inaktivierungsverfahren ist ihre Abhängigkeit von der Konzentration des komplementfähigen Serums gemeinsam, oder mit anderen Worten, die Inaktivierung ist an eine optimale Zustandsänderung der Globuline oder allgemein der Eiweißstoffe des Serums gebunden, die bei bestimmter Serumkonzentration leichter eintritt.

2. Die Zerlegung des Komplementes in Einzelkomponenten.

Außerordentlich und in zum Teil nicht übersehbarer Weise wird die Frage nach dem Wesen des Komplementes verwickelt durch die scheinbare Möglichkeit, die Komplementfunktion eines Serums in Teilkomponenten zu zerlegen.

Zunächst gelang es *Ferrata* durch Dialyse, *Sachs* und *Altmann* durch verdünnte HCl und *Lietmann* durch Behandeln mit CO₂ aus dem frischen Meer-schweinchenserum gewisse labile Globuline zu fällen. Wurden diese wieder in Lösung gebracht (Globulinanteil), so war diese Lösung nicht imstande, sensibilisierte Blutzellen zu hämolysieren, wohl aber kam es zur Hämolysen, wenn der wieder isotonisch gemachte Rest des Serums (sog. Albuminanteil) zugefügt wurde, so daß man wegen dieser als nötig erwiesenen Reihenfolge den Globulinanteil „Mittelstück“ und den Albuminanteil, der nach *Hofmeister* sowohl Eu- und Pseudoglobulin als auch Albumin enthält, „Endstück“ benannte.

Man hat also die labilsten Globuline zunächst entfernt und findet dann, daß die Restflüssigkeit allein keine Komplementwirkung mehr auf sensibilisierte Blutzellen ausüben kann. Ist das Komplement ein einheitliches stoffliches Substrat, so ist die Frage, wo ist es bei dieser Teilung geblieben.

Das labile Globulin des sog. Mittelstücks hat die allgemeine Fähigkeit, sich an geeigneten Grenzflächen anzulagern, es verstärkt auf diese Weise die A.-A.-Komplexe bei der Präzipitation, bei der Hämagglutination (Konglutination) und diese Adsorption von Mittelstück ist auch das wesentliche bei der der Wa. R. zugrundeliegenden Komplementinaktivierung. Bei sensibilisierten Blutzellen vermag diese Adsorption noch nicht zur Hämolysen zu führen. Die Blutzellen sind jedoch, wie man sagt, persensibilisiert und erst der Zusatz der Restflüssigkeit führt die Hämolysen herbei. Das sieht so aus, als wäre das eigentliche lytische Prinzip in der Restflüssigkeit. Im Einklang damit erhält man in vielen Fällen Komplementwirkung durch Kombination der Mittelstücke ver-

¹⁾ *Sachs*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, *Kolle*, *Kraus*, *Uhlenhuth*, Bd. II (Jona 1929).

schiedener Tiere mit dem Meerschweinchenendstück, aber nicht umgekehrt. Da die Restflüssigkeit aber allein sensibilisierte Blutzellen nicht lösen kann, so muß man annehmen, daß die primäre Adsorption von labilem Globulin die Zelle erst in den Zustand gebracht haben muß, der ihre weitere Lösung befähigt. Bekanntlich kann das native Hammelbluthämolysin die Blutzellen lösen, verliert diese Fähigkeit aber beim Lagern, Erhitzen usw. und erhält sie wieder durch Zusatz von nativem frischem Serum (Komplement). Es ist also anzunehmen, daß in beiden Fällen der Mechanismus der gleiche ist: Erst die Adsorption des Immunglobulins, dann die weitere Adsorption von nicht spezifischem Globulin. Bei der Adsorption von Immunglobulin kommt es zu einer Denaturierung des betreffenden Globulins auf der Oberfläche der Antigenmizelle, wodurch erst die Möglichkeit der Adsorption weiterer Mengen unspezifischen Globulins geschaffen wird. Die Frage ist nun, ob auch diese letzteren Globuline eine Art Denaturierung durch ihre Adsorption erfahren. Dies ist vielleicht der Fall, geschieht aber dann wahrscheinlich in einem geringeren Grade als bei der spezifischen Bindung des Immunglobulins.

Ein Lipoidsolteilchen kann nach *Eagle* zwar normales Globulin binden. Diese Bindung ist aber reversibel, da durch Waschen dieses Globulin entfernbar ist. Auch behält das unspezifisch adsorbierte Globulin seinen hydrophilen Charakter und vermag in dieser Bindung kein Komplement anzulagern. Im Gegensatz dazu wird das Immunglobulin irreversibel gebunden und dabei denaturiert und kann dann Komplement adsorbieren. Jedenfalls sieht es so aus, als bestünde das Wesen der Komplementbindung darin, durch die sekundäre Globulinadsorption die Zelloberfläche so zu verändern, daß die Blutzelle in einem geeigneten Milieu der Lyse anheim fallen kann, und die Rolle der Restflüssigkeit („Endstück“) würde dann darin bestehen, dieses geeignete Milieu zu schaffen. Oder aber man nimmt in der Restflüssigkeit ein besonderes Agens an, über das man aber im Grunde nichts bestimmtes aussagen kann, und das erst wirken kann, wenn gewisse Zelloberflächenveränderungen vorliegen.

Man weiß, daß allgemein gesprochen, die zur Hämolyse nötige Komplementmenge um so geringer ist, je mehr Antikörper gebunden, d. h. je hochgradiger die Blutzelle sensibilisiert ist, und andererseits bestehen ähnliche Beziehungen zwischen den sogenannten Mittel- und Endstücken. Ist daher die Zelloberfläche durch den Antikörper nur wenig zur Lyse vorbereitet, dann bedarf es der weiteren Adsorption von relativ viel Mittelstück, und dann genügt wenig Endstück zur kompletten Lyse. Ist umgekehrt die Sensibilisierung eine hochgradige, dann bedarf es relativ wenig Mittelstück und relativ viel Endstück zur Lyse. Unter Umständen vermag aber die Adsorption von genügenden Mengen Mittelstück allein, d. h. ohne Mitwirkung spezifischer Antikörper in Verbindung mit Endstück die Zellen zur Lyse zu bringen, was man als Wirkung von Normalhämolysinen zu deuten pflegt und im Grunde das gleiche Phänomen darstellen dürfte, wie die sogenannte antikomplementäre Wirkung, wobei also labile Globuline des komplementfähigen Serums adsorbiert werden, somit die Komplementfähigkeit des betreffenden Serums aufgehoben wird. Da eine solche Adsorption von Labilglobulin aus z. B. nativem Meerschweinchenserum an z. B. gewissen Grenzflächen von Lipidsuspensionen sich nicht so auswirkt, wie bei der sichtbaren Hämolyse, oder wie bei der erkennbaren Agglutination, so wird von antikomplementärer Wirkung gesprochen, anstatt von Normalantikörpern. Es wäre wünschenswert, die Natur mancher sogenannter Normalantikörper erneut unter diesem Gesichtspunkt zu studieren.

Außer den als Mittel- und Endstück bezeichneten Komponenten des Komplementes hat man eine „dritte Komponente“ unterschieden. Das durch Kobragift inaktivierte Meerschweinchenkomplement konnte sowohl durch M- wie auch durch E-Stück quantitativ reaktiviert werden (*Ritz*). Aber da diese

Wiederherstellung der Funktion auch durch Meerschweinchen Serum möglich war, das $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt war, und aus dem kein funktionstüchtiges M- oder E-Stück mehr gewonnen werden konnte, so wurde angenommen, daß die Komplementwirkung aus dem Zusammenwirken der thermolabilen M- und E-Stücke und einer thermostabilen dritten Komponente resultiert. Auch verschiedene andere Sera können die Rolle der dritten Komponente bei der Reaktivierung von durch Kobragift inaktiviertem Komplement übernehmen. Besonders Schweineserum hat eine auffallend starke Wirkung in dieser Hinsicht (0,0001 ccm und weniger).

Die Komplementinaktivierung durch Suspensionen gewisser Mikroorganismen [Prodogiosus (*Ritz, Sachs*), Hefe (*Whitehead, Gordon* und *Wormall*)] greift in erster Linie an der dritten Komponente an. *Browning* und *Mackie* haben durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat 4 Komponenten der Komplementfunktion unterschieden. Auch *Whitehead, Gordon* und *Wormall* fanden eine vierte Komponente, die wie die dritte Komponente thermostabil ist, aber mehr Albumincharakter hat. Sie kann durch Ammoniak isoliert zerstört werden, während die Hefe nur die dritte Komponente ausschaltet. Sowohl die dritte wie die vierte Komponente bleiben im Serum nach Ultravioletbestrahlung erhalten, so daß mit solchem Serum die Reaktivierung nach Ammoniak- oder Hefe-Einwirkung möglich ist.

3. Erklärungsversuche.

Wie schon bei Besprechung der thermolabilen und thermostabilen Agglutinogene bemerkt wurde, ist auch hier bei der Erhitzung von Meerschweinchen Serum nicht angängig, die Einwirkung der Hitze auf die verschiedenen Komponenten so zu deuten, daß nur gewisse Teile durch Hitze zerstört werden und andere nicht. Es muß versucht werden, diese mehr bildliche Darstellung zu ersetzen durch eine physikalische, mehr das ganze System in Betracht ziehende Auffassung. Wird Serum erhitzt, so wirkt die Hitze in gleichem Sinne auf alle vorhandenen Eiweißkörper und die nach dem Erhitzen beobachtete Wirkung, z. B. Restitution des durch Cobra-Gift inaktivierten Meerschweinchenkomplementes, kommt der Gesamtwirkung des erhitzten Serums zugute und nicht einem durch die Hitze unbeeinflussten Teil. Oder man sieht von den Eiweißstoffen¹⁾ im Serum ganz ab und lenkt die Aufmerksamkeit mehr auf die Lipide und die Elektrolyte speziell die Ca^{++} -Ionen des Serums und deren gegenseitige Beeinflussung. Auch etwaige Kohlehydrate²⁾ im Serum sollten nicht unbeachtet bleiben. Analog wie man von wirklich hitzebeständigem Agglutinogen sprechen kann, wenn man die Polysaccharide mancher Mikroben damit meint, so könnten auch bei der Komplementfunktion eines Serums hitzebeständige Faktoren mitwirken, wenn man die Lipide des

¹⁾ Auf Grund der reversiblen Inaktivierung der Komplementfunktion durch CO_2 nimmt *R. Bauer* [Ztschr. Immunitätsforsch. **61**, 309 (1929)] an, daß die Komplementeigenschaften des frischen Serums denen eines amphoterer Elektrolyten von der Art der Eiweißkörper entsprechen.

²⁾ *Cl. Rimington*, Biochem. Journ. **25**, 1062 (1931); ref. Chem. Zbl. **1**, 695 (1932). — *H. Bierry*, Compt. rend. Ac. Sc. **192**, 1284 (1931); ref. Chem. Zbl. **2**, 2345 (1931).

Serums berücksichtigt. Die Versuche, die Komplementwirkung als Seifenhämolyse aufzufassen und entsprechende künstliche Komplemente herzustellen (v. Liebermann, Fenyvessy u. a.), haben zwar bisher nicht zum Ziele geführt, doch verdienen sie besonderer Erwähnung, da sie bewußt den Schwerpunkt auf das Nichteiweiß im Serum legen. Die ganze Frage nach der Natur und der Wirkungsweise des Komplementes müßte erneut in Angriff genommen werden unter Berücksichtigung der großen Rolle, die die Lipoide für die physikalischen Eigenschaften gerade der labilen Globuline des Serums spielen und unter Berücksichtigung der großen Bedeutung der Elektrolyte des Serums für den Lösungszustand seiner Lipoide.

Besonders hatte sich *F. Klopstock*¹⁾ dafür eingesetzt, daß die Komplementwirkung an die Unversehrtheit des kolloiden Systems des Serumeiweißes gebunden ist, d. h. also die Komplementwirkung nicht an einen chemisch greifbaren und isolierten Körper geknüpft ist. Gerade die mannigfaltigen Komplementinaktivierungen durch physikalische Einflüsse sind nach *F. Klopstock* nur mit der obigen Vorstellung verständlich. Für die Spaltung in zwei Komponenten kann *F. Klopstock* keine andere Ursache finden als die zentrale Lage der Euglobulinfraktion in den kolloidgelösten Eiweißteilchen. Auf Grund von Farbstoffversuchen²⁾ (es wurden die nach *Liefmann* erhaltenen und in Normosal gelösten Komponenten, d. h. Globulin- und Albuminlösung zu je 0,1 Proz. mit Kongorot und Methylenblau versetzt: die Mischung des roten Albumins mit blauem Globulin gab rotgefärbte und die von blauem Albumin mit rotem Globulin gab blaugefärbte Lösung) sollen die grobdispersen Globulinteilchen von den feindispersen Albuminen schutzkolloidartig umhüllt sein. Damit erübrigt sich nach *F. Klopstock* die Zerlegung in eine M- und E-Stückwirkung. Die Regenerierung kommt nur zustande, wenn durch die Reihenfolge des Zusatzes Globulin-Albumin das ursprüngliche kolloide System des Serumeiweißes wieder hergestellt wird. Als Schädigung der „dritten Komponente“ erscheinen alle jene Komplementinaktivierungen, bei denen nicht die einzelnen Eiweißfraktionen, wohl aber der physikalisch-chemische Zustand des gesamten kolloiden Systems eine Veränderung erfahren. Wenn demnach „die Komplementwirkung an eine kolloide Zustandsform geknüpft“ ist, so besteht die Wirkung des Komplementes im Serum darin, daß das Serum Fermente (z. B. Hämolysine) durch seine unversehrte kolloide Zustandsform zu aktivieren imstande ist (*F. Klopstock*).

Jedenfalls sind wir heute noch weit entfernt, diejenige Lösung der Komplementfrage zu besitzen, die imstande ist, in befriedigender Weise das große und sich scheinbar vielfach widersprechende Beobachtungsmaterial der letzten Jahrzehnte, das *Sachs* in seiner großen Monographie bringt, einheitlich zu erklären. Das abschließende Urteil von *Sachs* möge hier im Wortlaut folgen:

„Wir betrachten also nach dem heutigen Stand am besten die Komplementfunktion als die Frage der besonderen kolloiden Struktur der Serumeiweißstoffe, deren Gesamtheit sich in einzelnen Fraktionen trennen und durch ihr Zusammenwirken wieder restituieren läßt. In diesem Sinne

¹⁾ *F. Klopstock*, Dtsch. med. Wschr. 1924, Nr. 51.

²⁾ Dtsch. med. Wschr. 1924, 1171.

darf man wohl annehmen, daß die Komplementfunktion an die Eiweißstoffe des Serums gebunden ist, ohne daß damit ausgedrückt sein muß, daß die gesamte Komplementwirkung lediglich durch das Eiweiß bedingt wird.“

4. Untersuchungen an Meerschweinchen mit angeborenem Komplementmangel.

Im allgemeinen geht die Tendenz bei der Erklärung der Komplementwirkung dahin, in erster Linie den physikalischen Zustand des Milieus zu berücksichtigen, der als solcher natürlich auch dann von wesentlicher Bedeutung ist, wenn dem Komplement ein fermentartiges Substrat zugrunde liegen sollte. Immerhin, die ganz ausschließlich rein physikalische Auffassung der Komplementwirkung von *F. Klopstock* paßt sich nicht so ganz zwanglos der Vielheit der Erscheinungen an. Man bedenke u. a. die Spezifität der Komplemente (siehe S. 108); und dann scheint für die Möglichkeit der Annahme eines stofflichen Substrates als Komplement besonders die Tatsache zu sprechen, daß es Meerschweinchen gibt, deren Serum das inaktivierte Hammelbluthämolyisin nicht zu komplettieren vermag. Einen solchen Meerschweinchenstamm beobachtete zuerst *Moore*¹⁾ worauf dann später Studien über den gleichen Stamm von *Coca*²⁾ und *Ecker*³⁾ und besonders von *Hyde*⁴⁾ folgten. Aus diesen Untersuchungen geht folgendes hervor:

Dem Serum dieser komplementmangelnden Tiere fehlt etwas, was bis zum gewissen Grade der sogenannten dritten Komplementkomponente entspricht, das heißt die, welche hitzeresistent und durch Hefe adsorbierbar ist. Durch sehr kleine Mengen von frischem Serum von Mensch, Meerschwein, Hammel, Katze und Kaninchen kann das Mangelserum gegen sensibilisierte Blutzellen aktiviert werden, aber nicht durch Serum von Rind, Schwein⁵⁾, Ente, Huhn, Taube, Schaf, Ziege, Maus und Frosch. Besonders besitzt erhitztes menschliches Serum auf das Mangelkomplement eine hochgradige aktivierende Wirkung, die die des erhitzten Meerschweinchenserums übertrifft. Wird aber normales Meerschweinchenserum durch Hefeabsorption seiner dritten Komponente beraubt, dann gelingt die Reaktivierung besser mit erhitztem Meerschweinchenserum als mit erhitztem Menschenserum. Es besteht demnach keine völlige Identität zwischen der aus normalem komplementhaltigem Meerschweinchenserum durch Hefe absorbierten Komponente und der von Natur bei dem Mangelserum fehlenden Komponente, was unter anderem auch daraus hervorgeht, daß beide in verschiedener Weise durch CO₂-Fraktionen (M- und E-Stück)

¹⁾ *Moore*, Journ. of Immun. 4, 425 (1919).

²⁾ *A. F. Coca*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 18, 71 (1920).

³⁾ *E. E. Ecker*, Journ. inf. Dis. 29, 611 (1921).

⁴⁾ *R. R. Hyde*, Journ. of Immun. 8, 267 (1923); Amer. Journ. Hyg. 4, 62, 65, 169 (1924); 5, 145 (1925); Journ. of Immun. 12, 47 (1926); Amer. Journ. Hyg. 7, 619 (1927); 8, 730 (1928).

⁵⁾ Man beachte, daß gerade Schweineserum reich an sogenannter dritter Komponente sein soll.

reaktivierbar sind. Ferner vermögen sensibilisierte Blutzellen bei 37° zwar aus dem Mangelserum gewisse Bestandteile zu adsorbieren, nicht aber die hitze-resistente Komponente aus erhitztem Serum, sondern letztere nur dann, wenn die erstere Adsorption bereits stattgefunden hat. Auch in vivo ist das Serum der komplementmangelnden Tiere durch Injektionen von frischem oder auch erhitztem Serum von Menschen oder normalen Meerschweinchen aktivierbar, wobei die intravenöse Injektion sofort, die subkutane oder intraperitoneale Einspritzung einige Stunden später wirkt. Aber nach 3—4 Tagen weisen die so aktivierten Mangeltiere wieder ihren früheren Zustand auf. Hochsensibilisierte Blutzellen können auch durch große, möglichst sofort und nicht erst nach einiger Zeit zugesetzte Mengen des Mangelkomplements gelöst werden, weil hier die Aktivierung durch das im Überschuß vorhandene Hämolysin bewirkt wird, und zwar anscheinend durch die sogenannte dritte Komponente, denn durch Behandlung mit Hefe, Erhitzen über 56°, längere Lagerung verliert das hämolysierende Serum die Fähigkeit, das Mangelkomplement zu aktivieren, obwohl es seine sensibilisierende Fähigkeit Blutzellen gegenüber behält.

Da aber gelegentlich auch ein sehr starkes Hämolysin von vornherein die aktivierende Fähigkeit für Mangelkomplement nicht hat, so kann die hochgradige Sensibilisierung der Blutzellen an sich die Ursache für die Lösung durch Überschuß von Mangelkomplement nicht sein.

Für die Reaktivierung durch frisches normales Meerschweinchenserum scheint eine gewisse Mindestmenge von letzterem nötig zu sein. Hyde aktivierte ein Mangelkomplement A durch Zusatz von 5 Proz. eines normalen Meerschweinchenserums (B), so daß das Mischserum C genau so stark war, wie B. Geschah die Aktivierung durch eine gewisse Milieuänderung in qualitativem Sinne, dann müßte das Serum C nun imstande sein, ebenfalls A in der gleichen Weise zu aktivieren, wie es B tat, was aber experimentell nicht gelang, anscheinend, weil die nötige Menge an dritter Komponente in quantitativem Sinne fehlte. Gerade dieser Versuch scheint für die substantielle Eigenschaft des Komplementes zu sprechen.

Im übrigen verhalten sich die Mangeltiere wie normale, auch bezüglich ihrer Blutzellenzahl, scheinen aber im ganzen weniger resistent gegen äußere ungünstige Einflüsse zu sein. Der Komplementmangel bleibt zeitlebens und ist durch Nahrungsänderung nicht beeinflussbar. Da nachweislich die dritte Komponente die Plazentaschranke nicht passieren kann, so entsteht sie autochthon und ihr Fehlen ist daher genotypisch bedingt. In der Tat wird der Komplementmangel vererbt und entspricht im Vererbungsmodus einem rezessiven Mendel'schen Faktor.

Wird der Komplementmangel in vivo behoben durch Injektion von z. B. Menschenserum, so ist damit das betreffende Mangeltier noch nicht einem normalen Tiere gleich, ganz abgesehen davon, daß die Aktivierung nur von vorübergehender Dauer ist. Wenn man nämlich subkutan oder intravenös heterogenetisches Antiserum gibt, so vertragen dies die Mangeltiere auch nach Aktivierung der Komplementfunktion, während normale Tiere entweder Hautnekrose zeigen oder sterben. Man könnte auf Grund dieser Feststellung von Hyde auch vermuten, daß die Komplementmangel-Meerschweinchen auch kein Forssman'sches Antigen in ihren Zellen haben, was festzustellen von großem Interesse wäre.

Auch wäre es besonders im Hinblick auf die Identifizierung der Komplementwirkung mit optimalen physikalisch-chemischen Zustandsbedingungen des Serums wertvoll zu wissen, ob auch bei den Mangelmeerschweinchen, die von *J. Traube* postulierte Ausnahmestellung des Komplement liefernden Meerschweinchens zutrifft, derzufolge von allen Säugetierblutseren das Meerschweinchenserum

1. die geringsten agglutinierenden oder aggregierenden Fähigkeiten hat,
2. am besten befähigt ist, Präzipitate aufzulösen (*Izar*),
3. die geringste Alkalität haben soll,
4. die geringste Viskosität aufweist, weil bei ungewöhnlich geringem Eiweißgehalt der Wassergehalt höher ist als der der meisten sonstigen Tierarten,
5. eine geringere Linksdrehung ($0,61^\circ$) gegenüber ($0,78^\circ$) der meisten anderen Tierarten hat (25 mm Rohr) und schließlich
6. die größte Oberflächenspannung besitzt.

Bekanntlich ist ein Meerschweinchen sehr leicht aktiv für den Nachweis der Anaphylaxie zu präparieren und ebenfalls gelingt nach *Doerr* und *Russ* die passive Präparierung um so leichter, je mehr das betreffende Serum präzipitierende Immunkörper gegen das zu reinjizierende Eiweiß hat. Um so befremdender ist die Schwierigkeit, durch aktive Immunisierung mit einem Eiweiß in vitro nachweisbare Präzipitine im Meerschweinchenserum zu erhalten (*Friedberger*). Bekanntlich gelingt es auch nicht beim Meerschweinchen, eine Serumveränderung hervorzurufen, die der analog ist, die beim Kaninchen nach Lipoid-Eiweiß-Immunisierung zur positiven Wa. R. führt. Es ist höchstwahrscheinlich, daß dieses scheinbare refraktäre Verhalten nur darauf zurückzuführen ist, daß die Antikörper (Globuline), die das Meerschweinchen zweifellos bildet, nicht imstande sind, die Denaturierung bei der Bindung an die Antigenmizellen zu erleiden, die zur Einleitung der Präzipitation resp. Komplementbindung nötig ist, und daß dieses refraktäre Verhalten auf das engste mit der Fähigkeit zusammenhängt, Antikörper so gut komplettieren zu können. Ein Studium dieser Verhältnisse am Meerschweinchen wird sicher auch die Frage nach der Natur des Komplementes zu klären helfen.

5. Zusammenhänge zwischen Komplement und Blutgerinnung.

Man hat neuerdings wieder das Komplement aufs engste mit dem Vorgang der Blutgerinnung verknüpft, nachdem schon *v. Behring* das *Buchner'sche* Alexin mit dem *Ehrlich'schen* Komplement und dieses mit dem von *Alexander Schmidt* entdeckten Fibrinferment identifiziert hatte. Besonders werden diese Zusammenhänge in den Arbeiten von *Falkenhausen* und *Fuchs* behandelt.

Wird nach *v. Falkenhausen* und *Fuchs*¹⁾ durch intravenöse Injektion sehr stark sensibilisierter Blutzellen beim Meerschweinchen das Komplement gebun-

¹⁾ *v. Falkenhausen* und *H. J. Fuchs*, Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 1927, 372.

den, so bleibt die Gerinnung aus. Mit $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$ und folgendem Abzentrifugieren, noch besser aber mit kolloidem $\text{Mg}(\text{OH})_2$ läßt sich aus dem Plasma quantitativ das Prothrombin = Proserozym entfernen, was Verlust der Gerinnbarkeit wie auch der Komplementfähigkeit mit sich bringt. Die Prothrombine, d. h. wirksame aktive thermolabile Substanzen von Kaninchen- und Menschenplasma, können sich gegenseitig vertreten, entbehren daher der Artspesifität. Die „aktive Substanz“ wird sowohl bei der Gerinnung, wie auch zur Hämolyse verbraucht, doch bedarf der letztere Vorgang etwas größerer Mengen.

Hirudin, Heparin, Novorudin hemmen die Gerinnung und ebenfalls die Komplementwirkung. Das ungerinnbare Blut Hämophiliekranker enthält Antithrombin im Überschuß und hemmt dadurch auch die Komplementfunktion des Plasmas. Wird das Antithrombin entfernt, kann Prothrombin sowohl die Gerinnung als auch die Hämolyse sensibilisierter Blutzellen bewirken [*Fuchs* und *Hartmann*¹⁾]. Das Proserozym kann aus der Adsorption an $\text{Mg}(\text{OH})_2$ befreit werden und bewirkt dann bei einem proserozymfrei gemachten Plasma sowohl dessen Gerinnungsfähigkeit wie auch die Restitution der Komplementwirkung [*Fuchs*²⁾].

Das Wesen der hämophilen Gerinnungsstörung ist nach *v. Falkenhausen*³⁾ ein Antiprothrombinüberschuß und das Antiprothrombin wird (nach *Falkenhausen* und *Fuchs*) mit dem *Howell*'schen Heparin identisch angenommen, das Prothrombin mit dem Komplementmittelstück und in dem Antithrombin der Träger antikomplementärer Wirkung gesehen. Der durch Leberinsuffizienz bewirkte Antiprothrombinüberschuß hemmt durch Bindung der in normaler Weise frei werdenden Thrombokinasen das Zustandekommen der Gerinnung. Durch Injektion von Clauden wird das gestörte Antiprothrombin-Thrombokinasgleichgewicht zugunsten des letzteren verbessert und damit erscheint gleichzeitig auch wieder die Fähigkeit zur Lyse sensibilisierter Blutzellen.

Im Meerschweinchenserum ist das Prothrombin mit dem (nach *Braun* hergestellten) Komplementmittelstück identisch und kann im Experiment betr. Gerinnung und Hämolyse durch Mäuseserum ergänzt werden [*Fuchs*⁴⁾]. Im Kaninchenplasma setzt die Lyse sensibilisierter Blutzellen erst nach der Gerinnung ein, woraus *Fuchs*⁵⁾ schließt, daß im zirkulierenden Blut normalerweise kein freies Prothrombin und daher auch kein freies Komplement vorhanden ist. Wenn nun doch intravasale Hämolyse sensibilisierter Blutzellen eintreten kann, so kann dies nur geschehen, wenn die Sensibilisierung hochgradig ist, denn dann soll das Prothrombin eine größere Affinität zur sensibilisierten Blutzelle haben, wie zum Anti-Prothrombin [*Fuchs*⁶⁾]. In sehr antiprothrombinreichem Peptonplasma des Hundes wird durch hoch sensibilisierte Erythrozyten das Komplementmittelstück aus dem Antiprothrombinkomplex gerissen, so daß Hämolyse eintritt, während eine Thrombinbildung mit nachfolgender Gerinnung ausbleibt. Bei nur schwacher Sensibilisierung der Hammelblutzellen treten nach deren intravenöser Injektion unklare Verhältnisse auf, die durch Überschneiden der drei vorhandenen Affinitätsmöglichkeiten des Prothrombins

¹⁾ *Fuchs* und *Hartmann*, Ztschr. Immunitätsforsch. 58, 1 (1928).

²⁾ *Fuchs*, Ztschr. Immunitätsforsch. 58, 14 (1928).

³⁾ *v. Falkenhausen*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. 145, 100 (1929).

⁴⁾ *Fuchs*, Ztschr. Immunitätsforsch. 62, 107 (1929).

⁵⁾ *Fuchs*, Ztschr. Immunitätsforsch. 62, 117 (1929).

⁶⁾ *Fuchs*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. 145, 108 (1929).

(zu Antiprothrombin, zu Thrombokinase und zu den sensibilisierten Blutzellen) zu erklären sind [v. *Falkenhausen*¹⁾].

In dieser Beobachtung, daß schwächer sensibilisierte Blutzellen im strömenden Meerschweinchenblut keine nennenswerte Änderung von Gerinnungszeit und Komplementtiter bewirken, wird ein weiterer Beweis für die von *Fuchs* bereits experimentell gezeigte Tatsache erblickt, daß im strömenden Blut kein freies Komplement vorhanden ist.

Das Komplement(mittelstück) ist vielmehr als Prothrombin an das Antiprothrombin (Heparin) gebunden und wird nicht nur leicht von anorganischen Kolloiden wie $Mg(OH)_2$ gebunden, sondern auch in Form der bekannten Komplementwirkung durch spezifische Präzipitate. Das Oxalatplasma eines mit Menschenserum vorbehandelten Kaninchens verlor in Versuchen von *Fuchs*²⁾ nach Zusatz des Antigens nicht nur seine hämolytische Komplementwirkung, sondern auch seine Fähigkeit, auf Zusatz von Ca-Salzen zu gerinnen. Antiprothrombin(Heparin)-Überschuß wirkt durch Prothrombinbindung antikomplementär. Daraus erklärt sich die antikomplementäre Wirkung des Hämphilenblutes, Peptonblutes, Heparinblutes, des auf 56° erhitzten Serums („Protectin“ *Noguchi*'s) wie auch die erhöhter Salzkonzentrationen usw. Phosphatide sollen dadurch antikomplementär wirken, daß sie Prothrombin aus der Verbindung mit Antiprothrombin lösen und irreversibel in Thrombin verwandeln, wodurch die Komplementmittelstückfunktion erlischt (*Fuchs*).

Wie man sieht, nehmen diese experimentell gut fundierten Ansichten von v. *Falkenhausen* und *Fuchs* das Komplement als ein stoffliches Substrat an, das in enger Beziehung zur Blutgerinnung steht.

Immerhin stehen manche dieser Ansichten in Widerspruch zu denen anderer Autoren. Zum Beispiel konnte *R. R. Hyde*³⁾ im Serum wie auch im Plasma eines Hämphilen hochwirksames Komplement nachweisen, so daß *Hyde* die *Metschnikoff*'sche Theorie, daß das Komplement im zirkulierenden Blut normalerweise nicht vorhanden ist (sondern erst durch Zerstören der Leukozyten entsteht), für unhaltbar erklärte. Auch *F. Klopstock*⁴⁾, der Meerschweinchenzitratplasma in Zitratmedien untersuchte, fand nicht nur sehr wirksames, sondern sehr lange haltbares Komplement im Plasma und nimmt daher, wie auch ältere von ihm zitierte Autoren, wie *Schneider* 1908, *Muir* und *Mc Nu Nee* 1912 an, daß bereits das strömende Blut Komplementfunktion hat. Trotz dieser Divergenz der Anschauungen, die vielleicht sich durch verschiedene Technik erklären lassen, bleibt doch der Zusammenhang der Komplementfunktion mit der Blutgerinnung bestehen. Es wäre zu begrüßen, wenn die Theorien von v. *Falkenhausen* und *Fuchs* eine Nachprüfung bei den Komplementmangeltieren von *Hyde* fänden.

Andererseits werden fortschreitende Erkenntnisse über die Wirkung von Heparin auf Eiweiß die Ansichten von *Fuchs* wieder an die mehr

¹⁾ v. *Falkenhausen*, *Biochem. Ztschr.* **218**, 453 (1930).

²⁾ *Fuchs*, *Ztschr. Immunitätsforsch.* **67**, 272 (1930).

³⁾ *R. R. Hyde*, *Amer. Journ. Hyg.* **8**, 859 (1928).

⁴⁾ *F. Klopstock*, *Zbl. Bakt.* **98**, 100 (1926).

physikalisch-chemischen Anschauungen über die Rolle der Globuline bei der Komplementwirkung angliedern. Nach *A. Fischer*¹⁾ entsteht aus Serumalbumin mit Heparin ein Globulin ähnliches Protein. Da Heparin Säurenatur hat, sind die Heparineiweißverbindungen analog den Nukleoproteiden. Allerdings hat die Nukleinsäure auf die Gerinnung keinen Einfluß. Die Möglichkeit zu komplexen Molekülverbindungen der Heparineiweißsalze erklärt die Änderung der Dissoziation des Eiweißes in dieser Verbindung. Daher sieht man durch Heparin wohl eine Änderung in der p_H -Trübungskurve [*A. Fischer*²⁾] des Eiweißes, nicht aber in der Ammoniumsulfattrübungskurve [*A. Schmitz* und *W. Wulkow*³⁾]. Immerhin ergab eine eingehende Untersuchung, daß im Vergleich zu Serum beim Heparinplasma der Globulinanteil auf Kosten des Albuminanteils eine Vermehrung erfahren hat. Weitere Forschung ist vielleicht in der Lage, durch diese Änderung von Eiweiß durch Heparin dessen anti-komplementäre Wirkung zu erklären.

VI. Die Hämolyse.

I. Die unspezifische Hämolyse.

Die Erscheinungen der Quellung und Schrumpfung, die Blutzellen in nicht isotonischen sowie in nicht isoionischen Lösungen erleiden, haben zwar nicht unbedingt erwiesen, aber es doch sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Blutzellen eine Membran mit flüssigem Inhalt haben. Bewiesen scheint das heute durch die Dunkelfeldbeobachtungen von *Bechhold*⁴⁾, *Hattori*⁵⁾ und *Salén*⁶⁾ zu sein, sowie durch *Péterfi*, dem es mit seinem Mikromanipulator gelang, Blutzellen anzustechen und den Hämoglobinaustritt zu sehen.

Das Stroma bildet die Hülle und besteht sicher aus Eiweißen und Lipoiden, vielleicht auch aus Kohlehydraten (*Forssman*'sches Antigen, Blutgruppensubstanz A), wobei man wohl keine mosaikartige Struktur annehmen darf, sondern eine komplexe Substanz, die in jeder Einheit alle Stoffe in gegenseitiger Bindung enthält.

¹⁾ *A. Fischer*, Naturwiss. 19, 965 (1931).

²⁾ *A. Fischer*, Biochem. Ztschr. 244, 464 (1932).

³⁾ *A. Schmitz* und *W. Wulkow*, Biochem. Ztschr. 245, 408 (1932).

⁴⁾ *Bechhold*, Münch. med. Wschr. 68, 127 (1921).

⁵⁾ *Hattori*, Biochem. Ztschr. 119, 45 (1921).

⁶⁾ *Salén*, Biochem. Ztschr. 110, 176 (1920); Münch. med. Wschr. 68, 885 (1921).

Durch eine große Mannigfaltigkeit verschiedenartigster Faktoren (wie mechanische Einwirkung, Strahlen, Adsorption an Kolloide, Stoffe wie Glukoside, Seifen, Schlangen — Bakteriengifte, lipoidlösliche Stoffe, eiweißfällende Stoffe, kapillaraktive Substanzen usw.) lassen sich Blutzellen auf unspezifische Weise lösen. Einen kleinen Überblick gibt *Mond* (1927¹). Hier wollen wir nur die Formen der unspezifischen Hämolyse berühren, die durch ihre Analogien mit der spezifischen Hämolyse von Interesse sind und deren Kinetik von *E. Ponder*²) besonders eingehend untersucht ist. Durch zwei Gleichungen, von denen die eine die Geschwindigkeit der Fundamentalreaktion und die andere die Verteilung der verschiedenen Blutzellenresistenz in einer Häufigkeitskurve wiedergeben, läßt sich nach *Ponder* die Saponinhämolyse wie auch die durch taurochol- und glykocholsaures Na analysieren.

Ponder nimmt übrigens an, daß sowohl Saponin wie auch die gallensauren Salze sich mit Proteinen der Stromasubstanz verbinden und besonders die Lösung durch gallensaure Salze nicht auf Lösung von Lipiden beruht.

In die Gruppe der nach Art von Saponin hämolysierenden Substanzen fallen nach *Ponder* die meisten hämolysierenden Glukoside, Seifen sowie auch die Bakterienhämotoxine, von denen es beim Histolytik- und Streptokokkus-Pyogenes-Toxin bekannt ist, daß sie proteolytisch wirken.

Wenn alle diese hämolysierenden Stoffe am Stroma-Eiweiß angreifen, ist begreiflich, daß die Gegenwart von fremdem Eiweiß die hämolysierende Wirkung herabsetzt, wie es im Falle von Serum *Bayer*³) bereits auf Bindung an das Serumeiweiß bezog und nicht auf das Cholesterin. Diese Bindung hämolysierender Stoffe an zugesetztes Eiweiß entspricht nach *Ponder*⁴) einer Adsorption.

Was nun besonders interessant ist, ist der von *Ponder* (1922) beschriebene Umstand, daß je nach der Reihenfolge der Zusätze die Wirkung zugesetzten Serums verschieden ist.

Zum Beispiel: Wird zu 1 ccm Suspension gewaschener Blutzellen 0,1 ccm Serum zugesetzt und 1 Minute später 1 ccm $\frac{1}{3000}$ verdünnte Lösung von taurocholsaurem Natrium, dann findet keine Hämolyse statt, weil das Serumeiweiß sich mit dem Taurocholol gebunden hat. Wird aber umgekehrt erst das Taurocholol und nach 1 Minute 0,1 ccm Serum zugesetzt, dann tritt fast sofortige Lyse ein. Hier hat also der Serumzusatz beschleunigend gewirkt.

Um dies zu erklären, weist *Ponder* auf seine Versuche mit hämolysierenden Farbstoffen hin, die an frühere Beobachtungen von *Browning* und *Mackie*⁵) und *Mackie*⁶) anknüpfen.

¹) *Mond*, *Protoplasma* 2, 126 (1927).

²) *E. Ponder*, *Brit. med. Journ.* (20. Aug. 1927).

³) *Bayer*, *Biochem. Ztschr.* 4, 368 (1907).

⁴) *Ponder*, *Proc. Roy. Soc. (B)* 98, 489 (1925).

⁵) *Browning* und *Mackie*, *Ztschr. Immunitätsforsch.* 21, 422 (1914).

⁶) *Mackie*, *Trans. Roy. Soc. South Africa* 8, 59 (1919).

Mackie fand, daß gewaschene und in NaCl-Lösung resuspendierte Blutzellen dadurch, daß sie mit Brillantgrün 1:50000 versetzt und nach einiger Zeit durch wiederholtes Waschen von der Farbstofflösung befreit und in NaCl resuspendiert werden, sensibilisiert sind, so daß Zusatz von sehr wenig Serum oder Plasma Hämolyse hervorruft. Wird die Reihenfolge dieses Zellen-Farbstoff-Serum-Systems verändert in ein Zellen-Serum-Farbstoff-System, findet keine Lyse statt, so daß also die Verhältnisse hier analog den obigen mit taurocholsaurem Natrium liegen.

Die Sensibilisierung besteht in einer Adsorption von Farbstoff, der durch Alkohol oder durch Erwärmen zum größten Teil wieder entfernt werden kann, was auf eine nur lose Bindung am Stromaeiweiß schließen läßt. Nimmt man nun nach *Ponder* an, daß sich der adsorbierte Farbstoff mit dem Serumprotein verbindet und diese Verbindung als Lysin wirkt, so bleibt zu erklären, warum diese Bindung oder die lytische Wirkung einer solchen Bindung nur stattfindet in dem Zellen-Farbstoff-Serum-System.

Zunächst wird der Farbstoff adsorbiert, dann erst tritt später eine Verbindung desselben mit dem Stromaeiweiß ein, die nach langer Zeit zur Hämolyse führt. Noch bevor dieser zweite Vorgang eingesetzt hat, wird Serum zugefügt, welches sich nun mit dem Farbstoff zu einem Lysin vereinigt, welches auf oder in der Oberfläche der Blutzellen ist und somit die Zelle löst, welche im Laufe der Zeit auch durch das Lysin aus der Farbstoffstromaeiweißverbindung gelöst wäre. Findet diese Farbstoffeiweißverbindung im Milieu statt, wie bei dem System Blutzelle—Serum—Farbstoff, dann kann das Lysin die intakte Blutzelle nicht angreifen (*Schmidt*). Auch wenn zu wenig Serum bei der ersten Versuchsanordnung zugesetzt wurde, ist die Lyse langsamer und bleibt bei ganz wenig Serum partiell. Jedenfalls muß bei der mathematischen Analyse des Vorgangs die verschiedene Resistenz der Blutzellen, wie bei der Saponinhämolyse, mit berücksichtigt werden.

Die Kieselsäurehämolyse.

Landsteiner und *Jagic*¹⁾ hatten 1904 gefunden, daß man bei der spezifischen Immun-Hämolyse den Antikörper durch (am besten aus Äthylsilikat hergestellte) kolloide Kieselsäure ersetzen kann. Das (hämolyysinbefreite) Meerschweinchenkomplement ist im Verein mit Kieselsäure fähig, jede beliebige Art von Blutzellen zu lösen. Auch hier ist die Reihenfolge wichtig, denn erst muß das Meerschweinchen Serum zu den Blutzellen gebracht und einige Zeit eingewirkt haben, dann erst darf die Kieselsäure zugefügt werden, worauf schnelle Hämolyse erfolgt.

Nach *Landsteiner* und *Rock*²⁾ kann man statt Kieselsäure kolloide Zinnsäure benutzen, wobei die damit behandelten Blutzellen starke Agglutination und bei Zusatz von Lezithin (statt Komplement) Lyse zeigen.

¹⁾ *Landsteiner* und *Jagic*, Wien. klin. Wschr. 1904, Nr. 3; Münch. med. Wschr. 1904, Nr. 24.

²⁾ *Landsteiner* und *Rock*, Ztschr. Immunitätsforschg. 14, 14 (1912).

Die Tanninhämolyse.

Nach *Kruyt*¹⁾ und *de Jong*²⁾ hat das Tannin auf hydrophile Stoffe, wie z. B. Agar und Gelatine, eine dem Alkohol analoge dehydratisierende Wirkung. *L. Reiner* und *Oe. Fischer*³⁾ sahen nun bei Zusatz einer sorgfältig neutralisierten Tanninlösung zu einer Blutzellensuspension eine starke Agglutination eintreten, die sie auf Grund der *Kruyt*'schen Feststellungen ebenfalls als dehydratisierende Wirkung des Tannins auf die Blutzellen ansehen. Die mit Tannin behandelten Blutzellen waren sensibilisiert gegen die lytische Wirkung von Komplement. Das Tannin hat sich also in dieser Versuchsanordnung wie ein spezifischer Antikörper verhalten, und die Wirkung letzterer fassen die Autoren daher gleichfalls als eine Dehydratation des Antigens auf. Diese Tanninwirkung kommt, wie auch *Kruyt* annimmt, durch eine Adsorption des heteropolar gebauten Tanninmoleküls (einer Glukose-Gallussäureverbindung) zustande, wobei die polaren (OH-) Gruppen dem Antigen und die hydrophobe Gruppe dem Wasser zugerichtet sind, was eine erhöhte Grenzflächenspannung oder mit anderen Worten eine geringere Hydratation zur Folge hat. Eine solche relativ hydrophobe Oberfläche ist dann zur weiteren Adsorption des Komplementmittelstücks geeignet.

Man sieht, daß zwischen diesen (Blutzelle-Kieselsäure-Komplement) und (Blutzelle-Tannin-Komplement) Systemen und der spezifischen Hämolyse weitgehende Analogien vorhanden sind.

II. Die spezifische Hämolyse.

Dadurch, daß die spezifische Hämolyse durch die Leichtigkeit ihres Nachweises der bequemste Indikator für Reaktionen auf Anwesenheit von Komplement geworden ist, hat diese Reaktion die Grundlage fast aller Studien über das Komplement abgegeben und allgemein eine Bearbeitung in der Serologie erfahren, wie kaum eine andere spezifische Reaktion. Trotzdem gibt es auch heute noch nicht einmal eine Teilfrage auf diesem Gebiet, die man als endgültig gelöst betrachten könnte.

a) Der Lösungsvorgang der roten Blutzellen.

Eine Auflösung findet nicht statt. Das Hämoglobin tritt aus und die Stromata bleiben zurück, sind aber insofern gegenüber den Stromata bei der unspezifischen Wasserhämolyse verändert, als diese noch auf osmotische Einflüsse durch Quellung oder Schrumpfung reagieren können, die Stromata nach spezifischer Lyse aber nicht mehr (*Bordet* 1899). Die Stromata müssen unter dem Einfluß von Hämolysin und Kom-

¹⁾ *Kruyt*, Koll.-Ztschr. 31, 338 (1922).

²⁾ *de Jong*, Koll.-Beih. 28, 1 (1928).

³⁾ *L. Reiner* und *Oe. Fischer*, Ztschr. Immunitätsforsch. 61, 317 (1929).

plement eine Änderung erfahren, die den Austritt von Hämoglobin ermöglicht, aber über die Art dieser Änderung, ganz abgesehen davon, auf welche Weise der Antikörper mit dem Komplement diese bewirkt, besteht noch keine Gewißheit.

Nach *Sachs* hat der Vorgang der Hämolyse nichts mit direkter Lipolyse oder Lezithinspaltung zu tun. Für eine Proteolyse hat sich ebenfalls kein beweiskräftiger Anhalt gefunden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Einwirkung von Hämolysin um irreversible Entquellungsvorgänge in der Erythrozytenmembran. Sicher ist, daß eine Bindung von Antikörper an der Membran stattfindet. Nach *Mudd*¹⁾ bindet sich das Lysin mit alkohollöslichem Material, wodurch sich die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen die Benetzung mit Triglyzeriden in seinen Versuchen erklären lassen soll.

Die Bildung denaturierten Globulins an der Oberfläche sensibilisierter Blutzellen dürfte als gesichert anzunehmen sein.

*Konikow*²⁾ nimmt Elektrosmose als Hauptfaktor bei der spezifischen Hämolyse an. Daraus, daß die spezifische Hämolyse nur bei Salzgegenwart stattfinden kann, wobei sich die Konzentrationen gleich wirksamer Lösungen wie ihre Äquivalentgewichte verhalten, schließt *Konikow* auf eine rein chemische Bindung zwischen Salz und Komplement unter Bildung einer komplexen Verbindung, die sich als eine Schicht mit dem isoelektrischen Punkt bei $p_H = 4,7$ um den Erythrozyten lagert. Hierdurch soll zwischen Erythrozyteninhalt und der Außenwandschicht eine *Donnan*'sche Potentialdifferenz auftreten und unter dem Einfluß des elektrischen Feldes wird Wasser durch die Stromamembran getrieben, wodurch nun indirekt durch osmotische Störung die Hämolyse bedingt ist.

Das Primäre ist jedenfalls für die spezifische Hämolyse die Bindung des Immunglobulins aus dem hämolytischen Serum, und da wir bei diesem Vorgang spezifische Affinitäten voraussetzen müssen, so müssen bestimmte Teile der Stromasubstanz als Träger der Spezifität wirken und werden in der Serologie als Rezeptoren bezeichnet. Das *Thomsen*-sche Phänomen zeigt, daß man durch Einwirkung von Kulturfiltraten gewisser Bakterien künstlich neue Rezeptoren auf der Stromaoberfläche schaffen kann. Ein näherer Einblick in die Verteilung von Rezeptoren an den Erythrozyten ist uns aber noch nicht möglich.

b) Die Hämolysinkomplementverbindung.

1. Die Reihenfolge der Einwirkung.

Bei Besprechung des Komplementes wurde bereits der Reihenfolge Lysin, Mittelstück und Endstück Erwähnung getan. Mittelstück kann nur an bereits sensibilisierten Blutzellen haften und Endstück nur auf „persensibilisierte“ Zellen wirken. Die Bedeutung der Reihenfolge geht deutlich aus früheren Versuchen von *Karczag* und *Hajos*³⁾ hervor, denen

¹⁾ *Mudd*, Biochem. Ztschr. **186**, 378 (1927).

²⁾ *Konikow*, Journ. exper. Biol. u. Med. (russ.) **1928**, 368; ref. Chem. Zbl. **2**, 763 (1929).

³⁾ *Karczag* und *Hajos*, Biochem. Ztschr. **122**, 52 (1921).

zufolge die nachträgliche Zugabe von Komplement zu sensibilisierten Blutzellen optimal wirkt. Die vorherige Zugabe des Komplementes sowie auch die nachträgliche Zugabe von Blutzellen zu Lysin-Komplementmischungen erschwert und verzögert die lytische Wirkung. Es ist wohl anzunehmen, daß die Blutzellen, die durch Waschen von anhaftenden Globulinen befreit sind, zunächst, wenn kein spezifisches Lysin vorhanden ist, unspezifisch Globulin anlagern, was dann die nachträgliche Bindung von spezifischem Immunglobulin erschwert.

2. Die Spezifität des Komplementes.

Man darf nicht, wie es manchmal geschieht, Komplement gleichsetzen mit frischem Serum beliebiger Herkunft. Es bestehen vielmehr gewisse Beziehungen der Tierarten unter sich, insofern der Hämolysegrad eines Systems: Blutzellen + Lysin + Komplement, je nach der Art des komplettierenden Serums verschieden stark ist. Zum Beispiel ist ein Anti-Kaninchenblut-Lysin am wirksamsten mit Rinderkomplement, weniger wirksam mit solchem vom Meerschweinchen und noch weniger mit solchem vom Hammel. Antirinderserum löst dagegen am stärksten mit dem Komplement vom Meerschweinchen, weniger mit dem vom Kaninchen und am schwächsten mit dem vom Hammel. Antimeerschweinchenserum wird durch Hammelserum wirksam, aber fast gar nicht durch Kaninchenserum komplettiert. Antihammelserum wirkt mit Meerschweinchenserum stärker als mit Rinderserum. Nach diesen Beobachtungen von *V. Scaffidi* und *Fr. Bruno*¹⁾ scheint die komplettierende Wirkung eines frischen tierischen Serums um so schwächer zu sein, je näher verwandt die die Blutzellen resp. das Komplement liefernden Tiere sind. Nach *S. Gard* und *H. v. Euler*²⁾ kann frisches Hammelserum Kaninchenblutzellen ohne Komplement hämolysieren, aber kann, wenn auf 56° erhitzt, durch Meerschweinchekomplement nicht mehr aktiviert werden. Die Autoren nehmen im Hammelserum zwei verschiedene hämolytische Substanzen gegen Kaninchenblutzellen an. Der eine wird bei 0° vollständig gebunden, ist thermostabil und wirkt nur mit Komplement, der andere wird bei 0° nur wenig, bei 37° aber völlig gebunden, ist thermostabil und kann auch ohne Komplement wirksam sein.

Nach *Zironi* und *Norotti*³⁾ werden sensibilisierte Blutzellen zwar auch durch ihr arteigenes Komplement gelöst, nur erfordert es eine sehr viel stärkere Sensibilisierung als bei der Benutzung von heterologem Serum als Komplement. Eine Ausnahme sollen nur sensibilisierte Menschenblutzellen machen, die bei gleichem Sensibilisierungsgrad gleich gut

¹⁾ *V. Scaffidi* und *Fr. Bruno*, Riv. Pat. sper. 6, 1 (1930).

²⁾ Acta med. Scand. 75, 440 (1931).

³⁾ *Zironi* und *Norotti*, Boll. Ist. sieroter. milan. 9, 237 (1930).

von Menschenkomplement wie von heterologem Komplement gelöst werden. Man sollte daher annehmen, daß intravenös eingeführtes Hämolyisin, welches, wie *V. Scaffidi* und *R. Carbone*¹⁾ durch nachfolgende Invitrolyse der gewaschenen Blutzellen durch heterologes Komplement zeigen konnten, zwar in vivo gebunden wird, aber im allgemeinen keine Hämolyse bewirken sollte, weil der Sensibilisierungsgrad für die Wirkung des homologen Komplementes in vivo zu gering ist.

Manche Autoren nehmen, wie auf S. 102 erwähnt, an, daß im strömenden Blut überhaupt kein Komplement vorhanden ist.

Aber in vivo liegen die Verhältnisse vielleicht wegen der großen Menge verfügbaren Komplementes anders, denn Anti-Kaninchenserum vom Hund vermag ohne Zusatz heterologen Komplementes bei Injektion in Kaninchen Hämoglobinurie hervorzurufen [*Scaffidi* und *Mallardo*²⁾]. Nach *Reiner* und *Strilich*³⁾ können mit Warmblüterimmenserum sensibilisierte (wie auch mit Tannin behandelte) Blutzellen auch durch Kaltblüterkomplement (Frosch) gelöst werden, wobei in letzterem Falle die Hämolyse bei 18° eher noch schneller als bei 37° mit Meerschweinchenkomplement verläuft. Danach scheint das Temperaturoptimum der Lyse durch die Herkunft des Komplementes bedingt zu sein.

c) Die quantitativen Beziehungen zwischen dem hämolysierenden Antikörper und dem Komplement.

Ganz allgemein hat die Erfahrung gezeigt, daß hochsensibilisierte Blutzellen wenig und schwach sensibilisierte Blutzellen viel Komplement zur Lyse gebrauchen. Aber damit sind die quantitativen Beziehungen nicht genügend definiert. Zahlenmäßige Gesetzmäßigkeiten zwischen Komplement, Blutzellenzahl und Immunkörpermenge sind neuerdings von *Manwaring*⁴⁾, *Cromwell*⁵⁾, *A. Hill* und *G. Parker*⁶⁾, *Brooks*⁷⁾, *St. Morse*⁸⁾, *Wadsworth* und *E. und F. Maltaner*⁹⁾, *E. R. Hyde* und *E. T. Parsons*¹⁰⁾ u. a. aufgestellt worden, die z. T. die Einzelheiten des Reaktionsablaufes sehr genau wiedergeben. Aber in der Erkenntnis des Wesens der Immunkörperwirkung auf die Blutzelle und der Wirkungsweise des Komplementes auf sensibilisierte Blutzellen haben uns diese mathematischen Analysen, auf die der Raum verbietet einzugehen, nicht wesentlich gefördert.

1) *V. Scaffidi* und *R. Carbone*, Riv. Pat. sper. 6, 84 (1930).

2) *Scaffidi* und *Mallardo*, Riv. Pat. sper. 3, 353 (1928).

3) *Reiner* und *Strilich*, Ztschr. Immunitätsforsch. 61, 40, 43 (1929).

4) *Manwaring*, Journ. inf. Dis. 5, 55 (1908).

5) *Cromwell*, Journ. of Immun. 7, 461 (1922).

6) *A. Hill* und *G. Parker*, Journ. of Path. 28, 1 (1925).

7) *Brooks*, Journ. of Med. Res. 41, 399 (1919—20).

8) *St. Morse*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 19, 17 (1921—22).

9) *Wadsworth* und *E. u. F. Maltaner*, Journ. of Immun. 21, 313 (1931).

10) *R. R. Hyde* und *E. T. Parsons*, Amer. Journ. of Hyg. 7, 11 (1927).

d) Faktoren, die die spezifische Hämolyse beeinflussen.

Da der Vorgang der spezifischen Hämolyse aus zwei Vorgängen besteht: der Sensibilisierung der roten Blutzellen durch deren Bindung mit Antikörper und der folgenden Komplementeinwirkung, so können die mannigfachen Faktoren, die wie z. B. Salzkonzentration, Gegenwart von Eiweiß, Temperatur, H-Ionenkonzentration usw. die Lyse beeinflussen, an einem der beiden Vorgänge angreifen. Es kann entweder die Sensibilisierung verhindert werden, oder die Wirkung des Komplements auf die sensibilisierten Zellen kann gehemmt werden oder ausbleiben.

1. Einfluß der Elektrolyte des Mediums.

In isotonischer salzfreier Saccharoselösung soll nach *Sachs* und *Terruchi* (1907) weder Bindung noch lytische Wirkung von Komplement stattfinden. Wird die übliche Konzentration von 0,85 Proz. NaCl des Mediums erhöht, so wird, wie beim Komplement bereits erwähnt, die Komplementfunktion in reversibler Weise aufgehoben, dagegen ist die Bindung von Antikörper an die Blutzellen anscheinend innerhalb weiter Grenzen von der Kochsalzkonzentration unabhängig. Immerhin wird aber die Festigkeit der Bindung oder die Dissoziationsfähigkeit von der NaCl-Konzentration insofern beeinflußt, als z. B. in 2 Proz. Lösung die Dissoziation leichter und schneller erfolgt als in 0,85 Proz. Lösung (*Philosophow*, 1909).

Bei der Einwirkung anderer Elektrolyte besteht die Schwierigkeit, den Angriffspunkt ihrer Wirkung zu ermitteln, da die Interferenz anderer Ionen einmal die Antikörper und dann die Komplementbindung stören kann, wobei die Schwierigkeit darin liegt, daß man den Effekt der ersteren Bindung erst durch die Wirkung der zweiten erkennen kann.

Wenn man daher auch weiß, daß z. B. Kalium- und Kalziumsalze bis zu einer Konzentration von 0,1 Proz. auf die Immunhämolyse hemmend, Mg-Salze in einer solchen von 0,25—0,005 Proz. fördernd wirken und sich diese entgegengesetzten Wirkungen gegenseitig aufheben lassen [*Schmidt* und *Gross*¹⁾], so bleibt die Frage noch nicht genügend geklärt, wo diese Wirkungen angreifen. *Schmidt* und *Gross* glauben, daß der Angriffspunkt der Kationenwirkung an den roten Blutzellen sich befindet, zu welcher Ansicht auch *Wright* und *Maccallum*²⁾ gelangt waren, sowie u. a. auch *Neuschlosz*³⁾, der speziell die Anionen studierte und im wesentlichen die gleiche lyotrope Reihe von *Hofmeister* fand wie *Wright* und *Maccallum*.

Nach *Neuschlosz* findet die Immunhämolyse nur in Gegenwart solcher Ionen statt, die in der lyotropen Reihe eine mittlere Stellung einnehmen, wofür er folgende Erklärung für denkbar hält. Die Ionen am einen Ende der Reihe bewirken zu starke Quellung, die am anderen zu starke Entquellung der Eiweißkörper in den Erythrozyten. Hämolyse kann nur bei einem mittleren Quellungsgrad stattfinden. Da es aber nicht gelang, durch Mischung entgegengesetzt wirkender Anionen z. B. Sulfat und Rhodanid, ein für die Hämolyse günstiges Milieu zu schaffen, werden für die verschiedenen Ionen verschiedenartige Angriffspunkte am hämolytischen System angenommen.

¹⁾ *Schmidt* und *Gross*, *Biochem. Ztschr.* **215**, 61 (1929).

²⁾ *Wright* und *Maccallum*, *Journ. of Path.* **25**, 316 (1922).

³⁾ *Neuschlosz*, *Compt. rend. Soc. Biol.* **97**, 1242 (1927).

In den Einzelheiten sind die Wirkungen der verschiedenen Elektrolyte schwer zu deuten, aber im ganzen ist es bemerkenswert, daß die Reihenfolge der einwertigen Anionen für die Hemmungen der spezifischen Hämolyse die umgekehrte Reihenfolge ist, wie sie *Pauli* für die Eiweißfällung fand. Ferner ist die Fähigkeit der Salze, ein hämolytisches System in Glukoselösung zur Auswirkung zu bringen, in der Hauptsache umgekehrt ihrer Fähigkeit, die Hämolyse in NaCl-Lösung zu hemmen. Das Wesentliche wird die physikalische Beeinflussung der Serumglobuline sein, analog der Wirkung von Elektrolyten auf die Löslichkeit und Fällbarkeit von Kasein und Gelatine.

Letzthin haben *H. Eagle* und *G. Brewer*¹⁾ dem Mechanismus der Hämolyse durch das Komplement eine ausführliche Arbeit gewidmet. Danach beruht der Einfluß der Elektrolyte und der H-Ionen-Konzentration für die Komplementbindung in erster Linie auf ihrer Einwirkung auf sensibilisierte Zellen. Bei Verwendung von Salzen mit monovalenten Kationen wird die Komplementbindung und damit die Hämolyse in jeder Konzentration zwischen 0,02—0,035 molar verhindert. Bivalente Kationen hemmen noch stärker. Das Optimum für die Komplementbindung liegt bei $p_H = 6,5-8,0$. Bei wenig saurer Reaktion tritt Hemmung ein. Bei $p_H = 4,8$ einerseits und $p_H = 8,8$ andererseits tritt eine irreversible Inaktivierung des Komplementes ein. Bemerkenswert ist es, daß die Komplementbindung und die Hämolyse durch dieselben Einflüsse gehemmt werden, die die Ionisierung der Serumeiweißkörper herabsetzen und deren Aggregation fördern.

2. Einfluß der Temperatur auf die spezifische Hämolyse.

Bereits *Ehrlich* und *Morgenroth* zeigten, daß zwar die Antikörperbindung an rote Blutzellen schon bei 0° stattfinden kann, aber bei dieser Temperatur das Komplement nicht gebunden wird. Bekanntlich kann man mit Hilfe dieser Tatsache den Antikörper von gleichzeitig vorhandenem Komplement relativ trennen. Bei sogenannten Normalhämolysinen ist die Trennung auf diese Weise nicht immer möglich. Mit steigender Temperatur geht die Antigenantikörperbindung schneller vor sich bis zu etwa maximaler Geschwindigkeit bei 37°. Bei höherer Temperatur über 60° wird das Hämolysin geschädigt und schließlich wirkungslos.

Die Bindungsfähigkeit der Blutzelle kann jedoch selbst bei hohen Temperaturen erhalten bleiben. Eine gewisse Bindungsfähigkeit bleibt selbst gekochten Blutzellen erhalten, was der Präzipitinbindungsfähigkeit gekochten Eiweißes analog ist. Es scheinen aber gewisse Blutzellen Rezeptoren zu enthalten (*Forssman*'sches Antigen), die Kochhitze gut vertragen und die wohl keine Eiweißnatur haben, wiewohl noch nicht

¹⁾ *Eagle* und *Brewer*, Journ. gen. Physiol. 12, 845 (1929).

sichergestellt ist, ob es Lipoide oder Kohlehydrate sind¹⁾. Da schon bei 55° erhitzte Blutzellen der Lyse durch Hämolysin + Komplement nicht mehr verfallen, besonders, wenn die Erwärmung in isotonischer Rohrzuckerlösung stattfand (*Meyerstein* 1923), können erhitzte und sensibilisierte Blutzellen als geeignetes Adsorbens für Komplement dienen.

3. Einfluß von Eiweißzusatz auf die spezifische Hämolyse.

Werden Blutzellen statt in NaCl-Lösung in Serum suspendiert, dann bedarf es zur Lösung der sensibilisierten Zellen einer größeren Komplementmenge. — Das als Suspensionsmittel dienende Serum ist dabei, um dessen Eigenkomplement zu zerstören, erhitzt worden. Wird statt dessen das Eigenkomplement des betreffenden Serums durch adsorbierende Mittel entfernt, dann ist dessen Einfluß auf die spezifische Hämolyse weniger deutlich, so daß weniger Komplement zur Lyse benutzt werden muß als bei erhitztem Serum (*Muir* und *Browning* 1906). Man hat zur Erklärung die Bildung sogenannter Komplementoide in erhitztem Serum angenommen, was aber, wie wir weiter unten sehen, unnötig ist.

Im übrigen kann Gegenwart von erhitztem Serum auch die Sensibilisierung der Blutzellen durch Immunglobulin hemmend beeinflussen (*Ungermann* und *Kandiba* 1912) und andererseits nach *Manwaring* (1907) auch die lytische Wirkung von Komplement steigern, wobei die Länge der Erhitzungszeit eine Rolle spielt.

In engem Zusammenhang steht damit die Frage nach der Wirkung sogenannter Anti-Immunkörper. Wird das durch Immunisierung eines Tieres mit einem hämolysinhaltigen Serum erzeugte antihämolysinhaltige Serum einem hämolysischen System, natürlich nach vorherigem Erhitzen, zugesetzt, so wird nach *Ehrlich* und *Sachs* (1905), *Bordet* u. a. die Lyse verhindert, auch wenn die primär sensibilisierten und dann gewaschenen Blutzellen mit dem antilysinhaltigen Serum behandelt, erneut gewaschen und in erhitztem Meerschweinchenserum suspendiert werden und dann frisches Komplement zugesetzt wird, so daß anzunehmen ist, daß dadurch die Komplementbindung verhindert oder deren Auswirkung gehemmt wird. Werden die so behandelten Blutzellen in NaCl-Lösung suspendiert, so ist die Komplementhämolyse verzögert.

Ob es so etwas wie einen Antiimmunkörper gibt, ist höchst unwahrscheinlich. Sicher aber ist, daß die Immunisierung eines Tieres mit einem antikörperhaltigen Serum die Bildung präzipitierender Antikörper gegen dessen Eiweiß hervorruft (*Altmann* 1912). Werden nun zunächst Blutzellen mit Immühämolysin behandelt und dann gewaschen, so haben diese sensibilisierten Blutzellen nach außen eine Hülle von denaturiertem Immunglobulin, das nun als solches gegenüber dem erneut zugesetzten sogenannten Antihämolysin enthal-

¹⁾ Neueren Untersuchungen von *Freudenberg* (Heidelberg) zufolge ist die Blutgruppen-A-Substanz sicher und das *Forssman'sche* Antigen höchstwahrscheinlich ein Kohlehydrat.

tenden Serum als Präzipitinogen dient. Die sensibilisierte Blutzelle wird also, um im Bilde zu bleiben, erneut mit einer Hülle von Immunglobulin umgeben, die ihrerseits, da denaturiert, imstande wäre, Komplement zu binden. Nun kann folgendes eintreten:

Wird erhitztes Meerschweinchenserum zugefügt, dann werden unspezifische Globuline adsorbiert und damit die weitere Möglichkeit der Komplementbindung aufgehoben oder aber, wenn die so behandelten Blutzellen in NaCl-Lösung suspendiert werden, wird Komplement adsorbiert. Dieses Komplement ist aber in Wirklichkeit direkt an einem Präzipitinogen-Präzipitinkomplex gebunden, auf den Komplement keine weitere erkennbare Wirkung ausübt. Wenn nun doch eine verzögerte Lyse stattfindet, dann kann diese Wirkung nur eine indirekte sein, da die Blutzelle schließlich den Kern des A. A.-Komplexes darstellt und durch diese Adsorptionen in ihrem Membrangefüge sicher verändert ist. Unter Umständen braucht aber die Lyse nicht verzögert zu sein, sondern kann sogar mit weniger Komplement stattfinden (*Friedberger* und *Moreschi* 1908). Diese Diskrepanz beruht höchstwahrscheinlich auf verschiedenen Versuchsbedingungen bzw. Stärke der verwandten Immunkörper, Zeit der Einwirkung usw. und bedürfte einer nochmaligen Bearbeitung in diesem Sinne.

e) Spezifische Hämolyse ohne Komplement (Hämotoxin).

Die hämolysierende Wirkung des Serums von Kaninchen, die mit Blutzellen immunisiert waren und die für gewöhnlich Komplement beansprucht, kann, wie *K. Toshima*¹⁾ zeigte, unter besonderen Umständen ohne Komplement stattfinden. *Toshima* fand, daß Blutzellen-Antisera von Kaninchen nach 30 Minuten Erhitzung auf 75—90° die homologen Blutzellen bei Temperaturen unter 22° zu lösen vermögen. Der Gehalt an diesem von *Toshima* als Kälte-hämotoxin bezeichneten Agens war im Normalserum ganz gering und nahm mit der Immunisierung zu, wobei das Optimum an Wirkung bereits überschritten werden kann, wenn bei weiterer Immunisierung die agglutinierende und hämolysierende Fähigkeit des Serums noch zunehmen. Zusatz von Blutzellen zu erhitztem Immunserum im Volumenverhältnis 1:5 genügt nicht, das Kälte-hämotoxin zu adsorbieren. Bei Hühnerblutzellen, nicht aber bei Menschenblutzellen war eine Artspezifität vorhanden. Mit Katzen- und Meerschweinchenblutzellen konnte von Kaninchen kein Hämotoxin gewonnen werden. Das Hämotoxin scheint nicht an die labilen Globuline, sondern mehr an die Pseudoglobuline gebunden zu sein.

Während Immunsera die stärkste Kältehämolysen nach Erhitzung auf 75—80° aufweisen, müssen Normalsera zur optimalen Wirkung auf 90—100° erhitzt werden. Auch bezüglich der Temperatur für die Hämolysen unterscheiden sich Normal- und Immunsera. Erstere bedürfen Temperaturen unter 0°, letztere wirken auch bei höherer Temperatur, wenn auch geringer. 22° ist die obere Grenze.

Von den geprüften Normalseren war das von Kaninchen am wirksamsten, besonders gegenüber Hühnerblutzellen, weniger gegen solche von Schwein, Pferd, Mensch und gar nicht gegen einige andere. Immerhin weisen die Kaninchenserumsera bezüglich der Kältehämolysen erhebliche individuelle Schwankungen auf. Auch nach Absorption der spezifischen Hämolysine im Immunserum bleibt das Kälte-hämotoxin erhalten. Gegen Sulfationen ist die Kältehämolysen sehr empfindlich und bleibt auch im isotonischen Rohrzuckermilieu aus.

Weitere Versuche von *Toshima*²⁾ dienten zur Klärung der Frage nach der Natur des Kälte-hämolysins (K. H.). Es war nicht dialysabel, blieb im Trocken-

¹⁾ *K. Toshima*, Journ. of Biochem. 13, 291, 441 (1931).

²⁾ *Toshima*, Journ. of Biochem. 13, 489 (1931).

serum nach Azeton-, Alkohol-, Äther- usw. Extraktion erhalten. An Kaolin konnte es aus erhitztem und nicht erhitztem Serum völlig adsorbiert werden, während Blutzellen eine Absorption nur in erhitztem Serum zustande bringen. Zusatz kleiner Mengen von frischem Serum hebt die Wirkung des K. H. auf. Dasselbe bewirkt auch Kasein, Pepton und besonders stark Cholesterin.

Eine befriedigende Erklärung dieser Feststellungen von *Toshima* läßt sich nicht geben. Es bedarf noch weiteren Untersuchungen, um rein physikalische Momente, wie z. B. Erniedrigung der Oberflächenspannung der Sera beim Erhitzen durch Freiwerden von Fettsäuren, Rolle der Reaktion usw., auszuschalten und das Phänomen der K. H. auf immunbiologischer Grundlage (Wirkung noch unfertiger Antikörper?) erklären zu können. Auch wären Untersuchungen angezeigt, ob auch bei der Präzipitation und Agglutination in erhitzten Immunsereen noch eine in der Kälte bemerkbare spezifische Funktion verbleibt, die dem Kältehämotoxin analog ist.

III. Das Hämolysin.

a) Immunisatorische Erzeugung.

Sowohl die intakte Blutzelle als auch die Stromata allein können immunisatorisch Hämolysine erzeugen, nicht aber das Hämoglobin, welches zwar einen Antikörper erzeugt, der Hämoglobin präzipitiert, aber wegen der antigenen Verschiedenheit keine Affinität zur Stromasubstanz hat. Bekanntlich können auch gekochte Hammelblutzellen bei Kaninchen noch Hämolysin bilden, wie man annimmt durch das *Forssman*-sche Antigen, das als lipoide oder polysaccharidähnliche Substanz¹⁾ thermostabil ist. Die *Forssman*'schen heterogenetischen Hammelblut-hämolysine²⁾ lassen sich aber von den durch native Hammelblutzellen erzeugten isogenetischen Hämolysinen serologisch unterscheiden.

Werden Hammelblutzellen stark im Überschuß sensibilisiert, so vermögen diese im allgemeinen nicht mehr immunisatorisch Hämolysine zu erzeugen (*v. Dungern*), was wohl mit der Umhüllung durch (beim Kaninchen evtl. arteigenes) Immunglobulin zusammenhängen dürfte. Nach *H. Davide*³⁾ gelingt es, durch Behandlung von Kaninchen mit Fibrinogen von z. B. Meerschweinchen, Hund, Mensch Sera zu gewinnen, die spezifische Hämolysine und noch mehr Agglutinine für die Erythrozyten der das Fibrinogen liefernden Art enthalten, während Fibrinogen von Pferd und Hammel, durch deren Erythrozyten bei Kaninchen sich so leicht hochwertige Lysine herstellen lassen, nur ganz geringgradig Hämolysin bilden. Solche Antifibrinogen-Sera erweisen sich bei den homologen Tieren schon in kleinen Mengen als stark toxisch durch Erzeugung einer meist tödlichen

¹⁾ Nach *A. J. Weil* und *J. Berendes*, *Klin. Wschr.* 1932, 70, läßt sich das heterogenetische *Forssman*'sche Antigen an Kaolin adsorbieren. Die folgende Elution ist eine wasserklare Lösung (siehe Anmerkung auf Seite 112).

²⁾ Ausführliche Literatur bei *Forssman* im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, *Kolle, Kraus, Uhlenhuth*, Bd. II, 3. Aufl. (Jena 1929).

³⁾ *H. Davide*, *Acta med. scand. Suppl.* 13, 1 (1925).

Anämie, dagegen fehlt den entsprechenden Antiglobulin- und Antialbumin-
sera diese toxische Wirkung, die sich durch Adsorptionsversuch auf den
Fibrinogenantikörper zurückführen ließ. *Daide* glaubt in seinen Ver-
suchen eine Stütze für die Annahme, daß das Fibrinogen aus den Erythro-
zyten stammt, erblicken zu können.

Nun haben bekanntlich manche Tiere Normalhämolytine gegen die
Erythrozyten anderer Tierarten. Zum Beispiel vermag natives Kaninchen-
serum Taubenblutzellen zu lösen. Wird aber nach *P. Gori*¹⁾ das Kaninchen
parenteral mit Taubenblutzellen behandelt, so geht diese Fähigkeit des
nativen, nicht erhitzten Serums verloren, selbst wenn sich im erhitzten
Serum hochwertige Hämolytine serologisch nachweisen lassen. Bei
Immunisierung mit Blut, gegen welches ursprünglich keine hämolytische
Wirkung des aktiven Serums bestand, trat solche im Beginn der Immuni-
sierung auf, um mit Ansteigen des Antikörpertiters zu verschwinden.
Ein ganz analoges Verhalten hatte *Gori* auch bei der Bakteriolyse gefunden.
Wieweit sich dies durch Komplementschwund während der Immunisierung
erklären läßt, muß dahingestellt bleiben.

b) Bindung und Dissoziation des Hämolytins.

Reindarstellungsversuche.

Die Bindung des Hämolytins an die Blutzelle, d. h. seine Sensibili-
sierung gegenüber der lytischen Komplementwirkung ist ein Adsorptions-
vorgang. Je mehr Antikörper vorhanden ist, um so mehr kann die Blut-
zellenmembran binden. Es ist klar, daß bei einem solchen Überschuß
an adsorbierten Antikörpern, deren Bindung verschieden stark ist, die,
bildlich gesprochen, mehr außen befindlichen Antikörper loser gebunden
und daher auch leichter wieder entfernbare sind. Werden in ein Immun-
serum die Blutzellen fraktioniert zugesetzt, so sensibilisieren sich nach
Bordet die zuerst zugesetzten stark und die zuletzt zugesetzten finden
schließlich keinen Antikörper mehr vor, also analog dem *Danzysz*'schen
Phänomen bei Toxin-Antitoxin-Gemischen. Nach einiger Zeit kann aber
bekanntlich der Antikörper von den im Überschuß sensibilisierten Blut-
zellen auf die nicht sensibilisierten Zellen überwandern (*Morgenroth*,
Muir). Diese Fähigkeit abdissoziieren oder durch geeignete Flüssig-
keiten aus der Adsorptionsbindung eluiert werden zu können, hat man zu
Versuchen der Reindarstellung des Antikörpers benutzt.

Von den älteren Versuchen seien die von *L. v. Liebermann* und *B. v. Feny-
vessy*²⁾ erwähnt, die mittels verdünnter HCl aus sensibilisierten Blutzellen den
Antikörper abdissoziierten und solange mit Äther ausschüttelten, bis sie eine
farblose nach den üblichen Proben eiweißfreie Lösung erhielten, die etwa 20 Proz.
des an die Blutzellen gebundenen Antikörpers enthielt und in erster Linie

¹⁾ *P. Gori*, *Sperimentale* **84**, 237 (1930).

²⁾ *L. v. Liebermann* und *B. v. Fenyvessy*, *Zbl. Bakt.* **47**, 274 (1908).

agglutinierend aber auch mit Komplement hämolysierend wirkte. *Kosakai*¹⁾ eluierte gewaschene sensibilisierte Blutzellen mit isotonischer Zuckerlösung bei 55°, die er nach wiederholter Ausschüttelung durch Ather dialysierte. Zu einem hochgradig reinen Produkt gelangten *A. Locke* und *E. F. Hirsch*²⁾ durch Atherextraktion sensibilisierter Blutzellen, wodurch nach Entfernung der Lipide die Stroma-Hämolysinbindung leicht dissoziabel wird. Sie erhielten Hämolysin in solcher Reinheit, daß einer Hämolysineinheit nur noch 0,000125—0,00018 mg Protein entsprach.

Andere Reinigungsverfahren des Hämolysins gingen von der Fraktionierung des Immunserums aus. Wie *H. Schultze* und *H. Gross*³⁾ in teilweiser Bestätigung älterer Literaturangaben fanden, ist das Hämolysin (wie alle Antikörper) an Globulin gebunden. Je nach Tierart, Immunisierungsgrad, Alter des Serums usw. verteilt sich der Antikörper auf Eu- und Pseudoglobulin, ist aber oft in letzterem vorwiegend enthalten, so daß die Herstellung relativ haltbarer und dem Titer nach angereicherter Lösungen gelingt.

H. v. Euler und *E. Brunius*⁴⁾ fanden bei ihren Reinigungsversuchen den hämolysierenden Antikörper in den zwischen 30 und 46 Proz. Sättigungsgrenzen liegenden Ammoniumsulfat-Fällungsfractionen. Die Dialyse derselben verursachte zwar große Verluste, doch gelang bei weiterer Reinigung des Dialysats durch Adsorption an $\text{Fe}(\text{OH})_3$ und folgender Eluierung mit sek. Na.-Phosphat die einer mindest hämolytischen Dosis entsprechende Trockengewichtsmenge auf 0,0022 mg zu bringen. Entfernen des Phosphats durch Mg-Azetat und NH_3 mit folgender Neutralisation des Filtrates mit Essigsäure ergab eine Lösung, die die Verfasser einengten, bei deutlich saurer Reaktion mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ mit folgender Eluierung durch sek. Na-Phosphat behandelten und dialysierten. Schließlich war die mindest hämolytische Dosis in 0,0013 mg Trockensubstanz, was einer 26fachen Steigerung des Originalwertes entsprach. *Locke* und *Hirsch*⁵⁾ hatten durch Elektrodialyse antikörperhaltiger Pseudoglobulinlösungen den Titer des Serums, der ursprünglich 2000 Einheiten pro ccm entsprach, auf 150000—200000 Einheiten pro g frisch getrockneten Pseudoglobulins steigern können. Mit so gereinigten Antikörperlösungen berechneten *H. v. Euler* und *E. Brunius*⁶⁾ aus ihren Versuchen, daß 0,02 qm Blutzellenoberfläche 500 Hämolysineinheiten binden können. Eine noch weitergehende Reinigung erzielten sie⁷⁾, als sie von Stromata ausgingen, die bei $\text{pH} = 5$ in 0,85 proz. NaCl-Medium sensibilisiert wurden. 75 Proz. der Antikörper konnten mit 0,02 n Ammoniaklösung eluiert werden. Das durch Abzentrifugieren gereinigte Eluat wurde nach Neutralisation mit Essigsäure eingeengt, dann dialysiert. Es ergab sich dann eine hämolytische Mindestdosis zu 0,00013 mg, womit eine Steigerung des Reinheitsgrades auf das 230fache erzielt wurde. Wie man sieht, gelangten sie zu annähernd der gleichen Größenordnung wie *Locke* und *Hirsch*.

¹⁾ *Kosakai*, Journ. of Immun. **3**, 109 (1918).

²⁾ *A. Locke* und *E. F. Hirsch*, Journ. inf. Dis. **35**, 519 (1924); **37**, 449 (1925).

³⁾ *H. Schultze* und *H. Gross*, Biochem. Ztschr. **215**, 115 (1929).

⁴⁾ *H. v. Euler* und *E. Brunius*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. Abt. B. **10**, Nr. 8, 1; ref. Chem. Zbl. II, 2054 (1929).

⁵⁾ *Locke* und *Hirsch*, Journ. inf. Dis. **34**, 103; **35**, 519 (1924).

⁶⁾ *H. v. Euler* und *E. Brunius*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. Abt. A, **10**, Nr. 5, 1; ref. Chem. Zbl. **1**, 1803 (1930).

⁷⁾ *H. v. Euler* und *E. Brunius*, Svensk. Kem. Tidskr. **41**, 258 (1929); ref. Chem. Zbl. **1**, 850 (1930).

c) Natur der Hämolsine und Art ihrer Bindung.

Wie schon bei der Tanninhämolyse erwähnt, sehen *Reiner* und *Fischer* in dem Hämolsin und ganz allgemein in einem spezifischen Antikörper einen heteropolar gebauten Stoff, der durch die Art seiner Bindung eine lyophobe Grenzfläche schafft, die dadurch die Zusammenballung sowie auch die Komplementadsorption ermöglicht. Dieser Auffassung entspricht in vielen Punkten die neuerdings von *Eagle* vertretene, nach der das Immunglobulin adsorbiert und durch den Adsorptionsvorgang im Sinne einer Dehydratisierung denaturiert wird. In diesem Sinne ist der Antikörper kein Ferment und die Fermentnatur derselben wird daher von diesen Autoren streng abgelehnt, wenn auch andere, wie letzthin *L. Gozony* und *F. Hoffenreich*¹⁾, das Hämolsin als eine Lipase aufgefaßt haben wollen. Ein echtes Ferment wird aber durch den Vorgang, den es beschleunigt, nicht verbraucht und tritt auch nicht in das Reaktionsprodukt ein, was aber beim Immunkörper der Fall ist, weswegen trotz anscheinender zahlreicher Analogien doch die Fermentnatur der Antikörper abzulehnen ist.

Wir haben bisher stets den Antikörper als ein in spezifischer Weise verändertes Immunglobulin angesehen, ohne die Rolle der Serumlipoide zu berücksichtigen. Wenn auch an anderer Stelle (S. 173) die Bedeutung der Lipode bei serologischen Reaktionen ausführlicher erörtert wird, so möge doch hier angedeutet sein, daß, soweit es sich um Präzipitine und Agglutinine und Antikörper handelt, die mit Komplement zur Lyse führen, diese Antikörper mit relativ labilen, mehr dem Euglobulin als dem Pseudoglobulin des Serums entsprechenden Globulinen verbunden sind. Diese Globuline enthalten aber Lipode in sehr enger Bindung, oder bildlich gesprochen in einer maskierten Form, in der sie durch hydrotrope Eigenschaften des Eiweißes in echter Lösung gehalten sind. Man könnte sich nun vorstellen, daß das Immunglobulinteilchen seine angenommene Heteropolarität den Lipoiden verdankt, die also nach Adsorption des Immunglobulins an die Antigenmizelle ihre lipoide Gruppe dem Wasser zugerichtet haben, so daß dadurch die relativ hydrophobe Grenzfläche geschaffen wird, die einmal den Eindruck der Denaturierung des Globulins macht, dann aber auch die zur weiteren Adsorption von Komplement günstige Grenzflächenbeschaffenheit bewirkt. Wird daher das Lipoid des Immunserums extrahiert, so wird zwar die Bindung zwischen Antigen und Antikörper nicht beeinflußt, wohl aber nach *Hartley* alles gehemmt, was mit der lyophoben Grenzfläche des A. A.-Komplexes zu tun hat, also besonders die Präzipitation und die Komplementbindung (siehe S. 178).

¹⁾ *L. Gozony* und *F. Hoffenreich*, Zbl. Bakt. 113, 277 (1929).

VII. Die Komplementbindung und Komplementablenkung.

Wenn auch korrekter von einem Komplementverbrauch oder einer Komplementinaktivierung gesprochen werden sollte, so hat sich doch die Bezeichnung Komplementbindung in der Serologie eingebürgert und soll im folgenden beibehalten werden. Man kann heute ganz allgemein sagen, daß jeder Antigen-Antikörperkomplex unter geeigneten physikalischen Bedingungen Komplement zu binden vermag. Da die Komplementbindung, die physikalisch eine Adsorption labiler Globuline des Komplement-liefernden Serums darstellt, in genau gleicher Weise an jede geeignete Grenzfläche stattfinden kann, so ist die Bezeichnung „spezifische“ Komplementbindung für die Bindung des Komplementes an A. A.-Komplexe unnötig, da im Grunde jede Komplementbindung unspezifisch ist. Wesentlich ist die A. A.-Bindung, und wenn wir bei manchen A. A.-Komplexen durch folgende Komplementbindung Veränderungen in Form von Lyse beobachten, so ist dies ein sekundärer Vorgang, der mit dem Antikörper direkt nichts zu tun hat, sondern nur den Ausdruck für eine Zellschädigung darstellt, die wir bei einfacheren mizellaren Antigenen wie Eiweiß, Toxin usw. nicht feststellen können. Erst die verschiedenartige Beschaffenheit der Grenzflächen bedingt die bei der Komplementbindung zu beobachtenden quantitativen Unterschiede in dem Phänomen der Komplementbindung, welche man serologisch als spezifische Komplementbindung, Deviabilität des Komplementes, antikomplementäre Wirkungen usw. zu bezeichnen pflegt.

Grenzflächen, die Komplement adsorbieren können, kann aber das Antigen in vielen Fällen schon allein ohne Vermittlung durch den spezifischen Antikörper bieten, nämlich in allen Fällen, wo die Grenzfläche der Antigenteilchen gegenüber Wasser eine herabgesetzte Bindungsfähigkeit besitzt, also z. B. bei allen lipoiden Stoffen und auch vielen zelligen Antigenen (Bakterien).

Man braucht nicht so weit zu gehen wie *Ph. Lasseur*, nach dessen Ansicht jedes Antigen ohne Ausnahme in geeigneter physikalischer Zustandsform die Eigenschaft hat, Komplement zu binden, was aber, um sichtbar zu werden, genügend empfindlicher Methoden bedarf. Sicher haben die allermeisten Antigene diese Eigenschaft, die aber durch die spezifischen Antikörper erheblich verstärkt wird. In diesem Sinne ist der Vorgang: Antigen + Komplement + sensibilisierte Blutzellen nur quantitativ, aber nicht qualitativ von dem Vorgang Antigen + Antikörper + Komplement + sensibilisierte Blutzellen verschieden. *Ph. Lasseur* hält die beiden Vorgänge für höchstwahrscheinlich identisch, aber es gelang ihm nicht, experimentell die völlige Übereinstimmung

zu zeigen. Jedenfalls äußert sich diese nur quantitative Differenz in der Erfahrung, daß man zwischen antikörperreichen und antikörperarmen Seren unterscheidet, denn bei letzteren kann die vor der Sensibilisierung stattfindende Komplementbindung die Empfindlichkeit der Reaktion beeinträchtigen.

Da man in der Praxis stets mit einem Überschuß an Komplement arbeitet und die antikomplementäre Dosis des Antigens vorher ermittelt und dann einen entsprechenden Antigenüberschuß nimmt, so wird eine Störung durch die Komplementbindung des Antigens ausgeschaltet.

Bei dieser Praxis ist aber, wie *Ph. Lasseur* und *L. Spillmann*¹⁾ experimentell zeigten, die Komplementbindung eine begrenzte Reaktion, zum mindesten von einer bestimmten Konzentration an. Bei einer gegebenen Komplementkonzentration ist die Bindung nicht vollständig, was aber weder darauf beruht, daß es eine Minimalkonzentration gibt, unterhalb derer kein Komplement gebunden wird, noch darauf, daß der bindende Antigen-Antikörperkomplex gesättigt ist. Derselbe A. A.-Komplex kann verschiedene Komplementmengen binden, je nach der Menge Komplement, die zugefügt wird, wie das folgende Versuchsbeispiel von *Lasseur* und *Spillmann* zeigt:

Je 2 ccm einer 24stündigen B. *Balticus*kulturabschwemmung mit $\frac{1}{200}$ Immunsorum erhalten im Gesamtvolumen von 20 ccm folgende Komplementmengen:

Gesamt. zugefügt. Komplement	davon (C ₁) gebunden	in Proz.	freies (C ₂) Komplement	$\frac{C_1}{C_2}$
0,050	0,050 (?)	100	—	—
0,125	0,1155	92,4	0,0095	12,15
0,150	0,135	90,8	0,015	9
0,175	0,155	88,7	0,020	7,25
0,200	0,175	87,5	0,025	7
0,225	0,195	86,6	0,030	6,5
0,300	0,250	83,0	0,050	5
0,375	0,309	82,1	0,066	4,68

Die Komplementbindung ist also von einer bestimmten Konzentration an begrenzt. Unterhalb derselben ist die Bindung vollständig. Dann gibt es kein freies Komplement mehr, also auch keine Hämolyse nach noch so langer Zeit (Gegensatz zur Auffassung von *Vernes*, 1920). Aber in höheren Konzentrationen gibt es freies Komplement, unter Umständen mehr als in der Kontrolle (sensibilis. Blutz. + Ko.). Es können also beträchtliche Mengen von Komplement gebunden werden, ohne daß die Hämolyse verzögert wird.

Das Verhältnis C_1/C_2 in obiger Versuchstabelle war nicht konstant, was einen Verteilungszustand im Sinne des *Henry*'schen Gesetzes ausschließt.

¹⁾ *Ph. Lasseur* und *L. Spillmann*, Réactions anticorps (Nancy 1921).

Für schwache Konzentrationen fanden *Ph. Lasseur* und *Spillmann* folgende Formel anwendbar:

$$C_1 = k \cdot C_2 + B$$

in obigem Beispiel $C_1 = 3,45 C_2 + 0,0863$

$$C_2 = 0,290 C_1 - 0,0250$$

C_2 ist nicht direkt proportional zu C_1 , aber von $C_1 = B$ an wächst C_2 proportional zu $(C_1 - B)$. Für $C_1 < B$ wird C_2 negativ, d. h. wenn die Werte des gebundenen Komplementes unter B liegen, ist alles Komplement gebunden. C_2 ist positiv, wenn $C_1 > B$.

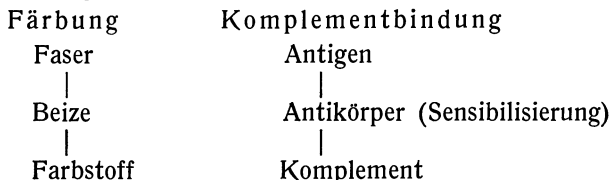
Es ist daher falsch, verallgemeinernd zu sagen: Keine Hämolyse = Komplementbindung und totale Hämolyse = keine Komplementbindung. Vielmehr gibt es in spezifischen Systemen auch dann Komplementbindung, wenn bei Komplementüberschuß totale Hämolyse eintritt. Maßgebend ist nicht die maximale Komplementmenge, die überhaupt gebunden werden kann, sondern diejenige maximale Komplementmenge, die so gebunden wird, daß die freie Komplementmenge geringer ist als die lösende Einheitsmenge. Ist sie gleich oder größer als diese Einheit, dann tritt Hämolyse auf, unabhängig davon, ob der bindende Antigen-Antikörperkomplex mit Komplement gesättigt ist oder nicht.

Für starke Konzentrationen, wie sie allerdings in der Praxis nicht vorkommen, genügt die Formel $C_1 = k \cdot C_2 + B$ nicht, sondern nach *Ph. Lasseur* und *Spillmann* paßt häufig mit den experimentellen Daten die Formel

$$C_1 = k \cdot C_2^n + A$$

die der *Freundlich*'schen Adsorptionsfunktion entspricht. Aber die Übereinstimmung ist niemals ganz genau.

Erinnern wir an die von *Bordet* betonte Analogie der A. A.-Komplexbindung mit dem Färbeprozess. Die Theorie der Färbung ist entweder rein physikalisch: Faser adsorbiert die Beize, letztere den Farbstoff, oder chemisch: in der Faser bildet sich zwischen Farbstoff und Beize ein Lack, jedoch kann sich diese unlösliche Farbverbindung nicht nur in der Faser, sondern auch unabhängig von der Faser bilden. Stellt man, wie es *Ph. Lasseur* und *Spillmann* tun, diese beiden Prozesse gegenüber, wie folgt



so ist die Frage, ob, wenn zwischen Farbstoff und Beize eine (chemische) Affinität besteht, auch eine solche zwischen Antikörper und Komplement vorhanden ist. Nach *Ehrlich* ist diese Frage mit ja („Ambozeptor“), nach *Bordet* mit nein zu beantworten, und heute neigt man wohl allgemein zur Auffassung, daß die Komplementbindung, wie oben eingangs erwähnt, nur ein unspezifischer, der A. A.-Bindung sekundär sich anschließender Adsorptionsvorgang ist.

VIII. Die Wassermann'sche Reaktion.¹⁾

Entsprechend den Voraussetzungen, unter denen Wa. R. entstand, erblickten die Autoren darin eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Diese Annahme hatte eine Stütze in der Natur des Antigens, das als wässriger Extrakt luetischer Fötallebern eine Menge Spirochäten nachweisbar enthielt, kam aber bekanntlich bald ins Wanken, als sich herausstellte, daß alkoholische Extrakte aus beinahe beliebigen Organen ebenfalls als Antigen dienen konnten. Das wesentliche an diesen Extrakten waren Lipoide, wie sie als solche in fast allen Organen des Körpers vorkommen, und wenn es gegen solche Lipoide einen Antikörper gibt, dann mußte dieser als ein Auto-Antikörper im Gefolge der luetischen Erkrankung entstehen. In diesem Sinne haben wohl zuerst *Weil* und *Braun* versucht, die Wa. R. zu erklären, stießen aber in der Beweisführung stets auf die Schwierigkeit, solche Lipoidantikörper experimentell zu erzeugen. Heute ist das durch die Arbeiten von *Landsteiner* und *Sachs* möglich geworden. Bevor man aber die Antigennatur der Lipoide und damit die Existenz von Lipoidantikörpern beweisen konnte, versuchte man die Wa. R. mehr als ein rein physikalisches Phänomen hinzustellen, basierend auf Anwesenheit gewisser relativ hydrophober Globuline im Serum, deren antikomplementäre Wirkung durch Adsorption an gewisse Grenzflächen, wie sie die Teilchen eines Lipoidsols darstellen, gesteigert wird. Wir wissen heute, daß das Zustandekommen einer positiven Wa. R. nicht nur in hohem Maße von dem physikalischen Zustand des Milieus und dem der Reaktionskomponenten abhängt, sondern sind überzeugt, daß auch bei der Annahme einer immunbiologisch spezifischen Antigen-Antikörperreaktion diese selbst als ein im Reagenzglas zwischen totem Material ablaufender Prozeß in seiner Gesamtheit physikalisch-chemisch erklärbar sein muß.

Wie bei der Komplementbindung erörtert wurde, ist die Bindung des Komplementes ein sekundärer Vorgang, der uns nur anzeigt, daß, von

¹⁾ Zusammenfassende Darstellungen mit Literaturangaben sind u. a. *R. Brandt* und *St. Szandicz*, Die serologischen Diagnosen der Syphilis (Berlin und Wien 1928). *J. A. Kolmer*, Serumdiagnosis by Complement fixation with special reference to Syphilis (London 1929). *K. Laubenheimer*, Serumdiagnose der Syphilis. Handb. d. pathog. Mikroorganismen (Jena 1927). *B. Müller* und *R. Brandt*, Wassermann'sche Reaktion (Theorie und Methodik). Handb. d. Haut- u. Geschlechtskrankheiten **15**, 285 (Berlin 1929). *H. Sachs*, Die Flockungsreaktionen. Ebenda **15**, 364 (1929).

der komplementbindenden Eigenschaft des Antigens allein abgesehen, eine Antigen-Antikörperverbindung stattgefunden hat. Bekanntlich kann

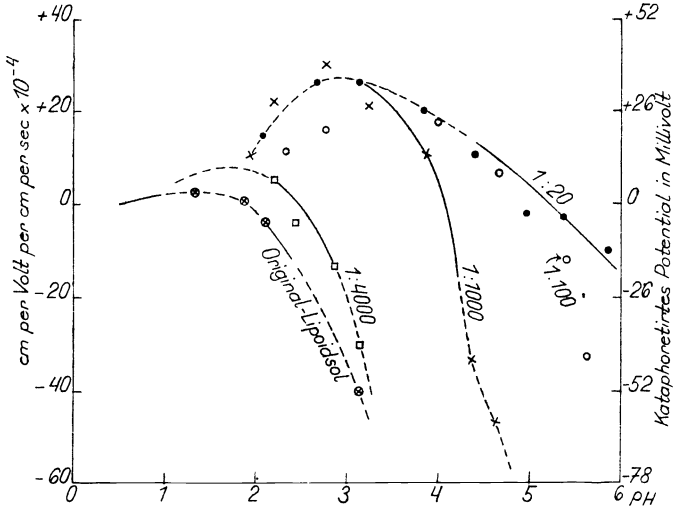


Fig. 6. Wirkung von normalem Serum auf die Kataphorese von Lipoidsolteilchen (nach H. Eagle). Ausgezogene Linie bedeutet Flockung.

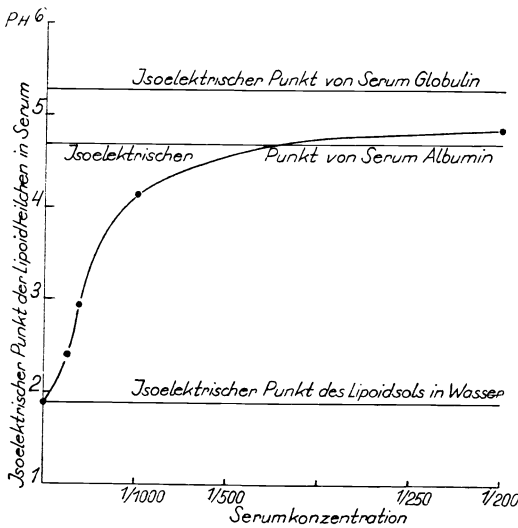


Fig. 7. Der Einfluß von adsorbiertem Serum-eiweiß auf den isoelektrischen Punkt von Lipoidsolteilchen (nach H. Eagle).

diese auch in Form einer sichtbaren Präzipitation auftreten. Das wesentliche bei der Wa. R. ist also die gegenseitige Einwirkung zwischen dem als Antigen dienenden Lipoidsol und dem Antikörper enthaltenden syphilitischen Serum, wobei wir Antikörper zunächst identifizieren mit irgendwie in spezifischer Weise verändertem Globulin, das wir im folgenden entweder als Immunglobulin oder als Antikörper oder Reagin bezeichnen.

a) Der alkoholische Organextrakt als Antigen.

Der als Antigen meistens benutzte Extrakt ist ein alkoholischer Auszug aus getrocknetem Rinderherzpulver, der mit NaCl-Lösung versetzt unter geeigneten Bedingungen eine starke opaleszent bis trüb erscheinende Suspension feinsten Lipoidteilchen darstellt. Der im allgemeinen 1:6 verdünnte alkoholische Extrakt ergibt im Gesamtmilieu von 1,5 ccm des Extraktserum-Komplementgemisches eine Alkoholkonzentration von ca. 16—17 Proz. Eine solche Alkoholkonzentration vermag aber in vereinzelt Fällen schon allein (ohne Lipoide) durch Dehydratation der labilen Globuline letztere zur Komplementadsorption geeignet zu machen, weswegen es für die Theorie der Wa. R. besonders wertvoll war, festzustellen, daß auch Lipoidsole ohne Alkohol für die Wa. R. geeignet sind. Entweder kann man den Alkohol verdunsten und den Rückstand durch Verreiben mit NaCl-Lösung emulgieren, oder aber man kann nach Ausschütteln des alkoholischen Extraktes mit NaCl-Lösung und Abzentrifugieren der entstandenen Flocken letztere mit NaCl oder mit Aqua dest. wieder aufnehmen und auf diese Weise ein reines Lipoidsol erhalten. Mit einem so hergestellten Lipoidsol hat letzthin *H. Eagle*, gestützt auf frühere Arbeiten von *Northrop* und *de Kruif, Stribley, Mudd* und vielen anderen, ausgedehntere Studien über die theoretischen Grundlagen der Wa. R. gemacht, deren Ergebnisse im folgenden besonders berücksichtigt sind.

Ein solches mit Aqua dest. hergestelltes Lipoidsol mit 0,04 Proz. fester Substanz hat einen isoelektrischen Punkt von $p_H = 1,9$ und ist bei einer $p_H = 6$ (durch $m/300$ Phosphatpufferlösung) stabil. Während etwa molare Konzentration einwertiger Ionen (NaCl-Lösung) zur Koagulation dieses Sols nötig sind, ist das Sol sehr empfindlich gegen höherwertige Kationen und wird bereits durch 0,025 molare $BaCl_2$ -Lösung ausgeflockt. Dieser Koagulationswert ist aber auch von der Teilchenzahl des Sols abhängig. Je größer diese ist, desto empfindlicher ist das Sol, so daß also ein z. B. 5fach stärker konzentriertes Lipoidsol bereits durch 0,7 molare NaCl-Lösung koaguliert werden kann. Um durch physiologische 0,85 proz. NaCl-Lösung, die 0,14fach molar ist, geflockt zu werden, muß das Lipoidsol bereits eine sehr erhebliche Teilchenkonzentration haben.

Wird nun einem Aqua dest.-Lipoidsol normales Serum zugesetzt und das Sol dann dem Einfluß verschiedener H-Ionen-Konzentration unterworfen, dann sieht man nach *Eagle*, wie das Gebiet der normalen Flockung durch den Serumzusatz nach der alkalischen Seite verschoben wird, damit auch der isoelektrische Punkt bei der Kataphorese (Fig. 6).

Schon ein Serumzusatz von 1:4000 genügt, um die Oberflächeneigenschaften der Lipoidteilchen erkennbar zu verändern. Mit der Serumkonzentration wächst die Verschiebung des Flockungsoptimums nach der alkalischen Seite. Das Maximum der Verschiebung des isoelektrischen Punktes liegt bei einer p_H von 4,9, der zwischen dem des Serumalbumins und des Serumglobulins liegt, wie es die Fig. 7 veranschaulicht.

Ist dieser Punkt erreicht, so nimmt *Eagle* an, daß die Lipoidteilchen komplett von Eiweiß umhüllt sind und somit auch die Oberflächeneigenschaften von Serumeiweiß angenommen haben. Bei weniger Serum ist die Ladung der Teilchen durch das Ausmaß der jeweiligen Umhüllung bestimmt. Aber trotz der Adsorption von normalem Serumeiweiß ist die Stabilität des Sols nicht verringert, im Gegenteil, der isoelektrische Punkt verschiebt sich zwar zu dem des adsorbierten Proteins, aber entfernt vom isoelektrischen Punkt ist die Lipoidsuspension eher noch stabiler geworden, denn das adsorbierte Eiweiß bleibt hydrophil und wirkt schützend, so daß es die normale Flockung des Lipoidsols in dessen eigenem isoelektrischen Punkt verhindert (Fig. 8).

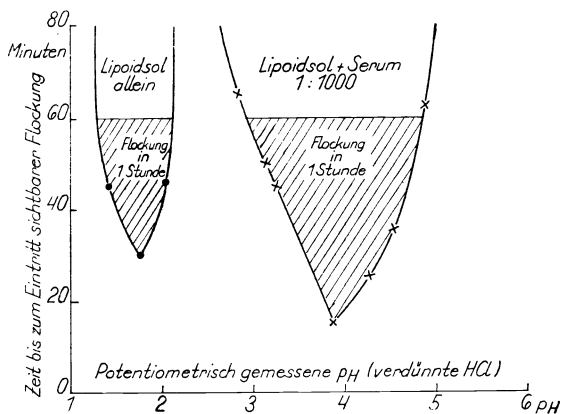


Fig. 8. Wirkung von normalem Serum auf die Flockungsfähigkeit eines Lipoidsols (nach *H. Eagle*).

Bei der normalen $p_H = 7,4$ des Serums wird zur Flockung durch NaCl gleichviel Elektrolyt benötigt, ob das Lipoidsol normales Serum enthält oder nicht. Bei Elektrolytkonzentrationen über $m/2$ wird vielleicht die Eiweißadsorption verhindert, so daß das ungeschützte Lipoid ausflockt.

Man sieht also, daß Zusatz von normalem Serum das kritische Potential¹⁾, den Koagulationswert von Elektrolyten, und somit die Stabilität eines Lipoidsols nicht ändert.

Wird nun zu einem Lipoidsol syphilitisches Serum zugesetzt, so wissen wir, daß im NaCl-haltigen Milieu unter geeigneten Bedingungen das Sol ausflockt (z. B. *Sachs-Georgi-Reaktion*). Das Serum hat durch diesen Vorgang seine charakteristische Eigenschaft als syphilitisches Serum verloren und den syphilitischen Antikörper, das Reagin, müssen wir in der Flockenmasse vermuten, die nachweislich aus 80—90 Proz. Lipoid und etwas (Globulin) Eiweiß besteht.

¹⁾ Je labiler das Sol, desto höher das kritische Potential, d. h. um so weniger braucht der Elektrolyt entladend zu wirken, um die Ladungsgrenze zu erreichen, die noch eben mit der Stabilität des Sols vereinbar ist. Sinkt die Teilchenladung unter diesen, deshalb kritisches Potential bezeichneten Wert, so setzt Koagulation ein.

Nun besteht zwischen den Globulinen des normalen Serums und den Globulinen des „Reagin“-haltigen syphilitischen Serums ein prinzipieller Unterschied, der, wie *Eagle* experimentell an seinem Lipoidsol zeigte, in der verschiedenen Reversibilität der Bindung an den Lipoidteilchen liegt. Während das an die Lipoidteilchen adsorbierte Normalserumglobulin leicht abwaschbar ist, ist das Immunglobulin viel fester gebunden und läßt sich, wie die Fig. 9 zeigt, selbst durch wiederholtes Waschen nicht ent-

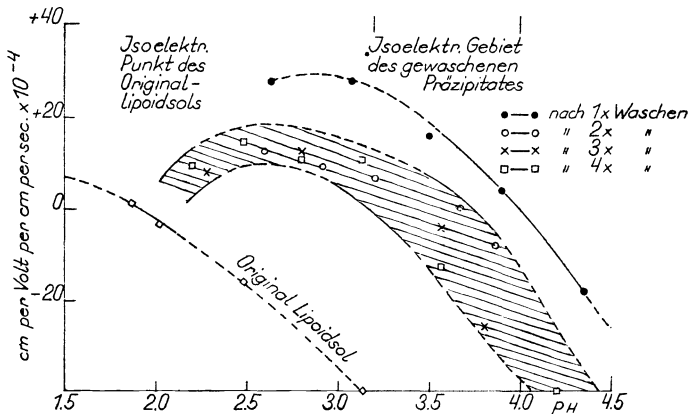


Fig. 9. Wirkung der Waschung auf die Oberflächeneigenschaften von mit Syphilis-Reagin beladenen Lipoidsolteilchen (nach *H. Eagle*). Die ausgezogenen Linien bedeuten Flockung.

fernen. Ferner erhöht das Immunglobulin im Vergleich zu normalem Globulin das kritische Potential von ca. 5 zu 10—15 Millivolt, wodurch der Lipoid-Immunglobulinkomplex relativ stark elektrolytempfindlich wird, so daß bereits 0,05 molare NaCl und 0,0025 m BaCl₂ ausfällend wirken.

Die Sensibilisierung des Lipoidsols gegen Elektrolyte, die Unlöslichkeit des adsorbierten Eiweißes, das kritische Potential von 10—15 Millivolt usw. sprechen für eine Art Denaturierung des Immunglobulins als Folge seiner (spezifischen) Adsorption an die Lipoidteilchen, wodurch diese die Oberflächeneigenschaften hydrophoben Globulins erhalten. Es ist also dies prinzipiell der gleiche Vorgang, wie wir ihn bei der spezifischen Agglutination, Präzipitation, Blutzellensensibilisierung usw. kennengelernt haben, und der ganz allgemein dem Mechanismus der Antigen-Antikörper-Verbindung entsprechen dürfte.

Wenn demnach die Annahme, daß die spezifische Bindung von einem Lipoidantikörper an eine Lipoidmizelle bedeutet, daß letztere eine Adsorptionshülle denaturierten Globulins erhält, so ist damit noch nicht

das Wesen der Wa. R. geklärt. Wir können heute mit Bestimmtheit sagen, daß die verschiedenartigen Trübungs-, Klärungs- und Flockungsreaktionen für die Luesdiagnose mit der Wa. R. eng wesensverwandt sind, insofern es dieselben A. A.-Komplexe sind, die entweder Komplement binden oder sich zu größeren Aggregaten zusammenballen und dann je nach den Versuchsbedingungen präzipitieren oder sich wieder auflösen können.

Die dafür maßgeblichen eigenartigen Beziehungen zwischen dem Lipidsol, den Elektrolyten und den Serumeiweißkörpern, die zuerst systematisch erforscht zu haben das Verdienst von *E. Meinicke* ist, sind in einigen interessanten Arbeiten von *J. Holker*¹⁾ unter anderen Gesichtspunkten zum Ausdruck gekommen. Da diese Arbeiten in Deutschland anscheinend wenig bekannt wurden, sei etwas ausführlicher an dieser Stelle darauf eingegangen.

Die bekannte *Klausner'sche* Reaktion, bei der durch Verdünnen eines luetischen Serums mit Aqua dest. und die damit verbundene Verringerung der Elektrolytkonzentration, das relativ lyophile labile Globulin zum Ausfällen gebracht wird, zeigt, daß bei Lues (aber auch bei anderen Erkrankungen usw.) das labile Globulin eine relative Mengenzunahme erfährt. Wird nun die Verdünnung von einem luetischen und normalen Serum anstatt mit Aqua dest.

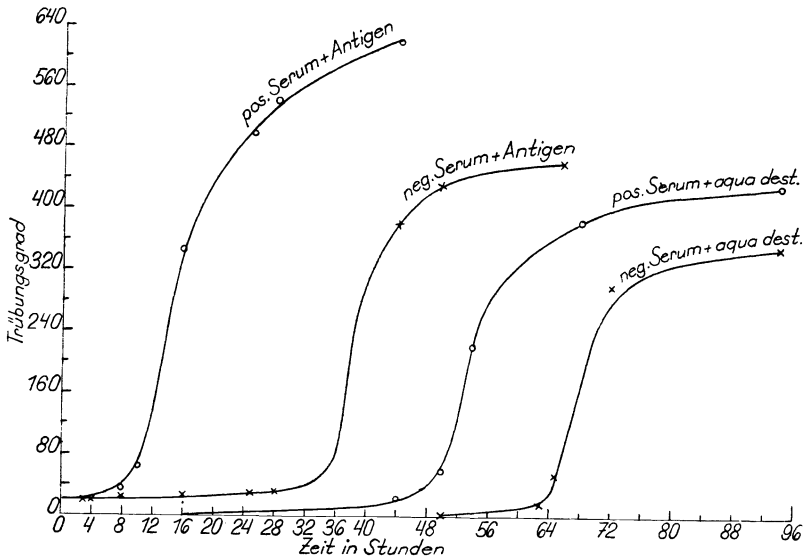


Fig. 10. Die Wirkung von inaktiviertem Serum auf Antigen (cholest. Rinderherz-extrakt) in Aqua dest., nach *J. Holker*, *J. of Path.* 25, 281 (1922).

¹⁾ *J. Holker*, *Journ. of Path.* 25, 281, 291; 26, 522 (1922).

mit einem Lipoidsol in Aqua dest. (es wurde alkoholischer chol. Rinderherzextrakt benutzt; auf die Bedeutung des Cholesterins wird später zurückzukommen sein) vorgenommen und die nun entstehende Trübung fortlaufend gemessen, dann erhält man nach *Holker* die folgende Figur (Fig. 10).

In der ersten Stunde (maßgebliche Zeit für die Wa. R.) ist noch nichts zu erkennen, dann nimmt die Trübung zu, beim syphilitischen Serum mehr wie beim normalen und mit Lipoidsol mehr wie ohne. Man beachte die Form der Kurven, auf die wir weiter unten noch zurückkommen. Das negative Serum hat auf das Lipoidsol eine gewisse Schutzwirkung ausgeübt, d. h. eine Dispersitätsverringering verzögert. Wird nun ein analoger Versuch unter dem Einfluß der für die übliche Wa. R. normalen NaCl-Konzentration gemacht, so erhielt *Holker* das folgende Kurvenbild (Fig. 11).

Die Kontrolle — Lipoidsol allein mit NaCl — zeigt eine starke und schnellfortschreitende Trübung. Aber die Sera zeigen charakteristische Unterschiede: Je stärker die Serumkonzentration ist, um so schneller ist bei syphilitischem Serum die Flockung, d. h. desto elektrolytempfindlicher ist der Lipid-Globulin-Komplex entsprechend den obigen Befunden von *Eagle*. Die Kurven für das syphilitische und normale Serum allein, ohne Lipoidsol, liegen nahe der Abszisse und sind nicht eingezeichnet. Nimmt die Serumkonzentration bei syphilitischem Serum ab, dann nimmt auch die Elektrolytsensibilisierung ab und hört bei etwa 1:80 Verdünnung auf. Bei weiterer Verdünnung nähern sich die Kurven mit syphilitischem Serum der Lipoidsol-Kontrollkurve.

Andererseits nähert sich die Kurve 1:80 des syphilitischen Serums der analogen 1:80-Kurve des normalen Serums. Da das normale Serum, wie wir in Fig. 10 sahen, schützt, so nimmt mit steigender Konzentration diese Wirkung zu, so daß sich die Reihenfolge der Kurven für das normale Serum umdreht. Mit sehr hoher Verdünnung nähert sich die Kurve für normales Serum der der Lipoidsolkontrolle.

Es scheint für das mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte syphilitische Serum ein Maximum der Schutzwirkung auf das Lipoidsol zu geben, und es ist

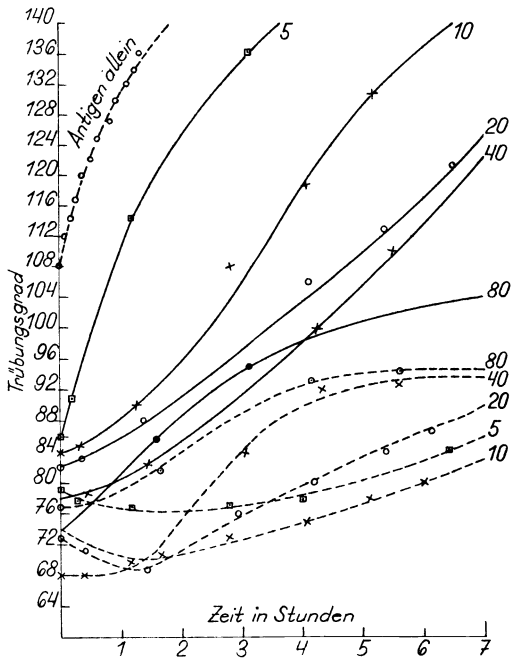


Fig. 11. Der Einfluß von inaktiviertem Serum (— = pos., ---- = neg.) auf Wa-Antigen (cholesterinierter Rinderherzextrakt) in 0,85 Proz. NaCl-Lösung. Die Zahlen an den Kurven bedeuten die Serumverdünnungen, nach *J. Holker*, Journ. of Path. 25, 281 (1922).

bemerkenswert, daß die Verdünnung, die diesem Maximum entspricht, diejenige ist, bei der man dieses syphilitische Serum gerade noch von einem normalen Serum unterscheiden kann. Die schützende Wirkung des normalen Serums, die bei 1:10 ebenfalls ein Maximum zu haben scheint, ist jedenfalls sehr viel erheblicher, als die maximale des syphilitischen Serums.

Die Kurven der Fig. 10 zeigen zwei Wendepunkte, die mit der Bildung der präzipitierenden Teilchen zusammenhängen. Zunächst bilden sich viele kleinste Teilchen, von denen sich aus Gründen der Verminderung der Grenzflächenspannung ein Teil wieder löst, um aus diesem Material die anderen Teilchen zu vergrößern. Dieses geschieht in dem ersten flachen Teil der Kurve. Die Zahl der Teilchen nimmt ab, obwohl ihre Größe zunimmt. Nach Erreichung einer gewissen Größe hört die Tendenz zur Wiederauflösung auf. Die Teilchen wachsen durch Apposition aus dem Medium schnell weiter und die Trübung nimmt fast linear zu. Dann beginnt im zweiten Wendepunkt der Kurve sich die Tendenz des Systems, die Grenzflächenspannung zu verringern, wieder bemerkbar zu machen und die Aggregation der Teilchen beginnt. Die Teilchenzahl nimmt ab, und die Teilchengröße nimmt weiter zu.

Dieser Vorgang in einem Lipoidsol wird nun durch Zusatz von Serum, sowie auch durch die Salzkonzentration des Mediums beeinflusst und aus den Arbeiten von *Holker* geht hervor, daß die aus Rücksicht der Blutzellenisotonie bei der Wa. R. benutzte NaCl-Konzentration von 0,85 Proz. = m/6,8 nicht für den physikalischen Reaktionsverlauf optimal ist, sondern daß es durchaus möglich ist, durch Änderung der NaCl-Konzentration Bedingungen zu finden, die eine schärfere Unterscheidung von syphilitischem und normalem Serum ermöglicht. Bekanntlich arbeiten manche Flockungsreaktionen mit höheren NaCl-Konzentrationen, z. B. *Meinicke's* Trübungs- und Klärungs-Reaktion, die Zitochol-Reaktion von *Sachs* und *Witebsky*.

Sehr wichtig für den Ablauf des Flockenbildungsvorganges ist nun die Art und Weise, wie das Lipoid-NaCl-Serum-System bezüglich der Reihenfolge und der Art der Verdünnung des benutzten alkoholischen cholesterinisierten Rinderherzextraktes angesetzt wird.

Holker setzte folgende drei Mischungen an:

- I. Zu 0,5 ccm unverd. Serum wurde 1,0 ccm NaCl-Lösung verschiedener Konzentration und dann 1,0 ccm des 1:20 möglichst schnell mit Aqua dest. verdünnten Extraktes zugefügt.
- II. Zu 0,5 ccm Serum wurde 1,0 ccm Aqua dest. und dann 1,0 ccm 1:20 verdünnten Extraktes gebracht, der mit NaCl-Lösung verschiedener Konzentration hergestellt war.
- III. Zu 0,5 ccm Serum wurde je 2,0 ccm 1:40 mit NaCl-Lösung verschiedener Konzentration verdünnten Extraktes gebracht.

In allen drei Systemen war demnach das Serum 1:5 und der Extrakt 50fach verdünnt. Wurde nun, nachdem diese Mischungen 4 Stunden lang bei 40° (unter öfterem Schütteln) gehalten waren, der Trübungsgrad gegen die NaCl-Konzentration graphisch dargestellt, so erhielt *Holker* bei Verwendung von 2 Seren, die eine verschieden starke positive Wa. R. gaben, die folgenden Kurven für die Mischung I (Fig. 12).

Die Kurven zeigen alle einen periodischen Verlauf mit einer zweifachen Dämpfung, nämlich bezüglich der Art des Serums und der NaCl-Konzentration. Die Trübung war am stärksten bei dem stark positiven Serum, wo auch die Oszillationen geringer sind. Mit steigender NaCl-Konzentration nimmt die Dämpfung zu.

Die sensibilisierende Wirkung des syphilitischen und die schützende des normalen Serums ging auch aus den Versuchen mit den beiden anderen Systemen

II und III hervor. Diese Kurven zeigten alle den gleichen Charakter, wie die von Extrakt allein unter dem Einfluß der in Betracht gezogenen Konzentrationen von NaCl und sprechen dafür, daß, wenn die Extraktverdünnung einmal mit NaCl-Lösung gemacht ist, das Serum scheinbar keine schützende Wirkung auf die weitere Aggregation der Lipoidteilchen mehr auszuüben vermag.

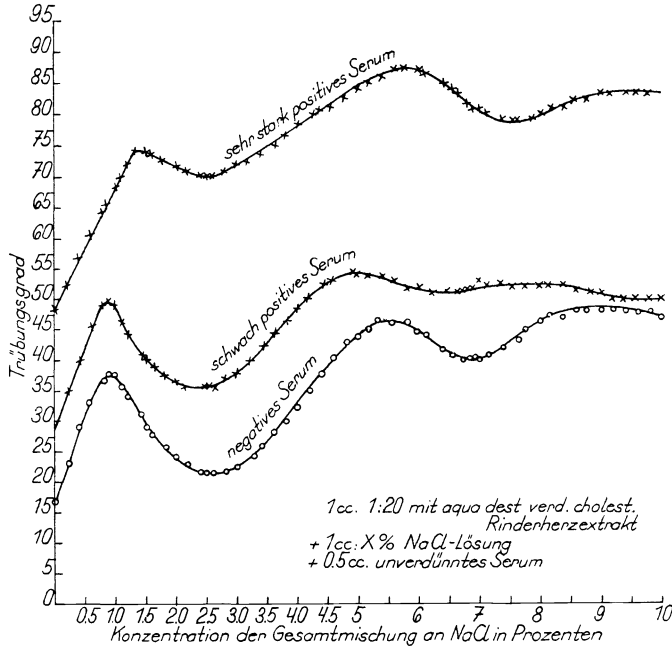


Fig. 12. Periodische Trübung einer Mischung von Serum und Wa-Antigen bei steigendem NaCl-Gehalt, nach J. Holker, Journ. of Path. 25, 291 (1922).

Auffallend war der periodische Verlauf der Kurven in Fig. 12, und J. Holker¹⁾ ist nun in weiteren Versuchen der Ursache dieser Periodizität nachgegangen. In dem Konzentrationsbereich bis 1,5 Proz. NaCl zeigte der Extrakt allein keinen periodischen Trübungsverlauf, wohl aber, wie die folgende Fig. 13 zeigt, bei stärkeren NaCl-Konzentrationen bis über 30 Proz. Hier traten zwei Perioden auf. Bei den stärkeren Extraktverdünnungen ($> 1/100$) war das Aussehen der Suspension bei den Maxima sehr verschieden von dem bei den Minima, insofern beim Maximum Klärung durch Präzipitation eintrat, die beim Aufschütteln eine stärkere Trübung gab wie die beim Minimum, die als solche bestehen blieb. Interessant ist die übereinstimmende Lage der Maxima und Minima.

Wird nun unter gleichen Bedingungen Serum, das vorher $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt war, im Verhältnis 1:5 mit Lösungen von steigendem NaCl-Gehalt untersucht, so erhielt Holker das Bild der Fig. 14. Hier ist die Periodizität sehr viel mehr ausgeprägt und kommt bei sehr viel geringerer NaCl-Konzentra-

¹⁾ Holker, Journ. of Path. 25, 522 (1922).

tion zum Ausdruck. Vergleicht man den Konzentrationsbereich von NaCl zwischen 1—10 Proz., so gibt Serum vier Oszillationen von ziemlich gleichem Ausmaß, das Lipoidsol (Extrakt) allein nur ein Maximum und Lipoidsol-Serum-Mischung zwei Oszillationen. Das Lipoidsol wirkt also hemmend auf die Periodizität des Serums und der Lipoidsolserumkomplex hat nicht nur eine, gegenüber Serum oder Extrakt allein, verschiedene Zahl von Oszillationen, sondern deren Amplitude und Wellenlänge ist verschieden, was dafür zu sprechen scheint, daß sich der Lipoidserumkomplex als Individuum verhält (*Holker*).

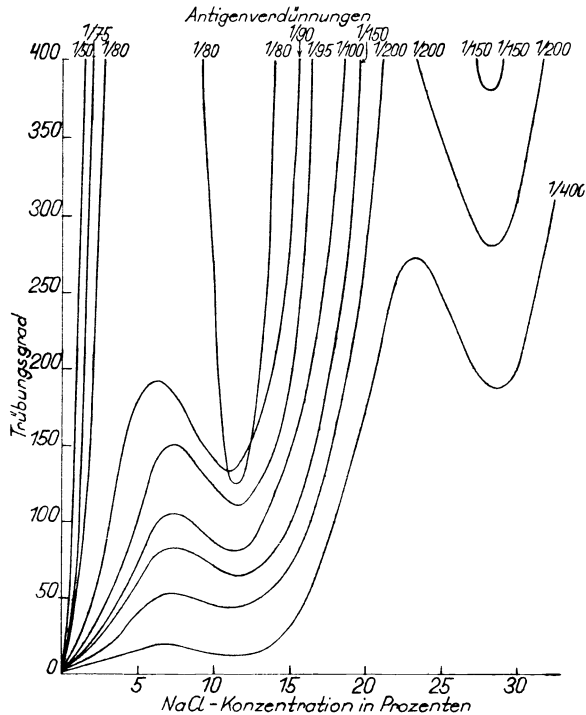


Fig. 13. Periodische Trübung eines cholesterinierten Rinderherzextraktes (Wa-Antigen) in verschiedenen Verdünnungen mittels NaCl-Lösung steigender Konzentration, nach *J. Holker*, Journ. of Path. **25**, 522 (1922).

Worauf in letzter Linie die von *Holker* beobachtete Periodizität beruht, ist mit Sicherheit noch nicht zu sagen. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß das Euglobulin des Serums einerseits und der peptisierende Einfluß von Elektrolyten auf lyophobes Globulin andererseits dafür verantwortlich zu machen sind. Jedenfalls wären weitere Untersuchungen dieser Erscheinungen bei variiertem H-Ionenkonzentration und bei verschiedenen Kationen von größtem Interesse, da dieselben grundlegend

für die Kinetik aller zur Diagnose der Lues benutzten Ausflockungsreaktionen zu sein scheinen.

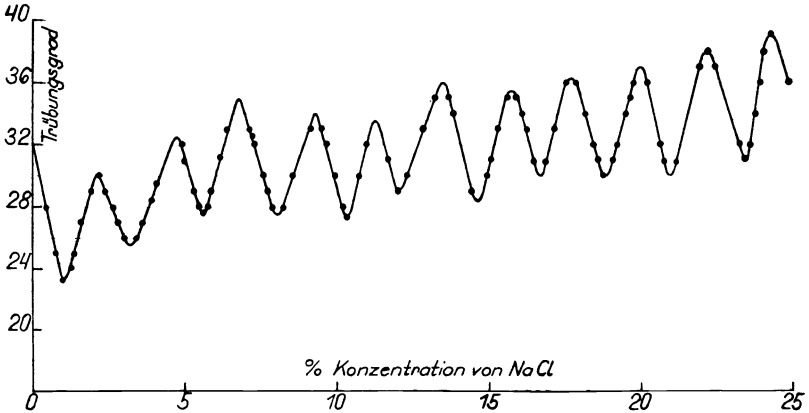


Fig. 14. Periodische Opaleszenz von inaktiviertem, 1:5 verdünntem Menschenserum mit steigender Konzentration von NaCl, nach J. Holker, Journ. of Path. 25, 522 (1922).

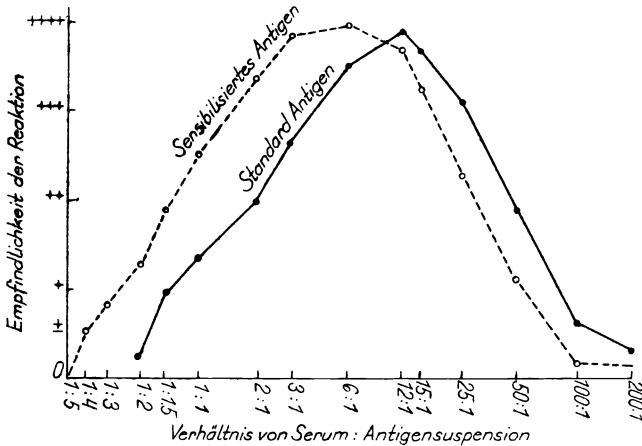


Fig. 15. Nach Nishio und McDermott, Journ. of inf. Dis. 46, 435 (1930).

Die Steigerung der Empfindlichkeit der Ausflockungsreaktionen durch Erhöhung der Salzkonzentration wird jetzt von fast allen Flockungsmethoden benutzt, Sachs und Witebsky, Meinicke, Kahn usw. Ein instruktives Beispiel dafür geben Nishio und Mc. Dermott¹⁾, die das Standard-

¹⁾ Nishio und Mc Dermott, Journ. inf. Dis. 46, 435 (1930).

antigen für die Kahnreaktion, bei dem 1 ccm mit 1,2 ccm Salzlösung gemischt wird, mit dem gleichen Antigen vergleichen, von dem 1 ccm mit 2 ccm Salzlösung gemischt wird, mit dem Ergebnis der folgenden Fig. 15.

Im ganzen sind die Präzipitationszonen der beiden Antigene ähnlich aber nicht identisch. Die Zone des durch Salz stärker sensibilisierten Antigens ist größer. Relativ große Mengen des sensibilisierten Antigens geben empfindlichere Reaktionen als entsprechende Mengen des Standardantigens, aber letzteres gibt schärfere Reaktionen, wenn die Serummenge im Verhältnis zur Antigenmenge überwiegt.

b) Die Komplementbindung.

Das Lipoidsol in der Form, in der es in den weiter oben erwähnten Versuchen von *Eagle* benutzt wurde, vermag allein kein Komplement zu adsorbieren, wohl aber kann es aus normalem Serum Globuline adsorbieren, aber diese Verbindung ist locker und (wie wir gesehen haben, durch Waschen) reversibel. Das normale Globulin bleibt in dieser Verbindung hydrophil, und demzufolge vermag der Lipoid-Normalglobulinkomplex ebenfalls kein Komplement zu adsorbieren. Der Lipoid-Immunglobulinkomplex ist aber fähig, Komplement zu adsorbieren, weil seine Oberfläche aus relativ hydrophobem Globulin besteht.

Bekanntlich werden die Sera für die Wa. R., wie man sagt, inaktiviert, d. h. $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt, um den Seren das Eigenkomplement zu nehmen, was in menschlichen Seren verschieden stark vorhanden ist und bei evtl. Überschub die Reaktion stören könnte. Nach den Untersuchungen von *Lecomte du Nouy*¹⁾ ist 56° eine für die normale Serumstruktur kritische Temperatur und die physikalischen Änderungen, die die Eiweißkörper des Serums bei 56° erleiden, sind höchstwahrscheinlich auch verantwortlich für die Inaktivierung der Komplementfunktion. Das für den Ablauf der Wa. R. wesentlichste bei der Erhitzung auf 56° dürfte eine gewisse Hitzedenaturierung der Serumglobuline sein. Diese bewirkt, daß die Globuline stabiler werden, wie man annehmen darf, durch eine vermehrte Wasserbindung. Diese Hitzedenaturierung ist ganz anderer Art wie die dehydratisierende Wirkung durch Adsorption. Bei 56° ist jedenfalls die Hitzedenaturierung des Immunglobulins noch nicht soweit fortgeschritten, daß dessen Adsorption an eine Lipoidphase oder ganz allgemein an das betreffende Antigen, nicht noch einen genügenden dehydratisierenden Einfluß ausüben kann, so daß der A. A.-Komplex noch Komplement zu adsorbieren vermag. Andererseits ist das labile Globulin des Serums durch 56° genügend verändert, daß es weder allein, noch unspezifisch gebunden, Komplement binden kann. Wird aber durch höheres Erhitzen auf 63 — 65° die Hitzedenaturierung des Immunglobulins weiter getrieben, dann kann, selbst wenn die der Spezifität zugrunde liegende chemische Affinität zum Antigen noch erhalten ist,

¹⁾ *P. Lecomte du Nouy*, Ann. Inst. Past. **42**, 742 (1928); **43**, 749 (1929); **44**, 109 (1930); Compt. rend. Soc. Biol. **101**, 359 (1929); **104**, 146, 289, 377 (1930); **106**, 352 (1931); Compt. rend. Acad. Sciences **188**, 660 (1929); Science **72**, 224 (1930); **73**, 595 (1931).

so daß eine A. A.-Bindung erfolgt, das Immunglobulin durch die Adsorption nicht mehr genügend dehydratisiert oder allgemein im Sinne der Hydrophobie denaturiert werden, daß es Komplement zu binden vermag. Daher macht Erhitzen auf 62—65° jedes bei der Wa. R. positiv reagierende Serum negativ.

Nun kann man sowohl das Lipoidsol, d. h. die Extraktverdünnung für sich, wie auch das syphilitische Serum für sich auf 56° erhitzen, ohne den positiven Ausfall der Wa. R. zu hindern. Erhitzt man aber nach vorheriger Vereinigung von Extrakt und Serum den dadurch entstandenen A. A.-Komplex auf 56°, dann verliert er in jedem Fall seine Fähigkeit, Komplement zu adsorbieren, weil wahrscheinlich das Erhitzen auf 56° das bereits durch die Adsorption denaturierte Immunglobulin so verändert, als sonst das nicht adsorbierte Immunglobulin erst bei Temperaturen über 62° verändert wird. Es sieht mit anderen Worten so aus, als ob die Erhitzung auf 56° den Dehydratationseffekt der Adsorption durch eine vermehrte Wasserbindung wieder aufgehoben hat, so daß das Globulin nicht mehr zur Komplementbindung befähigt ist.

Was für die Mischung von Lipoidsol-Serum beim Erhitzen auf 56° gilt, besteht auch nach *Eagle's* Versuchen zu Recht für den präzipitierten Lipoidsol-Immunglobulinkomplex. Dieser verliert nach Erhitzen auf 56° und höher seine komplementbindende Fähigkeit, erhält sie aber wieder nach Kontakt mit syphilitischem Serum. Vergleicht man nach *Eagle* Suspensionen von

I. Lipoidsol—Normalserum—Flocken

II. Lipoidsol—Syphil. Serum—Flocken (mehrmals gewaschen),

so lassen sich folgende Unterschiede feststellen:

I. Flocken können trotz Adsorption der Globuline von normalem Serum kein Komplement binden, wohl aber Reagin-Immunglobulin aus syphilitischem Serum und dann Komplement. Erhitzt auf 56° können sie kein Komplement binden, wohl aber Reagin und dann Komplement.

II. Flocken können wegen Adsorption von Globulin aus syphilitischem Serum Komplement binden, aber keine weiteren Reagine mehr aus frisch zugesetztem syphilitischem Serum. Erhitzt auf 56° können sie nicht mehr Komplement binden, wohl aber wieder Reagin und dann Komplement.

Ähnliche Feststellungen konnten auch von *A. Stern*¹⁾ bei *Sachs* erhoben werden.

Kahn u. a. haben zeigen können, daß für die Empfindlichkeit der Wa. R. eine optimale Lipoid-Antigenkonzentration nötig ist, d. h. daß zwischen der Menge von Reagin im Serum und der Antigenmenge, wie bei allen Präzipitationen, gewisse quantitative Beziehungen bestehen müssen, die, wie *Dean* (S. 90) gezeigt hat, bei der sichtbaren Präzipitation und der Komplementbindung

¹⁾ *A. Stern*, Ztschr. Immunitätsforsch. 63, 277 (1929).

nicht das gleiche Optimum haben. *Nishio*¹⁾ fand, daß bei Verwendung der Globuline des syphilitischen Serums anstatt des gesamten Serums das Optimum der Lipoidantigen-Konzentration gleich bleibt, wie die Fig. 16 zeigt, die Emp-

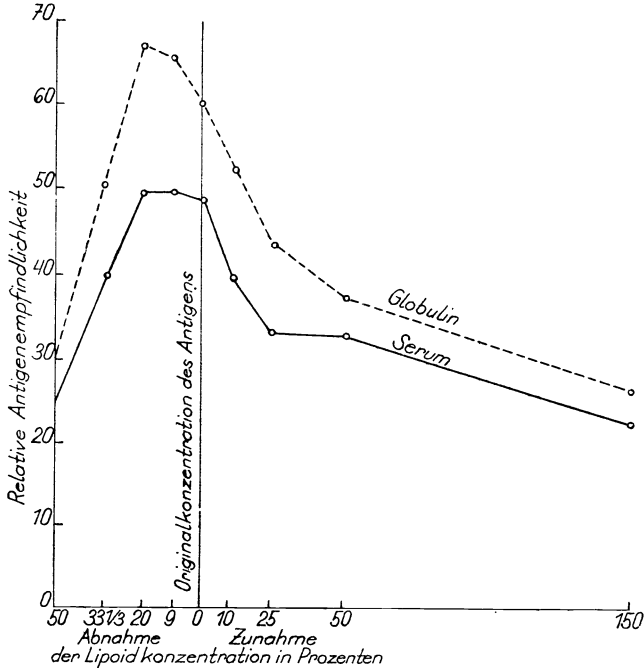


Fig. 16. Einfluß der Lipoidkonzentration auf die Empfindlichkeit der Wa. R. mit einem syphilitischen Serum und mit dessen Globulin, nach *Nishio*, Journ. inf. Dis. 46, 420 (1930).

findlichkeit der Reaktion aber vergrößert wird. Auch ist damit eine Bestätigung der schon von vielen früheren Autoren gefundenen Tatsache gegeben, daß das Reagin des syphilitischen Serums, wie alle Antikörper, im Globulin des Serums sich befindet.

c) Rolle des Cholesterins.

Bekanntlich wird den alkoholischen Organextrakten Cholesterin zugesetzt, um sie empfindlicher für die Wa. R. zu machen, obwohl Cholesterin selbst kein oder nur sehr wenig Komplement zu binden vermag. Das Organlipoid des Extraktes, das dem Lezithin analog ist, hat eine viel höhere Affinität für Wasser, da ja bekanntlich eine alkoholische Lipoidlösung mit Wasser ein stabiles Lipoidsol liefert. Cholesterin fällt in Wasser sofort in Kristallen aus. Wenn Cholesterin aber zusammen mit alkoholischer Lipoidlösung in Wasser gebracht wird, so entsteht ein Sol mit

¹⁾ *Nishio*, Journ. inf. Dis. 46, 420 (1930).

größerer Opaleszenz und, wie *Eagle*¹⁾ zeigen konnte, mit mehr und auch größeren Teilchen. Dabei haben sich nach *Eagle* weder die Elektrolyt-empfindlichkeit noch der isoelektrische Punkt des Lipoidsols durch den Cholesterinzusatz geändert, so daß es so aussieht, als ob das Cholesterin in dem Augenblick, als es mit der alkoholischen Lipoidlösung mit Wasser in Berührung kommt, ausfällt und als Kern für eine Umhüllung mit Lipoid dient, wodurch die Soleigenschaften nun durch das Lipoid bestimmt werden.

Eagle konnte weiter zeigen, daß manche andere alkohollösliche und wasserunlösliche Stoffe, wie z. B. Phenylsalizylat, Benzophenon, Äthylstearat u. a., Lipoiden gegenüber die gleiche Rolle wie das Cholesterin spielen können, sofern nur für diese Stoffe gilt, daß die Grenzflächen-spannung

$$p \text{ Substanz/Wasser} > (p \text{ subst./Lipoid} + p \text{ Lipoid/Wasser}).$$

Andererseits lassen sich Cholesterin und die obengenannten Stoffe auch durch andere Stoffe, wie z. B. Serum, Na-Oleinat, gallensaure Salze usw., in stabile Lösung bringen.

Der Cholesterinzusatz bewirkt eine Zunahme der im Dunkelfeld sichtbaren Lipoidteilchen und ferner ein Größerwerden der einzelnen Teilchen²⁾. Steigender Cholesterinzusatz führt zu steigender Trübung, bis schließlich erst mikroskopische Aggregation, dann sichtbare Flockung erfolgt.

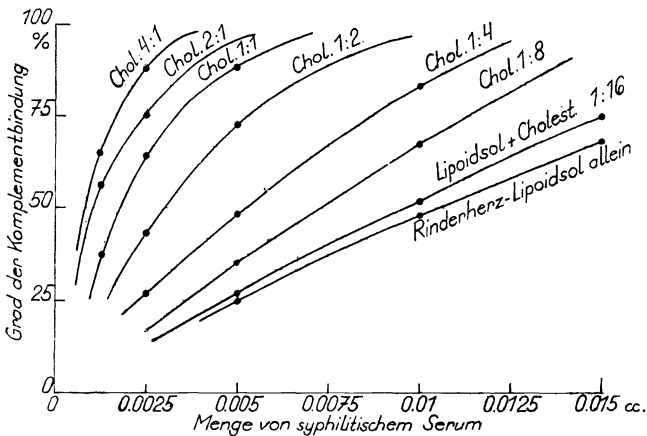


Fig. 17. Einfluß von Cholesterin auf die Wirksamkeit des Antigens in der Wa. R., nach *H. Eagle*, Journ. exper. Med. 53, 605 (1931).

¹⁾ *Eagle*, Journ. exper. Med. 52, 747 (1930).

²⁾ *G. F. de Gaetani*, Ztschr. Immunitätsforsch. 69, 277 (1930), nimmt eine Aktivierung der Lipoide des Extraktes durch Cholesterin an, ohne aber über den Mechanismus der Aktivierung genauere Angaben zu machen.

Bei der Auffassung der Komplementbindung als eine Adsorption an die Lipoid-Globulinteilchen wäre zu erwarten, daß sie mit Zunahme der Gesamtoberfläche größer würde, aber bekanntlich haben *Sachs* und *Rondoni* bereits gezeigt, daß die für die Komplementbindung optimalste Lipoidherstellung nicht diejenige mit dem höchsten Dispersitätsgrad ist. Vielmehr scheinen die größeren Teilchen ein größeres Bindungsvermögen für die Reagine des syphilitischen Serums zu besitzen, und die Teilchenvergrößerung ist es wohl, wodurch der Cholesterinzusatz die Empfindlichkeit eines Extraktes für die Wa. R. steigert. Aus der Fig. 17 von *Eagle* geht sehr deutlich hervor, wie mit steigendem Cholesterinzusatz die zur 50proz. Komplementbindung nötige Serummenge von 0,01 ccm Serum beim Extrakt allein bis zum 4.—5. Teil abnimmt, wenn der Extrakt mit Cholesterin 4:1 versetzt ist, d. h. da der benutzte alkoholische Rinderherzextrakt 1,6 Proz. Trockensubstanz enthält, so entspricht in diesem Falle das Verhältnis 4:1, von Cholesterin zur Trockensubstanz einem Gehalt von 6,4 Proz. Cholesterin. Man sieht also, daß die Wirkung von Cholesterin auf die Partikelgröße des Antigens und damit auf die Empfindlichkeit der Wa. R. nicht bei dem in der Praxis üblichen Verhältnis von etwa 0,05—0,2 Proz. Cholesterin aufhört, sondern weit über dieses Verhältnis hinausgeht. Die Grenze ist durch die Alkohollöslichkeit des Cholesterins gegeben. Daher bestand die Aussicht, durch den Ersatz des Cholesterins durch andere Stoffe mit besserer Alkohollöslichkeit zu wirksamerem Antigen für die Wa. R. zu gelangen und in Verfolgung dieser Möglichkeit fand *Eagle*¹⁾ in dem Sitosterol (ein aus dem nicht verseifbaren Anteil des Weizensamens erhaltenes Sterol) eine sehr geeignete Substanz.

Eagle stellte sich zunächst ein konzentriertes Lipoidantigen her. Ein trockenes Rinderherzpulver wurde nach vorausgegangener 15 Minuten langer Extraktion mit dem 5fachen Volumen Äther drei Tage lang mit 95proz. Alkohol ausgezogen und filtriert. Der Rückstand wird zweimal mit $\frac{1}{5}$ seines Volumens Alkohol gewaschen, filtriert und die vereinigten Filtrate auf dem Wasserbad soweit eingengt, daß 2,5—3 ccm Lösung auf 1 g der Lipoid-Trockensubstanz kommen. Zu dieser konzentrierten Lipoidlösung wird 0,6 Proz. Sitosterol zugesetzt (in Substanz zugesetzt und vor Gebrauch in der Wärme gelöst) und zum Gebrauch die NaCl-Lösung schnell dem Antigen zugefügt. Dieses konzentrierte Antigen war so empfindlich, daß auf Rinderherzlipoid umgerechnet 0,0000005 g des Lipoids genügten, um mit einem syphilitischen Serum eine positive Komplementbindungsreaktion zu geben.

d) Der Antikörper bei der Wa. R.

Wir können auf Grund aller dieser Untersuchungen annehmen, daß das wesentliche bei der Wa. R. die primäre Reaktion zwischen den Lipoidteilchen und dem Immunglobulin ist. Das weitere ist nur ein von ver-

¹⁾ *Eagle*, Journ. of exper. Med. 53, 605 (1931).

schiedenen optimalen Bedingungen abhängiges physikalisch-chemisches Geschehen.

Für die Komplementbindung ist optimal eine p_H von 5,8—8,2, eine NaCl-Konzentration von 0,07—0,25 molar. Auf beiden Seiten dieser Zone ist die Komplementbindung gehemmt. Die Komplementbindung ist nur wenig beeinflusst durch das Volumen des Reaktionsgemisches, durch Schütteln, aber völlig aufgehoben durch geringe Konzentrationen zweiwertiger Kationen, durch Temperatur über 40° usw.

Dagegen ist die Flockung der A. A.-Komplexe optimal bei p_H 3,5 (\pm 0,5) (*Eagle*) stark durch Schütteln beschleunigt, durch Verringerung des Gesamtvolumens sowie durch zweiwertige Kationen und durch Temperaturen bis 56° begünstigt.

Es ist demnach nur von äußeren Milieubedingungen abhängig, ob der A. A.-Komplex Komplement bindet oder zur Flockung gebracht wird, und wenn daher den mannigfachen Flockungs-, Trübungs- und Klärungsreaktionen für die Luesdiagnose im Grunde der gleiche Reaktionsmechanismus zwischen Antigen und Antikörper zugrunde liegt, wie bei der Wa. R., und somit alle Reaktionen den gleichen Antikörper im syphilitischen Serum nachweisen, so liegt es gerade in der Natur der verschiedenen Milieueinflüsse, daß die Wa. R. nicht durch die anderen Reaktionen ersetzt wird, sondern, wie vielfältige sichere Erfahrungen gezeigt haben, ergänzt wird. Es gibt bekanntlich viele positive Sera, die nicht in allen Reaktionen positiv sind, und selbst die empfindlichste Reaktion erfaßt nicht 100 Proz. der positiven Sera. Daher bilden die Flockungsreaktionen eine wertvolle Ergänzung, da ihre Kombination mit der Wa. R. die Sicherheit des serologischen Luesnachweises erheblich steigert.

Auf die einzelnen Flockungsreaktionen soll hier nicht weiter eingegangen werden, da ihr Prinzip unter anderem aus den oben angeführten Arbeiten von *Holker* hervorgeht.

Auf Grund der Arbeiten von *Landsteiner*, *Sachs* und ihren Schülern nimmt man an, daß die Wa. R. wie auch die zur Syphilisdiagnose benutzten Ausflockungsreaktionen auf dem Nachweis von Lipoidantikörpern beruht. Aber scheinbar paradox ist der Umstand, daß das Antigen, mit dem das syphilitische Serum *in vitro* reagiert, im Körper überall und selbst im Serum vorhanden ist. Man könnte daher theoretisch eine Autopräzipitation im Blute bei Syphilis erwarten, und man hat, allerdings ohne es beweisen zu können, das Auftreten der Hauteruption im sekundären Stadium der Syphilis damit in Verbindung gebracht. Es ist aber zu beachten, daß die Lipoide, die *in vitro* als Antigen dienen, aus ihrem natürlichen Zusammenhang mit Eiweiß gebracht sind, und es liegt nahe anzunehmen, daß die mit Eiweiß verbundenen Lipoide, wobei das Lipoid völlig maskiert und, wie im Serum, in Lösung sein kann, eine Adsorption von Immunglobulin im syphilitischen Blut nicht erlauben. Einen besonderen Schutz-

stoff, der eine Autopräzipitation in vivo verhindert, anzunehmen, dürfte sich erübrigen [*Kahn, Mallory und Nishio*¹⁾].

Die Kernfrage ist jetzt, was haben diese Lipoide, selbst wenn die Annahme, daß im Blute Syphilitischer gegen sie gerichtete spezifische Antikörper existieren, zu Recht besteht, mit der *Spirochäta pallida* zu tun? Sind die Antilipoide desluetischen Serums für Syphilis charakteristisch oder spezifisch und durch welchen Zusammenhang?

Wenden wir uns zunächst der Annahme von *Sachs* u. a. zu, daß imluetischen Blut Lipoidantikörper vorhanden sein sollen, so kann man mit Recht fragen, ob die beobachteten in-vitro-Erscheinungen sich nicht doch ohne Annahme spezifischer A. A.-Reaktionen, rein physikalisch erklären lassen. Und man muß zugeben, daß dies in weitgehendem Maße der Fall ist, weil — und darin liegt die Schwierigkeit der experimentellen Forschung auf diesem Gebiete — es eine Menge unspezifischer Einflüsse auf die Globuline des Serums gibt, die diesen, besonders im Verein mit der komplementbindenden Eigenschaft der Lipoidantigene allein, einen solchen antikomplementären Charakter im Sinne einer relativen Dehydratation verleihen, daß sich solche Sera bei der Wa. R. wieluetische Sera verhalten.

Eine positive Wa. R., die aber bezüglich der Stärke der echten syphilitischen erheblich nachsteht, können mehr oder minder regelmäßig die inaktivierten Sera erwachsener Kaninchen, Rinder, Schafe, Pferde, Mäuse, Katzen, Hunde, Makaken und Schweine geben. Eine schwach positive Reaktion zeigen Sera wilder Ratten und eine negative Reaktion geben die inaktivierten Sera von Mensch, weißer Ratte, Meerschweinchen und Frosch. Bei Kaninchen, Rind, Schaf und Pferd ist auch die Flockungsreaktion (*Sachs-Georgi*) positiv, bei den übrigen Tieren nicht regelmäßig [*Mackie und Watson*²⁾]. In allen diesen Fällen nimmt man keine Autolipoidantikörper an, deren Vorhandensein dann mehr oder weniger gezwungen zu erklären wäre, sondern antikomplementäre Eigenschaften gewisser Labil-Globuline. *Sachs* hat gezeigt, daß solche unspezifischen Reaktionen, darunter auch die Eigenhemmung, zum Verschwinden gebracht werden können durch Behandlung der Sera mit verd. HCl und Entfernen der auf diese Weise ausgefallenen Labil-Globuline. Andererseits ist durch *Sachs* bekannt, daß Sera, die an und für sich eine negative Wa. R. geben, positiv werden können durch leichtes Ansäuern, z. B. mittels 1:1500 verd. Essigsäure nach *Mc Means*³⁾, sowie daß positive Sera durch Alkali negativ gemacht werden können. Aber die Auffassung, daß das Wesen der positiven Wa. R. sich allein durch eine Dominanz der H-Ionen im Serum erklären läßt, wie u. a. *A. Kahn*⁴⁾ annimmt, wird der Schwierigkeit des Problems nicht gerecht. Das gleiche gilt für die Annahme, daß die Ursache der positiven Wa. R. eine Vermehrung der Ca-Ionen imluetischen Serum ist (*Pietravalle* 1922).

Sehr viel schwerwiegender für die Möglichkeit, die Reaktion zwischen syphilitischem Serum und Organlipoiden rein physikalisch zu deuten,

¹⁾ *Kahn, Mallory und Nishio*, Journ. inf. Dis. **46**, 413 (1930).

²⁾ *Mackie und Watson*, Journ. of Hyg. **25**, 176 (1926).

³⁾ *Mc Means*, Journ. of Immun. **8**, 433 (1923).

⁴⁾ *A. Kahn*, Amer. Journ. Syph. **10**, 489 (1926).

sind die Erfahrungen, daß zum Zustandekommen einer der Wa. R. durchaus analogen Komplementbindungsreaktion mit syphilitischem Serum auch Substrate genügen, die sicher keine Lipide enthalten.

Bekanntlich vermag in einer gewissen Zahl von Fällen reiner Alkohol und in einem den Ergebnissen der Original-Wa. R. sehr nahe kommenden Prozentsatz Phenolalkohol [*Ninni* und *Molinari*¹⁾, *H. Gross*²⁾] den Organlipidextrakt zu ersetzen. Eine eingehende Analyse³⁾ der Phenolalkoholwirkung zeigte, daß diese bei der benutzten Phenol- und Alkohol-Konzentration nur ein Glied in einer zusammenhängenden Kette der Wirkung von Phenol allein und Alkohol allein auf das syphilitische Serum ist, so daß die Reaktion durch rein physikalische Einflüsse auf das Serumglobulin erklärbar ist. Andererseits besteht aber die Ansicht von *Sachs*⁴⁾ zu Recht, daß Phenol imstande ist, die Lipidbindung in der Globulinmizelle zu lockern und somit Lipide aus dem Eiweißverband zu lösen, so daß also bei Benutzung von Phenolalkohol als „Antigen“ reaktionsfähige Lipide vorhanden sind. Diese Versuche mit Phenolalkohol bringen uns daher in unserer Erkenntnis der wahren Rolle der Lipide bei der Wa. R. nicht näher, denn Alkohol kann ganz aus dem Reaktionsmilieu verschwinden, ohne die Wa. R. zu beeinträchtigen, und Phenol bringt eine Aktivierung der Serumlipide mit sich.

Nun haben aber *Silber* und *Friese*⁵⁾ eine Paraffinemulsion benutzt, deren Partikelgröße, wie auch die der üblichen Wassermannextraktemulsionen zwischen 0,4 und 3 μ liegt, und konnten mit dieser als Extrakt bei der Wa. R. mit menschlichem wie auch mit Kaninchenserum gleiche Ergebnisse erhalten wie mit Lipidextrakten. $\frac{1}{2}$ proz. Gelatine, die an und für sich niemals Komplement bindet, verhält sich ebenfalls in der Komplementbindungsreaktion der Lipidemulsion gegenüber bei Kaninchenserum (nicht bei Menschenserum) qualitativ und quantitativ völlig analog. Die Ergebnisse werden mit solchen verglichen, die *Seligmann* 1907 beim Vermischen zweier kolloider Systeme, Mastix und Gelatine, hatte; obwohl jedes für sich in doppelter Menge die Hämolyse nicht hemmte, gab die Mischung deutliche Hemmung. Da nun Mastix mit Kaninchenserum und ferner auch Gelatine mit Lipidemulsion mit dem gleichen Effekt einer Hemmung vertauscht werden können, und da andererseits Paraffin und Gelatine nichts mit Lipoid zu tun haben, so schließen die Autoren, daß es bei der Wa. R. nur auf den physikalisch-chemischen Zustand und nicht auf die chemische Natur des Antigens ankommt.

Ferner fand *C. J. Bothwell Voge*⁶⁾, daß sich in ihrem Fällungsvermögen für Benzöharzsol normale und syphilitische Sera unterscheiden. Ähnliche Feststellungen haben bereits *Brossa*, *Freundlich* sowie *Reitstötter*⁷⁾ und letzthin *v. Mutzenbecher*⁸⁾ u. a. bei Eisenhydroxydsolen gemacht, die Unterschiede zwischen dem Sensibilisierungsvermögen normaler und Immunglobuline ergaben. Hier bestehen engste Zusammenhänge mit den Liquorreaktionen gegenüber Goldsol, Mastix, Kongorot, Siliquid und anderen Solen, die rein physikalisch-chemischer Natur sind und bei denen niemand eine Mitwirkung von spezifischen Antikörpern annimmt.

¹⁾ *Ninni* und *Molinari*, Zbl. Bakt. **104**, 502 (1927).

²⁾ *H. Gross*, Med. Klin. **1928**, Nr. 51.

³⁾ *H. Schmidt* und *H. Gross*, Unveröffentlichte Versuche.

⁴⁾ *H. Sachs* und *G. Sollazzo*, Zbl. Bakt. **112**, 325 (1929).

⁵⁾ *Silber* und *Friese*, Ztschr. Immunitätsforsch. **42**, 425 (1925).

⁶⁾ *C. J. Bothwell Voge*, Biochemic. Journ. **23**, 1137 (1929).

⁷⁾ *Reitstötter*, Ztschr. Immunitätsforsch. **30**, 468, 507 (1920).

⁸⁾ *P. v. Mutzenbecher*, Biochem. Ztschr. **243**, 100, 113 (1931).

Da wir nun wissen, daß Aggregate, sofern sie geeignete Grenzflächen haben, je nach den Versuchsbedingungen Komplement binden oder agglutinieren und präzipitieren können, so besteht vom kolloidchemischen Standpunkt aus keine prinzipielle Trennung zwischen der Fähigkeit eines syphilitischen Liquors, ein Gold- oder Mastixsol zu präzipitieren und der Fähigkeit eines syphilitischen Serums, ein Sol von Benzoëharz, Paraffin oder Lipoid zu präzipitieren, und man könnte daher wohl zu der Auffassung kommen, daß auch die Wa. R. zunächst nichts anderes darstellt als eine von vielen Möglichkeiten, die Fähigkeit gewisser Globuline des Serums zum Ausdruck zu bringen, die in einer besonderen Eignung zur Adsorption an geeignete lyophobe Grenzflächen besteht. Nur wäre dann die Aufgabe zu erklären, wieso gerade das syphilitische Serum Globuline mit dieser besonderen Eignung besitzt. Andererseits ist dadurch, daß eine Komplementbindung oder eine Präzipitation durch irgendeinen kolloidchemischen Vorgang zustande kommen kann, noch keineswegs bewiesen, daß der betreffende gleiche Mechanismus bei der eigentlichen Wa. R. vorliegt, und ferner gibt es eine Reihe gewichtiger Gründe, die für eine spezifische A. A.-Reaktion bei der Wa. R. sprechen.

Zunächst gehört hierher die bekannte Tatsache, daß die Komplementbindungsreaktion heterogenetischer Antisera nur mit solchen alkoholischen Extrakten gelingt, die aus Organen hergestellt sind, welche das *Forssman'sche* Antigen enthalten. Hier spielt also der physikalisch-chemische Zustand des als Antigen dienenden Sols nicht die alleinige Rolle, wenn er auch als solcher zu berücksichtigen ist [*Sachs* und *Bock*¹⁾], sondern hier muß der Extrakt das spezifische Antigen enthalten, welches man allerdings nicht mit der nötigen Sicherheit als Lipoid ansprechen kann. Es könnte auch ein Polysaccharid ähnlicher Stoff sein, der durch Begleitlipide alkohollöslich ist. Insofern kann der Einwand gemacht werden, daß die Spezifität der heterogenetischen A. A.-Reaktion nichts für eine solche von Lipoid-Antilipoiden beweist, da dabei das Lipoid nicht beteiligt zu sein braucht.

Ist nicht aber auch bei der Wa. R. die Möglichkeit vorhanden, daß das Lipoid nur der Träger einer im Extrakt befindlichen spezifischen Substanz ist?

Angesichts der Tatsache, daß für die Wa. R. brauchbare Extrakte aus den verschiedenartigsten Organen der verschiedensten Tiere (sogar aus Erbsen nach *L. Tribondeau*²⁾) herstellbar sind, möchte man diese Möglichkeit von vornherein verneinen, aber die Arbeiten von *Wadsworth* mit *E.* und *F. Maltaner*³⁾, sowie die von *Weil* und *Berendes*⁴⁾, *Oe. Fischer*⁵⁾ und *Ronai* deuten doch solche Möglichkeit an.

¹⁾ *Sachs* und *Bock*, Arbeiten aus dem Staats-Institut für experimentelle Therapie Frankfurt a. M. (1928), H. 21, 159.

²⁾ *L. Tribondeau*, Ref. Ztschr. Immunitätsforsch. 7, 26 (1913).

³⁾ Journ. of Immun. 21, 313 (1931).

⁴⁾ *Weil* und *Berendes*, Klin. Wschr. 11, 70 (1932); Ztschr. Immunitätsforsch. 73, 341 (1932).

⁵⁾ *Oe. Fischer*, Ztschr. Immunitätsforsch. 72, 344 (1931); Klin. Wschr. 1932, 512.

Nach *Wadsworth* sind chemisch gereinigte Phosphatide für den serologischen Luesnachweis wirkungslos, ebenso wie die von *Oe. Fischer* mit Aluminiumhydroxyd und Trikalziumphosphat und die von *Weil* und *Berendes* mit Kaolin als Adsorbentien vorbehandelten Extrakte. *Fischer* glaubt ausschließen zu können, daß an der chemischen Zusammensetzung bezüglich der Lipide und dem kolloiden Zustand der Extrakte durch die Adsorption eine solche Veränderung stattgefunden hat, daß dadurch der Verlust der Reaktionsfähigkeit erklärt werden könnte. Immerhin wäre eine Änderung der Grenzflächenspannung durch Adsorption kapillaraktiver Stoffe in Betracht zu ziehen. Andererseits konnte das wirksame Antigen aus der Verbindung mit diesen Adsorbentien eluiert werden und soll nach *Fischer* nicht mit den bekannten Lipoiden identisch sein. Auch die durch Kombinationsimmunisierung mit Schweineserum von Kaninchen erhaltenen Lipoidantisera reagieren nicht mehr mit den mit Kaolin vorbehandelten Organextrakten (*Weil* und *Berendes*), so daß sich solchen Extrakten gegenüber die Antilipoidimmunsere von Kaninchen wie syphilitische Sera von Menschen verhalten. Die Extrakte haben auch durch die Vorbehandlung mit Adsorbentien die Fähigkeit verloren (mit Schweineserum), beim Kaninchen Antikörper zu erzeugen (*T. Ronai*).

Diese Feststellungen, die wegen ihrer Bedeutung unbedingt einer Bestätigung und Erweiterung bedürfen, besagen also, daß es organische Lipide gibt, die trotz Schweineserumzugabe nicht antigen wirken, in beidem Sinne also weder Antikörper bilden noch binden können, denn, wie *Fischer* angibt, ist der Lipoidcharakter durch die Adsorption nicht verändert worden, und es sieht so aus, als ob die antigene Wirkung der Lipide an ein leicht adsorbierbares, von dem Lipoid verschiedenes Substrat gebunden ist und, falls letzteres selbst kein Lipoid ist, ist der Lipoidantikörper in Frage gestellt?

Nehmen wir nun mit *Sachs* u. a. an, daß imluetischen Serum Antikörper gegen Lipide vorhanden sind, so müßten diese Antikörper, wie bisher bei allen Antikörpern festgestellt, am Globulin des Serums gebunden sein. Wenn nun das Charakteristische einesluetischen Serums in der im physikalischen Sinne besonderen Art mancher seiner Globuline liegt, so könnte man erwarten, bei der Untersuchung der Frage nach der Rolle der Globuline für die Wa. R. Anhaltspunkte dafür zu finden, wieweit spezifische Antikörper und wieweit Globuline als solche in Betracht kommen.

Sind spezifische Antikörper vorhanden, so wissen wir, daß sie zwar (bis jetzt) untrennbar an Globuline gebunden sind, andererseits aber gegenüber der Globulinmenge im Serum nur einen mengenmäßig sehr kleinen Teil derselben ausmachen, was allein schon aus den hohen Verdünnungen hervorgeht, in denen antikörperhaltige Sera spezifisch wirksam sein können. Wenn demnach *Forssman*¹⁾ aus seinen Arbeiten beweisen will, daß die Wa. R. unabhängig von den Globulinen auftritt, und daß auch der Ausfall der Nonne- und Pandy-Reaktion im Liquor für die spezifische Wa. R. keine prinzipielle Rolle spielt, wenngleich das Zustandekommen der Flockungsreaktionen an das Vorhandensein von Globulin gebunden ist, so spricht dies sehr für die Mitwirkung von Antikörpern

¹⁾ *Forssman*, Biochem. Ztschr. **177**, 243 (1926); Acta path. scand. (Kobenh.) **4**, 198 (1927).

bei der Wa. R. und gegen die Annahme eines rein physikalisch-chemischen Prozesses.

Bei dem gegenwärtigen Stand unseres Wissens scheint die Autolipoidantikörpertheorie der Wa. R. noch nicht über jeden Zweifel bewiesen zu sein, ganz abgesehen davon, daß, selbst wenn das Vorhandensein von Antikörpern gegen die weitverbreiteten Organ- und Zell-Lipoide des menschlichen und tierischen Körpers im luetischen Serum erwiesen ist, die Schwierigkeit besteht, diese Antikörper mit der Syphilis in einen charakteristischen oder sogar spezifischen Zusammenhang zu bringen. Wie wir aber weiter unten sehen, ist heute durch die Arbeiten von *Witebsky, Kroó, Georgi* und *Fischer* usw. ein großer Teil dieser Schwierigkeit beseitigt.

Daß man trotz Annahme spezifischer Antikörper im luetischen Blute doch die Rolle der Extraktlipoide als ganz unspezifisch auffassen kann, hat kürzlich *B. S. Levine*¹⁾ gezeigt. *Levine* kommt auf Grund eigener Versuche teils auch rein deduktiv zu folgender Ansicht:

Im Serum der meisten Erwachsenen finden sich verschiedenartigste Antikörper, die mit den im lebenden Organismus beständig kreisenden Antigenen im Blute A. A.-Komplexe bilden. Auf qualitativen oder quantitativen kolloiden Faktoren beruht es, ob an diese A. A.-Komplexe Komplement adsorbiert wird oder nicht. Wird nun zu einem solchen Serum ein Lipoidsol zugefügt, so werden Grenzflächen geschaffen, die aus unbekanntem Gründen A. A.-Komplexe gleichgültig welcher Art anziehen. Diese Anziehung bewirkt, daß die so gebildeten Gesamt-(Lipoid-A. A.-)Komplexe gegenüber Komplement sensibilisiert sind. Das Lipoidsol ist also in diesem Falle nur der unspezifische Sensibilisator für die Komplementbindungsfähigkeit der spezifischen A. A.-Komplexe und für letztere brauchen Lipoidantikörper nicht angenommen zu werden, sondern der auf jeden Fall bei Lues gebildete Spirochäten-Antikörper.

Gegen die Autolipoidantikörpertheorie wurde der Einwand geltend gemacht, daß es durch kombinierte Lipoideiweißimmunisierung beim Menschen noch nicht (bis auf die weiter unten erwähnten Ergebnisse von *Oe. Fischer* und *F. Georgi*) gelang, eine dem syphilitischen Serum analoge Blutveränderung experimentell in der Weise zu erzeugen, wie dies leicht bei Kaninchen gelingt. Andererseits kann man auch beim Meerschweinchen keine positive Wa. R. [*L. Henning*²⁾] und nur schwierig in vitro nachweisbare Präzipitine gegen Eiweiß erzeugen. Es ist daher möglich, daß auch beim Menschen die Schwierigkeiten nur in seiner besonderen vom Kaninchen abweichenden Serumstruktur begründet liegen.

Besonders von *F. Klopstock*³⁾ wurde die Theorie vertreten, „daß die in der Spirochäte vorhandenen Lipoidverbindungen im Kaninchen- und Pferdeversuch überwiegend spezifische Antikörper auslösen. Der luesinfizierte Mensch erwirbt mit zunehmender Durchseuchung die Eigenschaft, die Spirochätensubstanzen in einfachere Verbindungen abzubauen.

¹⁾ *B. S. Levine*, Journ. inf. Dis. **48**, 189 (1931).

²⁾ *L. Henning*, Dtsch. tierärztl. Wschr. **193**, Nr. 45, 717 (1928).

³⁾ *F. Klopstock*, Zbl. Bakt. **119**, 78 (1930).

So treten spezifische Antikörper nur in einem Teil der Fälle im ersten Stadium der Lues in den Vordergrund. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine Blutveränderung, die durch abgestimmte Organextrakte (wegen der chemischen Verwandtschaft der Spirochäten- und Organlipide) und physikalisch-chemische Methoden in gleichem Maße nachweisbar ist“.

Um hier weiterzukommen hat *Kroó*¹⁾ Immunisierungsversuche an Menschen und Tieren mit Suspensionen rein gewaschener abgetöteter Syphilispirochäten unternommen, deren für die Frage der Lipidantikörper wesentliches Ergebnis das folgende ist:

Das Serum so behandelter Menschen gibt keine Wa. R. mit Organextrakten, wohl aber eine stark positive Komplementbindung mit alkoholischen Extrakten der Spirochäten sowie mit deren Lipoidsuspensionen. Die Spirochäten-Antikörper sind in spezifischer Weise durch die Spirochäten aus dem Serum adsorbierbar und sind fähig, in streng spezifischer Weise die homologen lebenden Spirochäten zu töten. Nach Erhitzen auf 63^o, wobei eine positive Wa. R. in der Regel negativ wird, bleibt die spezifische Komplementbindung mit Spirochäten-Extrakt bestehen.

Durch Behandlung nicht syphilitischer Menschen mit Trypanosomenaufschwemmungen gelang es, eine der syphilitischen analoge Blutveränderung zu erzielen. Die Sera so vorbehandelter Menschen ergaben nicht nur mit alkoholischen Trypanosomenextrakten, sondern auch analog der Wa. R. mit Organextrakten eine positive Komplementbindung. Aber die Reaktionskörper gegen Trypanosomen und gegen Organlipide waren verschieden. Zur Entstehung der Wa. R. ist ein Gewebszerfall nicht unbedingt erforderlich. Die Tierversuche ergaben, daß nach erfolgter Infektion mit Trypanosomen die Fähigkeit der Sera, mit verschiedenen Organextrakten zu reagieren, von einer konstitutionellen Eigenart der Tierart abhängt. [Bei Kaninchen hatten schon *Landsteiner* und *van der Scheer*²⁾ durch Injektion abgetöteter Trypanosomen positive Komplementbindung sowohl mit Trypanosomen wie auch mit Organextrakten erzielt.]

Die Feststellung von *Kroó*, daß sich die Pallida-Reaktion nicht mit der Wa. R. deckt, konnte von *F. Plaut*³⁾ u. a. bestätigt werden. Nun hatte bereits *Kroó* in seinen Arbeiten festgestellt, daß sich verschiedene Spirochätenstämme (*Kroó*, *Reiter*, *Noguchi*) biologisch verschieden verhalten und sich serologisch unterscheiden lassen, was *Plaut* mit *Kassowitz*⁴⁾ ebenfalls fand.

Zu dieser biologischen Differenzierung und vielleicht diese erklärend fanden *F. Georgi* und *C. Prausnitz*⁵⁾ einen tiefgreifenden Einfluß des Nährbodens auf die biologische Eigenart der *Spirochaeta pallida*, insofern z. B. bei der Umzüchtung von Kultur mit Nierengewebe auf eine solche mit Gehirnbrei die Spirochäte eine entsprechende Gewebsspezifität erwirbt.

1) *Kroó* und *F. O. Schulze*, *Klin. Wschr.* 1928, 246. — *Kroó*, *F. O. Schulze* und *J. Zander*, *Klin. Wschr.* 1929, 783. — *Kroó* und *F. O. Schulze*, *Klin. Wschr.* 1929, 1203. — *Kroó*, *F. O. Schulze* und *N. v. Jancso*, *Klin. Wschr.* 1930, 1108.

2) *Landsteiner* und *van der Scheer*, *Journ. of exper. Med.* 45, 465 (1927).

3) *F. Plaut*, *Ztschr. Neurol.* 123, 365 (1930).

4) *Plaut* und *Kassowitz*, *Klin. Wschr.* 1930, 1396.

5) *F. Georgi* und *C. Prausnitz*, *Arch. Hyg.* 103, 173 (1930).

Mit dieser Feststellung war die Möglichkeit gegeben, zwischen der Pallida-Reaktion und der Organlipoidreaktion der luetischen Sera einen Zusammenhang zu finden.

Nachdem schon *Brandt, Guth und Müller, Heimann und Steinfeld*¹⁾ eine gewisse Organspezifität für Hirnlipoide im Tierversuch nachgewiesen hatten, haben *F. Georgi* und *Oe. Fischer*²⁾ über den Nachweis von gehirnspezifischen Lipoidantikörpern im luetischen Serum berichtet, die sich durch Absorptionsversuche von anderen Organ- (z. B. Herz) Lipoidantikörpern sicher trennen ließen. Für das Problem der Metalues beim Menschen zog *F. Georgi*³⁾ daraus folgende wichtige Folgerungen:

Eine Spirochäte ist dem Nährboden, auf dem sie sich lange Zeit gehalten hat, angepaßt, so daß z. B. eine von Gehirnlipoiden abhängige Spirochäte in erster Linie zu Gehirnspirochätenantikörpern führt und analog bei Leber und anderen Organen. Also ist es unnötig, speziell neurotrope Spirochäten anzunehmen, sondern eine lange auf den Lipoiden des Zentralnervensystems vegetierende Spirochäte verändert sich allmählich und erlangt eine Virulenz für das Nervengewebe, wodurch die metaluetische Erkrankung beginnt. Die Neurotropie ist also nicht primär vorhanden, sondern entwickelt sich erst. In gleicher Weise können gleichzeitig verschiedene Organlipoidantikörper entstehen, so daß *Georgi* und *Fischer* empfehlen, für die Frühdiagnose der Lues des Zentralnervensystems bei der Wa. R. einen Extrakt aus Hirnrinde mit zu benutzen.

Auf Grund dieser Erkenntnisse haben dann *Oe. Fischer* und *F. Georgi*⁴⁾ erneut die Frage der experimentellen Erzeugung von Organlipoidantikörpern in Angriff genommen. Diesmal behandelten sie Menschen nicht mit sorgfältigst gewaschenen abgetöteten Spirochäten, sondern mit solchen, die noch anhaftende Organbestandteile des Nährbodens hatten, und fanden dann, daß außer den zu erwartenden Spirochätenantikörpern organspezifische Antikörper auftreten, insofern nach Vorbehandlung mit Spirochäten + Kaninchennierenbestandteilen sich Antikörper nachweisen ließen, die mit Azetonrestextrakt aus Rinderniere, nicht aber mit entsprechendem Extrakt aus Menschengehirn oder einem für die Wa. R. benutzten cholesterinisierten Rinderherzextrakt reagierten. Umgekehrt reagierte ein Serum nach Behandlung mit Spirochäten + Kaninchengehirn außer mit dem Spirochätenextrakt nur noch mit Azetonrestextrakt aus Menschenhirn. Hier waren also experimentell erzeugte organspezifische Antikörper beim Menschen nachgewiesen, und was besonders interessant ist, diese Antikörper waren streng organ-, aber nicht artspezifisch, was unabhängig davon speziell für Gehirnlipoidantikörper von *Witebsky* und *Steinfeld* aus dem *Sachs'schen* Laboratorium nachgewiesen war.

Auf Grund aller dieser Forschungen kann man also annehmen: Die Infektion mit Syphilisspirochäten bedingt zunächst spezifische, gegen die

¹⁾ *Heimann* und *Steinfeld*, Ztschr. Immunitätsforsch. 58, 181 (1928).

²⁾ *F. Georgi* und *Oe. Fischer*, Klin. Wschr. 1927, Nr. 20, 43, 48, 49, 51.

³⁾ *F. Georgi*, Klin. Wschr. 1928, Nr. 40.

⁴⁾ *Oe. Fischer* und *F. Georgi*, Klin. Wschr. 1930, Nr. 39.

Spirochäten gerichtete Antikörper. Im weiteren Verlauf der Erkrankung, indem sich die Spirochäten an gewisse Gewebe als Nährsubstrat angepaßt haben, sind die Spirochäten imstande, die betreffenden Gewebszellen zu zerstören, wobei deren Lipide frei werden, die nun im Verein mit den Spirochäten als Schlepper organspezifische Lipoidantikörper erzeugen. Die Spirochätenantikörper sind nur durch spezifische Spirochätenextrakte, die Organlipoidantikörper aber durch die Wa. R. nachzuweisen.

Für die Praxis würde sich daher für die Frühdiagnose ein spezifischer Spirochätenextrakt (möglichst aus verschiedenen Stämmen) und für die Wa. R. ein Organextrakt empfehlen, der die Lipide möglichst verschiedener Organe enthält.

e) Einiges zur Methodik der Wa. R.

Unter den vielen Arbeiten, die die Theorie und Methodik der Wa. R. zum Gegenstand haben, seien hier nur einige wenige hervorgehoben.

*Olinto Sciarra*¹⁾ empfiehlt eine Serodiagnose der aktiven Syphilis mittels des Autoantigens des Serums (S. R.). Er geht davon aus, daß Normalsera absolut gesunder Menschen im Ultramikroskop Teilchen zeigen, die bezüglich Größe und Bewegung gleichartig sind. Dagegen enthalten Sera von Luetikern mit aktiver Infektion, gleichgültig ob Wa. positiv oder negativ, besonders nach Inaktivierung in Größe und Beweglichkeit ungleiche, freie oder in Flocken zusammengeballte Teilchen. Ähnliche Beobachtungen machten kürzlich auch *A. M. Mallory* und *R. L. Kahn*²⁾. Ultramikroskopisch kommen mit Lipoidextrakten auch in nicht syphilitischem Serum Präzipitate vor, aber weniger zahlreich und kleiner. [Man vergleiche damit auch die Arbeit von *Levine*³⁾.]

Nach *Sciarra* sind die Teilchen A. A.-Komplexe der Lipoidantikörper mit Lipiden des Serums (man vergleiche die weiter oben erwähnten Anschauungen von *Levine*). Zusatz von hochprozentigem, sehr reinem Alkohol (genaue Technik beachten) bringt diese Flocken zur schnellen Lösung, wobei sich Antigen und Antikörper trennen. Bei ihrer Wiedervereinigung unter neuer Aggregatbildung kann Komplement gebunden werden, was durch Ausbleiben der Lyse sensibilisierter Blutzellen nachweisbar ist. Hier wird zwar Alkohol als Antigen nicht benutzt, doch bestehen, wie auch *Sciarra* angibt, interessante Beziehungen zu der positiven Wa. R. mit Alkohol oder Phenolalkohol anstatt Extrakt-Antigene. Die theoretisch interessante Reaktion verdient eine ausgedehnte Nachprüfung, zumal sie nach *Sciarra* besonders geeignet sein soll, den Einfluß einer Therapie auf die Lues zu erkennen.

*W. Bachmann*⁴⁾ schlägt eine Versuchsanordnung vor, in der mit aktivem luetischem Serum gearbeitet wird, wobei der Eigenkomplementgehalt des Serums nicht genügt, um die sensibilisierten Blutzellen zu lösen, sondern nur zu agglutinieren. Bei inaktiviertem Serum muß eine entsprechend kleine Meerschweinchenkomplementmenge genommen werden. Diese Methode soll bei hoher Spezifität den Vorteil eines schnellen Reaktionsablaufes haben. [Anmerkung:

¹⁾ *Olinto Sciarra*, *Klin. Wschr.* **1930**, Nr. 18; *Revue de Dermatologie et de Vénérologie* (Paris, Jan. 1931).

²⁾ *A. M. Mallory* und *R. L. Kahn*, *Journ. inf. Dis.* **48**, 243 (1931).

³⁾ *Levine*, *Journ. inf. Dis.* **48**, 189 (1931).

⁴⁾ *W. Bachmann*, *Arch. Hyg.* **108**, 142, 1932; *Klin. Wschr.* **1932**, 196.

Nach G. Blumenthal [Klin. Wschr. 11, 1466 (1932)] beruht die Agglutination roter Blutzellen durch syph. Serum auf nebeneinander verlaufenden Komplementbindungs- und Flockenreaktionen, wobei die nicht gelösten Blutzellen durch die entstehenden Flocken mitgerissen werden. Weitere Diskussion in Klin. Wschr. 11, 1878 (1932)].

IX. Hemmungszonen bei serologischen Reaktionen.

a) Zonenbildung bei der Komplementbindung.

Die trotz Verdünnung des syphilitischen Serums gelegentlich auftretende stärkere Komplementbindung, die sich im Reihenversuch als Zone zu erkennen gibt, ist vielfach erklärt worden als bedingt durch einen Gehalt des syphilitischen Serums an normalen Hammelbluthämolysinen, der naturgemäß in unverdünntem Serum eine stärkere Lyse und somit schwächere Komplementbindung vortäuscht als bei größerer Verdünnung (Kolmer u. a.). Nach Levine¹⁾ genügt dies nicht zur Erklärung der Zonenbildung. Auf Grund seiner bereits auf S. 142 gegebenen Anschauung findet die Komplementbindung an die durch Lipoid sensibilisierten A. A.-Komplexe im Serum statt. Da solche auch in normalem Serum vorkommen, wird auch dort, aber fast nie mehr wie eine lösende Einheit Komplement gebunden. Das Komplement umhüllt die Lipoid-A. A.-Komplexe mit einer Schicht bestimmter Dicke. Daher wird, je größer die Gesamtoberfläche dieser Komplexe ist, desto mehr Komplement verbraucht [Dean²⁾]. Mit der Serumverdünnung steigt der Dispersitätsgrad und damit die Gesamtoberfläche der Lipoid-A. A.-Komplexe, so daß dadurch trotz weniger Menge an Originalserum mehr Komplement in verdünntem Serum verschwinden kann als in nicht verdünntem.

Auch H. Eagle³⁾ hat sich kürzlich mit dem Phänomen der Zonenbildung bei der Komplementbindung beschäftigt. Er ging von der bekannten größeren Empfindlichkeit der Wa. R. in der Kälte als bei 37° aus (Jakobsthal 1910, Guggenheimer 1911, Coca und l'Esperance 1913 u. a.). Für die Erklärung derselben kommen eine Reihe von Faktoren in Betracht. Zunächst ist experimentell nachweisbar, daß bei 8° in 12 Stunden mehr Komplement gebunden wird, als bei 37° in 1/2—1 Stunde. Auf den Zeitfaktor hat schon Dean⁴⁾ aufmerksam gemacht. Ferner nimmt nach Kolmer⁵⁾ die antikomplementäre Wirkung des Antigens mit der Zeit zu, wodurch die Entstehung einer positiven Wa. R. begünstigt wird. Auch zersetzt sich mit der Zeit (abhängig von der Qualität) das Komplement spontan. B. S. Levine⁶⁾ nimmt an, daß die Temperatur von 8—10° die Agglomeration der durch Lipoid sensibilisierten A. A.-Komplexe erleichtert, wodurch die Komplementbindung stärker erscheint. Der A. A.-Komplex wird auch fester, so daß selbst bei folgender Wärmeinkubation eine Dissoziation nicht leicht erfolgt.

¹⁾ Levine, Journ. inf. Dis. 48, 189 (1931).

²⁾ Dean, Ztschr. Immunitätsforsch. 13, 84 (1912).

³⁾ H. Eagle, Journ. of exper. Med. 53, 615 (1931).

⁴⁾ Dean, Journ. of Path. 21, 193 (1916—17).

⁵⁾ Kolmer, Amer. Journ. Syph. 4, 675 (1920).

⁶⁾ B. S. Levine, Amer. Journ. Syph. 14, 378 (1920).

Aber nach *Eagle* erklärt alles dies noch nicht, daß manche Sera bei 37°, auch wenn man das Reaktionsgemisch noch so lange stehen läßt, negativ reagieren, während die gleichen Sera schon nach 2—4 Stunden bei 8° glatt positiv sind. Eine eingehende Untersuchung dieser Erscheinungen läßt *Eagle* dieselben mit dem Zonenphänomen der Komplementbindung in Zusammenhang bringen.

Wenn man ein stark positives Serum statt mit NaCl mit normalem Serum verdünnt, dann ist, gemessen an dem noch gerade positiv reagierenden Serutiter, die Empfindlichkeit der Wa. R. herabgesetzt. Bei verschiedener Verdünnung mit Normalserum gab die Bestimmung der Reagineinheiten, die bei $\frac{1}{2}$ Stunde 37° und 6 Stunden 8° noch Komplementbindung gaben, bei graphischer Darstellung die folgende Fig. 18. Die größere Empfindlichkeit der Wa. R.

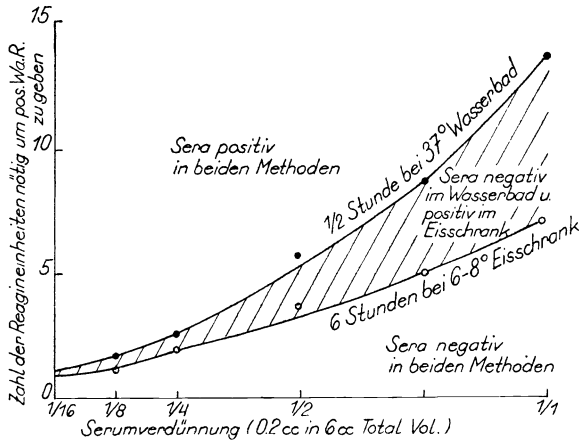


Fig. 18. Wirkung von normalem Serum auf die Empfindlichkeit der Wa. R. bei 37° und 0°, nach *H. Eagle*, Journ. exper. Med. 83, 619 (1932).

im Eisschrank ist teilweise darauf zurückzuführen, daß die durch Gegenwart von Serum bedingte Hemmung bei niedriger Temperatur weniger deutlich ist. Aber selbst im Eisschrank ist die Hemmung noch deutlich genug, um die Reaktion mit 0,2 ccm des unverdünnten positiven Serums nur geringgradig weniger empfindlich zu machen als die mit 0,1 ccm oder selbst 0,05 ccm des gleichen Serums. Bestimmt man den Grad der Komplementbindung bei zwei in genau gleicher Weise angesetzten Reaktionsgemischen eines positiven Serums, von denen die eine Serie $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37°, die andere 4 Stunden bei 6° und dann bei 37° gehalten wird, so zeigt die Fig. 19, daß die Hemmung durch größere Serumengen bei 37° genügt, das Serum negativ zu machen, während sich im Eisschrank die Hemmung nicht annähernd so deutlich auswirkt.

Es ist also nach *Eagle* das unverdünnte Serum, welches das sogenannte Zonenphänomen bei der Komplementbindung hervorruft. Ein schwach positives Serum kann bei $\frac{1}{5}$ Verdünnung stark positiv, aber in stärkerer Konzentration völlig negativ reagieren. Serum hemmt die Bindung von Komplement an die mit denaturiertem Globulin (= syphilitisches Reagin) umgebenen Lipidteilchen, wahrscheinlich dadurch, daß normales Serumweiß von den Lipid-Immunglobulin-Komplexen adsorbiert wird und dadurch wie ein Schutzfilm gegen die weitere Komplementadsorption wirkt.

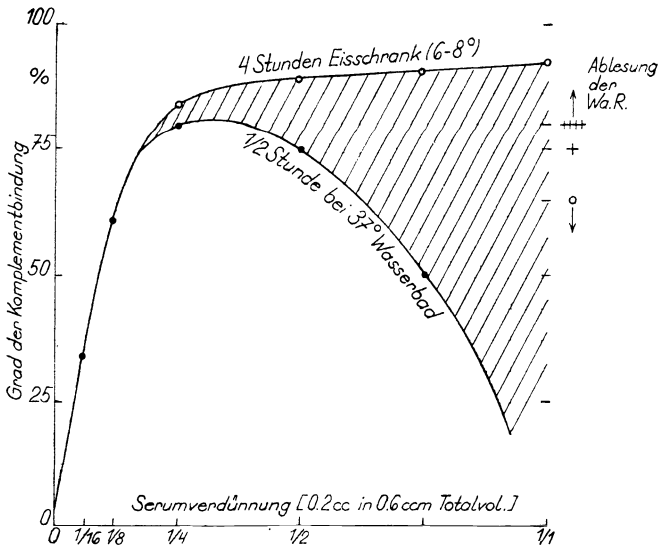


Fig. 19. Das Zonenphänomen in der Komplementbindung, nach H. Eagle, Journ. exper. Med. 33, 620 (1931).

Die Annahme der Mitwirkung nativer Hammelbluthämolyse bei dem Zonenphänomen der Komplementbindung ist daher unnötig.

Auch bei anderen Antigen-Antikörper-Reaktionen hat man bei der damit verbundenen Komplementbindung gelegentliche Hemmungen beobachtet. Bekannt ist das erstmalig von Neisser und Wechsberg¹⁾ bei der Hämolyse und Bakteriolyse beobachtete und beschriebene Phänomen, daß die Lyse bei Antikörperüberschuß ausbleiben kann. Nach der Ehrlich-Morgenroth'schen Auffassung beruht diese Erscheinung darauf, daß die im Überschuß vorhandenen und nur zum Teil gebundenen Ambozeptoren durch ihre komplementophile Gruppe das vorhandene Komplement zum größten Teil binden, so daß für die Lyse durch die gebundenen Ambozeptoren nicht genügend Komplement zur Verfügung bleibt. Auch hat man zur Erklärung Antikomplemente im Serum angenommen.

Es scheint nun aber nichts im Wege zu stehen, die von Eagle für das Zonenphänomen der Komplementbindung bei der Wa. R. angegebene Erklärung auch für das Neisser-Wechsberg'sche Phänomen heranzuziehen. Da letzteres nur bei Antikörperüberschuß eintritt und damit auch eine größere Serummenge verbunden ist, könnte man in analoger Weise annehmen, daß der A. A.-Komplex aus dem Serum in unspezifischer Weise Globuline adsorbiert, die nun als Schutzfilm die Komplementadsorption erschweren.

b) Die Hemmungszone bei der Agglutination und Präzipitation.

Nun gibt es auch Hemmungszonen bei Agglutinations- und Präzipitationsvorgängen, bei denen die Reaktion bei unverdünntem Serum gehemmt ist und

¹⁾ Neisser und Wechsberg, Münch. med. Wschr. 1901.

erst bei Verdünnung auftritt. Auch bei der Hämagglutination mittels Testsera ist eine solche sogenannte Vorzone beobachtet worden. Im Grunde lassen sich diese Erscheinungen in analoger Weise wie bei der Hemmung der Komplementbindung erklären. Es werden durch die A. A.-Komplexe aus dem unverdünnten Serum unspezifische Eiweiße adsorbiert, die hydrophil bleiben und dadurch, ebenso wie sie die Komplementadsorption verhindern, auch die gegenseitige Agglomeration hemmen. Nun läßt sich aber, besonders bei der Agglutination, diese Hemmungszone manchmal durch Erhitzen des Serums künstlich erzeugen. *Eisenberg* und *Volk*¹⁾ beobachteten, daß Bakterien, die 1—2 Stunden mit auf 56° oder 70° erhitztem Immenserum vorbehandelt waren, nach Entfernung des erhitzten Serums durch neu zugefügtes frisches Immenserum nicht mehr agglutinieren. Zur Erklärung wurde „Agglutinoid“-Bildung angenommen, d. h. Agglutinine, die sich zwar an Bakterien binden, aber nicht mehr Zusammenballung hervorrufen können.

Nach *F. S. Jones*²⁾ ist aber auch eine andere Erklärung möglich. Jedes erhitzte Serum kann als Eiweiß durch Bakterien adsorbiert werden, und solche Bakterien können mit entsprechenden präzipitierenden Antieweißseren geflockt werden und auch Komplement binden. Diese unspezifische Eiweißadsorption hindert naturgemäß die Bindung später zugefügter spezifischer Agglutinine. Aber es ließ sich experimentell zeigen, daß die Eiweißbindung aus erhitztem Immenserum viel stärker war als aus erhitztem Normalserum, so daß also eine gewisse Spezifität noch vorhanden war, oder mit anderen Worten, die Agglutininzerstörung nicht vollständig war. In der Tat war die Hemmung der Agglutination der vorbehandelten Bakterien durch später zugefügtes frisches Agglutinin um so geringer, je höher das zur Vorbehandlung dienende Immenserum erhitzt war. Wir müssen also annehmen, daß bis zu einem gewissen Grade erhitztes Immunglobulin auf Grund der Spezifität noch eine über die von erhitztem normalem Serumeiweiß hinausgehende Bindungsfähigkeit an die Antigenmizelle besitzt. Die Erhitzung hat aber bewirkt, daß das Immunglobulin eine vermehrte Wasserbindung hat — vielleicht ist auch die lipoide Gruppe der Globulinmizelle verändert, was mit der Verringerung der Oberflächenspannung beim Erhitzen von Serum zusammenhängen könnte —, jedenfalls ist der so gebildete A. A.-Komplex relativ weniger hydrophob und kann demnach nicht agglutinieren. Man sieht, daß das erhitzte Immunglobulin die Eigenschaften des hypothetischen Agglutinoids besitzt. Bei noch weiterer Erhitzung geht die Spezifität verloren, d. h. der Antikörper wird zerstört und solches Globulin wird dann nicht stärker gebunden als normales erhitztes Serumeiweiß, und die damit behandelten Bakterien können noch der Wirkung der spezifischen Affinität frisch zugesetzter Agglutinine unterliegen.

Eine weitere Bearbeitung hat das Problem der Hemmungszone bei der Agglutination durch *G. S. Shibley*³⁾ erfahren. Auch *Shibley* konnte experimentell feststellen, daß das Erhitzen von Immenserum eine Hemmung der Agglutination in größerer Serumkonzentration hervorruft, wobei eine längere Erhitzung auf z. B. 56° den gleichen Effekt hervorruft, wie eine kurze auf z. B. 66°. Meistens geht die Hemmungszone bei stärkerem Erhitzen in völligen Agglutininverlust über, aber es fanden sich auch Ausnahmen, von denen des besonderen Interesses wegen ein Beispiel hier im Auszug wiedergegeben sei.

Der Versuch zeigt deutlich, daß durch das Erhitzen das Agglutinin als solches nicht zerstört wurde, da der Endtiter der gleiche war. Nimmt man aber eine „Agglutinoid“-Bildung an, so ist nicht recht einzusehen, warum solche Agglu-

1) *Eisenberg* und *Volk*, Ztschr. Hyg. 1902.

2) *F. S. Jones*, Journ. of exper. Med. 47, 245 (1928).

3) *G. S. Shibley*, Journ. of exper. Med. 50, 825 (1929).

tinoide, die also nicht agglutinieren können, dies doch tun, und zwar noch dazu dann, wenn sie mengenmäßig verringert sind. Shibley nimmt aber auf Grund folgender weiterer Beobachtungen Agglutinoidebildung an.

Agglutination von Shiga-Bakterien durch Serum, welches für je 10 Minuten bei verschiedener Temperatur erhitzt war.

Temperatur	Verdünnung des Serums: 1 zu									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	Kontrolle
unerhitzt	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
55	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
60	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
63	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
64	±	±	++	++	++	++	++	+	—	—
65	—	—	+	++	++	++	++	+	—	—
66	—	—	—	—	++	++	++	+	—	—
69	—	—	—	—	++	++	++	+	—	—
70	—	—	+	++	++	++	++	±	—	—
71	+	+	++	++	++	++	±	±	—	—
72	++	++	++	++	++	+	—	—	—	—
74	++	++	++	++	++	+	—	—	—	—
76	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Das Hemmungsphänomen ist spezifisch, insofern Zusatz von erhitztem Serum zu unerhitztem Serum letzterem nur dann eine Hemmung verleiht, wenn beide den gleichen Antikörper haben. Zusatz von erhitztem zu nicht erhitztem heterologem Serum ist bezüglich der Hemmung ohne Wirkung. Absorption der Agglutinine mit Bakterien entfernt alle Agglutinine. Wenn aber wenig Bakterien genommen werden, wird in erster Linie die Hemmungszone verringert, woraus geschlossen wird, daß die Agglutinoide eine größere Affinität zu Bakterien haben. Wenn man mehr Bakterien zusetzt, als nötig ist, um alle Agglutinoide zu binden, dann erfolgt durch die zurückbleibenden Agglutinine Agglutination, woraus geschlossen wird, daß die Agglutinoide quantitativ überwiegen. Ein erhitztes Serum, das durch Bakterienabsorption erschöpft ist, kann bei Zusatz zu frischem Serum keine Hemmungszone mehr hervorrufen. Die Bakterien, die in der Hemmungszone sich mit Agglutinoiden beladen haben, sind durch frisches Agglutinin nicht mehr agglutinierbar. Die Hemmung kann durch Berkefeld-Filtration wie auch durch Behandlung mit Kaolin aufgehoben werden. Im Kataphoreseversuch zeigen mit Agglutinoide und mit Agglutinin beladene Bakterien die gleiche elektrische Ladung [entsprechendes fanden Mudd und Mitarbeiter¹⁾].

Bei aller Anerkennung der beobachteten Tatsachen scheint die Schlußfolgerung auf Agglutinoide nicht zwingend zu sein. Es geht nicht an zu sagen, daß die Hitzeeinwirkung nur gewisse Agglutinine betrifft und nicht alle. Der Versuch zeigt, daß die Agglutinine alle eine Erhitzung von 10 Minuten bei 69° noch ausgehalten haben und erst bei höherer Erhitzung ihre agglutinierende Wirkung abnimmt. Aber eine gewisse Veränderung haben die Agglutinine resp. das betreffende Immunglobulin von etwa 63° an erfahren. Die Affinität hat nachgelassen. Insofern kann in zunehmendem Grade auch Serumeiweiß in unspezifischer Weise adsorbiert werden und daher in höheren Konzentrationen die spezifische Agglutininbindung hemmen. Bei stärkerer Verdünnung tritt

¹⁾ Mudd und Mitarbeiter, Journ. of exper. Med. 49, 779 (1929).

das unspezifisch adsorbierbare Eiweiß mengenmäßig zurück, so daß dann die noch vorhandene spezifische Affinität der Agglutinine sich durchsetzt. Wird noch höher erhitzt, dann verliert das Eiweiß als solches durch den Prozeß der Hitzedenaturierung seine Adsorptionsfähigkeit an Bakterien, und es bleibt schließlich noch die spezifische Affinität erhalten, bis auch diese von etwa 71° an bis 76° völlig aufgehoben ist.

Daß Zusatz von erhitztem Serum zu heterologem nicht erhitztem Serum letzterem keine hemmende Eigenschaft verleiht, kann damit erklärt werden, daß die Agglutinine noch im Besitz ihrer vollen spezifischen Affinität sind und daher analog wie in den obigen Versuchen von *Jones* trotz des Schutzfilms von lyophilem Globulin ihre Affinität zur Wirkung bringen können. Raum-mangel verbietet ein weiteres Eingehen auf das Problem der Hemmungzone, welches aber jedenfalls noch weiterer Bearbeitung und Klärung bedarf.

X. Die Phagozytose.¹⁾

Opsonine und Tropine.

Metschnikoff hatte zunächst im Immunserum „Stimuline“, die die phagozytierende Tätigkeit der Leukozyten anregen, mithin eine direkte Wirkung auf die Leukozyten angenommen und hielt auch an dieser Ansicht fest, nachdem *Denys* und *Le Clef* (1895), *Mennes* (1897), *Marchand* (1898) u. a. zeigten, daß zwischen den Leukozyten normaler und immunisierter Tiere keine Unterschiede bestehen, sondern die Phagozytose in erster Linie auf einer Veränderung der Bakterienoberfläche durch das Immunserum beruht. *Wright* und *Douglas* (1903/04) fanden nun, daß viele Bakterien im Normalserum phagozytiert werden konnten, aber nicht mehr nach dessen Erhitzen auf 56°, und bezeichneten die thermolabilen wirksamen Stoffe im Normalserum als Opsonine. Jedoch konnten *Neufeld* und *Rimpau* (1904—05) zeigen, daß bei der Immunisierung nicht die thermolabilen Substanzen des Serums vermehrt wurden, sondern daß thermostabile Antikörper entstehen, die *Neufeld* als Bakteriotropine bezeichnete. In der Folgezeit wurde dann zunächst scharf zwischen den nur mit Komplement wirkenden Opsoninen des normalen Serums und den auch ohne Komplement wirksamen Tropinen des Immunserums unterschieden (*Dean*, 1905, 1907 u. a.).

Die opsonische Wirkung des normalen Serums erstreckt sich auf fast alle Bakterien, ist aber abhängig von deren Virulenz (Kapselbildung, Aggressin). Die Frage war nun, inwiefern diese Erscheinung spezifisch war, d. h. ob man für jede Bakterienart ein besonderes spezifisches Opsonin annehmen muß, und ferner, welcher Art dieser Prozeß ist.

Was die Spezifität betrifft, so waren die Beobachtungen der zahlreichen Bearbeiter dieser Frage einander vielfach widersprechend. *Wright*, *Bullock* und deren Mitarbeiter fanden, daß nach Absorption der Opsonine durch bestimmte Bakterien das Serum noch in weitgehendem Maße solche

¹⁾ Literaturangaben: *F. Neufeld*, Bakteriotropine und Opsonine im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von *Kolle*, *Kraus*, *Uhlenhuth*. — *R. Muir*, A system of Bacteriologie. Bd. VI (London 1931).

für andere Bakterien enthalten kann, während nach den Versuchen von z. B. *Lamar* und *Bispham*, *Muir* und *Martin*, *Neufeld* und *Hüne* (1907) Absorption mit Staphylokokken oder mit Hefe alle Opsonine aus dem Normalserum entfernt. Wieder andere nahmen eine gewisse Spezifität an. Zum Beispiel fand letzthin *Sia* [1928¹⁾] ein deutliches spezifisches Verhalten gegenüber den einzelnen Pneumokokkentypen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zwar manche Sera mehr wie andere Stoffe von einer gewissen spezifischen opsonischen Wirkung enthalten, deren Thermolabilität variieren kann (also gewissermaßen normale Tropine), daß aber ein normales Serum in beträchtlicher Menge ein nicht spezifisches thermolabiles Opsonin enthält.

Im allgemeinen absorbieren Stoffe, die Komplement absorbieren, auch Opsonine, weswegen man die Identität der beiden Substanzen angenommen hat (*Dean*).

Doch wird neuerdings von *J. Gordon*²⁾, weil Kongorotlösung (0,3 ccm einer 2proz. Lösung auf 1 ccm Serum) zwar die hämolytische Komplementwirkung des Meerschweinchenserums aufhebt, aber die opsonische Wirkung nicht beeinträchtigt, eine Verschiedenheit gefordert. Ob man zur Erklärung überhaupt verschiedene Komplemente annehmen kann, muß wegen unserer Unkenntnis des Komplementes dahingestellt bleiben. Besonders wirksam sind alle A. A.-Komplexe, wie z. B. sensibilisierte Bakterien oder Blutzellen, spezifische Präzipitate usw., die bekanntlich Komplement adsorbieren. Mit diesen läßt sich das Opsonin eines Serums genau so völlig adsorbieren, wie eine Erwärmung auf 56° dasselbe zerstört (*Muir* und *Martin* 1906). Darauf beruht auch die kürzlich von *H. W. Cromwell* und *J. A. Centano*³⁾ gemachte Feststellung, daß spezifische Präzipitate, wenn sie in vitro entstehen⁴⁾, phagozytiert werden. Für die Identität von Opsonin mit Komplement sprechen auch die von *Ledingham*, *Dean* u. a. gemachten Beobachtungen, daß die Mittel- und Endstück-Komponenten jedes für sich opsonisch unwirksam, aber zusammen wieder wirksam sind, obwohl Ausnahmen vorkommen, bei denen Endstück allein wirksam ist (*Ledingham*). Die sogenannte vierte Komponente ist zwar nach *Gordon*, *Whitehead* und *Wormall*⁵⁾ für Hämolyse und Bakterizidie, nicht aber für die Phagozytose nötig. Dazu kommt, daß die durch Absorption oder durch Erhitzung aufgehobene opsonische Wirkung durch Zusatz von frischem Serum wieder hergestellt werden kann. Aber diese Reaktivierung ist manchmal schwierig (hemmende Wirkung des erhitzten Serums?) und besonders ist es technisch nicht möglich, die Komplementwirkung von der eines evtl. vorhandenen ebenso thermolabilen Opsonins zu trennen. Nun sind aber tatsächlich relativ hitzestabile Opsonine vorhanden, die als normale Tropine noch nachweisbar sind, wenn Komplement zerstört ist.

¹⁾ *Sia*, Zbl. Bakt. **88**, 340 (1928).

²⁾ *J. Gordon*, Journ. of Immun. **19**, 303 (1930).

³⁾ *H. W. Cromwell* und *J. A. Centano*, Journ. of Immun. **17**, 53 (1929).

⁴⁾ Daß der sehr umstrittene Vorgang der spezifischen Präzipitation in vivo vorkommt, ist durch die Arbeiten von *Opie* [Journ. of Immun. **8**, 55 (1923); Journ. of exper. Med. **39**, 659 (1924)] sehr wahrscheinlich gemacht. *Opie* fand, daß intrakutan injiziertes Protein bei einem normalen Tier schnell, bei einem immunisierten Tier nicht diffundiert, sondern in situ festgehalten wird, wobei die Präzipitate bei der folgenden Entzündung intrazellulär aufgenommen werden.

⁵⁾ *Gordon*, *Whitehead* und *Wormall*, Journ. of Path. **32**, 57 (1929).

Z. B. kann nach *Dean* ein auf 60° erhitztes Pferdeserum noch opsonische Wirkung auf Typhusbazillen ausüben, und Bakterien, die vorher mit solchem erhitztem normalen Serum vorbehandelt sind, vermögen diese normalen Tropine nicht zu adsorbieren.

Wo man also das Opsonin nicht mit Komplement identifizieren kann, ist man anscheinend berechtigt, die Wirkung von normalen Tropinen anzunehmen, die, wie wir weiter unten sehen, durch Komplementwirkung wesentlich in ihrer opsonischen Wirksamkeit unterstützt werden. Andererseits müßte man einen reichlichen Gehalt von spezifischen Opsoninen annehmen, daß ihre Bindung mit Antigenen stets alles Komplement verbraucht, und das ist sehr unwahrscheinlich.

Wenn nun auch die meisten Bakterien Opsonin zur Phagozytose benötigen, so kann in vitro doch auch eine spontane Phagozytose in NaCl-Lösung ohne Serum vorkommen. Vornehmlich vermögen Leukozyten ohne Serum unbelebtes Material sowie avirulente Mikroben aufzunehmen, manchmal aber auch virulente Bakterien, z. B. unbekapselte Milzbrandbazillen sowie Tuberkelbazillen (*Wright* und *Reid* 1906).

Die spontane Phagozytose ist eingehend von *H. Schütze*¹⁾ untersucht worden. Sie wird durch verdünnte Säuren, nicht aber durch verd. Alkali beschleunigt dadurch, daß die in neutraler Suspension negative Ladung der Mikroben und Leukozyten herabgesetzt und somit eine Adhäsion begünstigt wird. Nach *Simon*, *Lamar* und *Bispham*²⁾ werden Stoffe, die wie Albuminpulver, Tierkohle usw. zur Komplementadsorption benutzt werden, dabei opsoniert. Diese Opsonierung toten Materials wird durch eine Steigerung der NaCl-Konzentration verhindert und durch eine Verringerung der NaCl-Konzentration begünstigt, welche Konzentrationsänderungen als solche die Serum-Mikroben-Phagozytose nicht beeinflussen [*Wright* und *Reid*³⁾]. Aus Versuchen von *P. Mörch*⁴⁾ geht hervor, daß Lithiumsalze die Phagozytose von Reisstärke stimulieren. Erhitztes normales Serum kann unter Umständen den normalen opsonischen Effekt hemmen, und unbelebtes Material sowie Mikroben sind nach Behandlung mit erhitztem Serum und folgendem Waschen weniger gut phagozytierbar [*Rosenthal*⁵⁾]. *Ledingham*⁶⁾ fand, daß ein mit Tb.-Bazillen behandeltes erhitztes normales Serum nach Entfernung der Tb.-Bazillen die opsonische Wirkung von frischem Serum auf Tb.-Bazillen hemmt. Er nimmt an, daß sich aus abgestoßenen Rezeptoren der Tb.-Bazillen und Immunkörpern des Serums A. A.-Komplexe bilden, die nun das Komplement des frischen Serums binden. Meines Erachtens ist hier die Hemmung durch unspezifische Serumadsorption zu erklären im Sinne der Vorzone bei der Agglutination.

Wenden wir uns nun zu den Bakteriotropinen des Immunserums, so verlieren diese beim Erhitzen auf 56—60° etwas von ihrer Wirkung. Da der gleiche Verlust nach Vorbehandlung des Serums mit A. A.-Komplexen eintritt, so dürfte er auf Komplementinaktivierung beruhen.

¹⁾ *H. Schütze*, Journ. of Hyg. **14**, 201 (1914).

²⁾ *Simon*, *Lamar* und *Bispham*, Journ. of exper. Med. **8**, 681 (1906).

³⁾ *Wright* und *Reid*, Proc. Roy. Soc. **77**, 211 (1905).

⁴⁾ *P. Mörch*, Acta path. scand. **3**, 285 (1930).

⁵⁾ *Rosenthal*, Zbl. Bakt. **44**, Beih. 14 (1909).

⁶⁾ *Ledingham*, Proc. Roy. Soc. B. **79**, 482 (1907).

Zerstört werden die Bakteriotropine erst bei ca. 70°. Die Tropinwirkung wird durch Komplement unterstützt. Nach *Dean*¹⁾ ist die Gesamtwirkung größer als die Summe der Wirkung von Tropinen und Komplement allein. Besonders spricht ein Versuch von *Browning*²⁾ für die fördernde Wirkung des Komplementes auf Tropin (Staphyl. + verd. Tropinserum, dann serumfrei gewaschen + Komplement: Verstärkte Phagozytose. Staphyl. + Komplement, dann serumfrei gewaschen + verd. Tropinserum: Keine Verstärkung der Phagozytose). Die Spezifität der Tropine ist die wie der anderen Antikörper. Auch hier kommt, wie bei der Agglutination, ein Übergreifen auf verwandte Mikroorganismen vor. Während die Immuntropine noch bei sehr hoher (über 1000facher) Verdünnung wirksam sind (*Neufeld*), verliert das normale Serum durch Verdünnung seine Wirkung sehr schnell, aber die opsonische Wirkung eines normalen frischen Serums kann oft stärker sein als die eines erhitzten Immunserums. Da nach *Neufeld* und *Bickel*³⁾ während der Immunisierung mit einem hämolytischen Serum zu verschiedenen Zeiten Phagozytose und Lyse in verschiedenem Grade beobachtet werden können, so schließt *Neufeld* aus diesen und anderen Versuchen, daß die Tropine, die ohne Komplement wirksam sind, verschieden sind von opsonisch wirkenden Immunstoffen, die zur Wirkung Komplement brauchen. Diese *Neufeld*'sche Ansicht wird nicht allgemein angenommen. *Muir* z. B. glaubt mit der Annahme eines Immunkörpers auszukommen. Meines Erachtens können beide Parteien Recht haben, insofern der Antikörper einheitlicher Natur ist, aber seine Auswirkung sich verschieden gestaltet je nach der Art des Globulins, an das er gebunden ist. Es ist allgemein anerkannt, daß die Immunisierung mit Zellen und größeren Partikeln opsonisch wirkende Antikörper erzeugt, die Komplement binden und, wie an anderer Stelle erörtert, ist es wahrscheinlich, daß großmizelliges Antigen relativ lyophobes und kleinzelliges Antigen relativ lyophiles Immunglobulin erzeugt. Ersteres allein ist fähig, die bekannten In-vitro-A. A.-Reaktionen hervorzurufen und auch Komplement zu binden, aber, wie am Beispiel des Antitoxins erörtert, kann der Antikörper als solcher einheitlich angenommen werden.

Ein näheres Eingehen auf die Bedeutung der Phagozytose für die natürliche und erworbene Immunität würde den Rahmen dieses Buches überschreiten.

Es soll nur kurz darauf hingewiesen werden, daß die Phagozytose für den Schutz des Organismus ungleich wichtiger sein dürfte als die bakterizide Eigenschaft des Serums, denn die Anzahl der Bakterienarten, die durch Serum-bakterizidie vernichtet werden können, ist relativ klein, während durch die Opsonierung und Tropinwirkung die Vernichtung der Mikroben durch andere

¹⁾ *Dean*, Proc. Roy. Soc. B. **79**, 399 (1907).

²⁾ *Browning*, Journ. med. Res. **19**, 201 (1908).

³⁾ *Neufeld* und *Bickel*, Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt **27**, 310 (1908).

zelluläre Kräfte ermöglicht wird. Aber man muß sich klar darüber bleiben, daß damit noch nicht alles in den Abwehrmaßnahmen des Organismus erklärt ist, z. B. auch nicht die Wirkung des Milzbrandserums. Wenn, wie *Löhlein* (1905), *Neumann* (1907), *v. Gruber* (1907) u. a. zeigten, virulente, aber in vitro phagozytische Milzbrandbazillen einem Organismus einverleibt werden, kommt es zunächst zu einer nachweisbaren Phagozytose, aber dann setzen von Seiten des Milzbrandbazillus Abwehrmaßnahmen ein, die zur Bildung von Aggressinen, Leukozidinen usw. führen, also Stoffen, die die Funktionsfähigkeit der phagozytierenden Zellen lähmen, wenn auch der Organismus imstande ist, dagegen Immunkörper zu bilden, und ferner bildet sich eine Kapsel um den Milzbrandbazillus, die ihn wegen der hohen Hydrophilie der Kapselsubstanz unangreifbar macht für alle Prozesse, die zunächst eine Adsorption von Globulinen bedingen, wozu auch die Phagozytose gehört, und damit kommen wir zu der Erörterung der Wirkungsweise opsonisch wirkender Serumstoffe.

Es herrscht Einigkeit darüber, daß die opsonische Wirkung auf einer Änderung der Oberfläche der Bakterien beruht, die eine vermehrte Adhäsionsfähigkeit an die Leukozyten bedingt. *Barikine*¹⁾, *Levaditi* und *Mutermilch* u. a.²⁾. Nach *Mudd*, *Lucké*, *Mc Cutcheon* und *Strumia*³⁾ bewirkt die Sensibilisierung durch Serum bei säurefesten Bakterien Zunahme der Agglomeration, Abnahme der elektrischen Potentialdifferenz, Abnahme der Benetzbarkeit der Bakterien gegenüber Öl und Zunahme der Phagozytose. Präzipitation, Agglutination, Änderung der Grenzflächenspannung und Phagozytose beruhen alle auf ein und demselben Vorgang, nämlich Anlagerung gewisser Substanzen seitens der Immunsere an die Oberfläche des homologen Bakterienantigens.

Die Bindung von Antikörpern an Antigen führt, wie an anderen Stellen schon erwähnt ist, zur Bildung einer Adsorptionshülle von relativ hydrophobem Globulin, wodurch die Grenzflächenspannung herabgesetzt wird. Auch hier spielen die Lipoide sowohl des Antigens [*Ischimoto*⁴⁾] als auch des Serums (*Hartley*) eine bedeutende Rolle. Ihre Entfernung verringert die Ausbildung für die Adsorption geeigneter Grenzflächen und setzt damit alle damit verbundenen In-vitro-A. A.-Reaktionen wie auch die Phagozytose herab. Die opsonische Wirkung des Antikörpers kann durch Komplement verstärkt werden, denn auch die Wirkung des Komplementes ist zunächst die Adsorption von Mittelstück—Globulin und schafft allein schon dadurch eine zur Adhäsion an die Leukozyten geeignete Grenzfläche. Alles, was die Hydrophilie der Globuline steigert, darunter auch das Erhitzen auf 56°, vermindert die Adhäsion und kann dadurch auch für die Phagozytose hemmend wirken. Die Antikörperwirkung besteht also in erster Linie in der Schaffung einer geeigneten hydrophoben Grenzfläche. Daher können nach *Reiner*

1) *Barikine*, Ztschr. Immunitätsforschg. 8, 72 (1910/11).

2) *Levaditi* und *Mutermilch*, Compt. rend. Soc. Biol. 68, 1079 (1910).

3) *Mudd*, *Lucké*, *Mc Cutcheon* und *Strumia*, Journ. gen. Physiol. 13, 669 (1930); Journ. of exper. Med. 49, 779, 797 (1929); 52, 313 (1930).

4) *Ischimoto*, Zbl. Bakt. 101, 425 (1927).

und *Kopp*¹⁾ mit 0,2—0,4 Proz. Tannin vorbehandelte Blutzellen stark phagozytiert werden, aber nach *Neufeld* und *R. Etinger-Tuöczynska*²⁾ bestehen zwischen der Wirkung von Tannin und anderer Chemikalien wie Alaun, Alum. sulfat, -nitrat, -chlorid, sowie anderer Salze mit vierwertigen Kationen (Th), dreiwertigen Kationen (Fe, Cr, Cl) und von zweiwertigen Kationen (Pb), ferner von basischen Farbstoffen (Methylenblau, Neutralrot) auf Bakterien und der Wirkung von Immunkörpern gewisse Unterschiede. Die durch chemische Stoffe zur Phagozytose präparierten Pneumokokken werden im Gegensatz zu den mit Immuns serum vorbehandelten in der Bauchhöhle der Maus nur in geringem Umfange phagozytiert. Auch die weitere Umwandlung phagozytierter Bazillen in Granula erfolgt nicht bei der Behandlung mit Aluminiumsalzen, wohl aber bei der Tanninphagozytose.

XI. Bakterizide und bakteriolytische Antikörper.³⁾

Das bekannte *Pfeiffer*'sche Phänomen beruht auf der Wirkung eines spezifischen thermostabilen Antikörpers, der seine Wirkung in vivo unter Mitwirkung aktivierender Peritonealexsudate (Komplement), aber auch in vitro unter Benutzung von Komplement entfalten kann. Die Wirkung des Immuns erums auf das Bakterium kann entweder in allen Abstufungen dessen Wachstum hemmen und schließlich den Tod ohne und mit Lyse oder Phagozytose zur Folge haben oder schließlich keins von beiden, so daß wir folgende Unterschiede machen können:

a) Spezifische Antikörper, die durch die homologen Bakterien absorbierbar sind, die mittels Komplement entweder Bakterien töten, wobei es auch von der Art der Bakterien abhängt, ob damit eine Auflösung verbunden ist oder nicht, oder die zur Phagozytose führen, die bei Opsoninen mit Komplement und bei Tropinen ohne oder mit Komplement erfolgen kann. Jedenfalls besteht kein prinzipieller Unterschied zwischen einem Tropin, das mit Komplement Phagozytose begünstigt oder einem antibakteriellen Antikörper, der Bakterien mit Hilfe von Komplement töten und evtl. auch lösen kann.

¹⁾ *Reiner* und *Kopp*, Ztschr. Immunitätsforschg. **61**, 397 (1929).

²⁾ *Neufeld* und *R. Etinger-Tuöczynska*, Zbl. Bakt. **114**, 252 (1929).

³⁾ Eine Zusammenstellung unseres Wissens auf diesem Gebiet gibt *Muir* in *A system of Bacteriology*, Bd. VI (London 1931).

b) Es gibt z. B. im Milzbrandserum schützende Antikörper, die nicht das homologe Bakterium angreifen, auch nicht durch dasselbe adsorbierbar sind und auch kein Komplement bedürfen.

Verhältnismäßig wenige Bakterien können durch Immuneserum direkt getötet und noch weniger gelöst werden. Besonders geeignet sind Cholera-vibrionen und Typhusbazillen, weniger gut Coli- und Dysenteriebazillen. Auch *Pyozyaneus* kann durch Antiserum gelöst werden. Dagegen sind Kokken und grampositive Bakterien gegenüber der bakteriziden Wirkung unempfindlich, können aber anderseits gut phagozytiert werden.

Wir haben im Abschnitt II B 1 bei den beigeßelten Bakterien das Geißel-H-Antigen von dem Soma-O-Antigen unterschieden. *Braun* bezeichnet diese Antigene als Ekto- bzw. Endoplasma. Nach *Felix* und *Olitzki*¹⁾ sind nur die O-Antisera bakterizid und die H-Antisera haben als Schutzstoffe keine Bedeutung. Entsprechendes fanden bei Tetanusbazillen und *Vibrio septique* *Felix* und *Robertson*²⁾, die, ebenso wie *Lubinski*³⁾, den allgemeinen Schluß ziehen, daß bakterizide und komplementbindende Antikörper nur durch Soma-Antigene gebildet werden können. Dasselbe gilt nach *Braun* und *Nodake*⁴⁾ auch für Bakteriotropine.

Noch reichlich ungeklärt sind die Beziehungen zwischen den bakteriziden Antikörpern und dem Komplement. An für und sich kann, wie wir gesehen haben, jeder A. A.-Komplex Komplement adsorbieren, nur bestehen relativ große Unterschiede, insofern z. B. sensibilisierte Blutzellen bei 0° kein oder nur wenig Komplement binden, ein spezifisches Präzipitat aber bei 0° mehr wie bei 37° (*Dean*). Ein bakteriolytisches Serum (Anticholera) vermochte in einem Versuch von *Neufeld* und *Händel* (1908) nur Komplement für den bakteriziden Effekt bei 37° zu binden, ohne aber das hämolytische Komplement zu absorbieren und Sera mit geringerer bakterizider Wirkung aber größerer Komplementbindungsfähigkeit banden bei 0° nur das hämolytische und bei 37° alles Komplement. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch ein Versuch von *Muir* und *Browning* (1909). Wurde ein normales frisches Serum mit einer Bakteriensuspension behandelt, so verschwand erst die bakterizide Wirkung gegenüber diesen Bakterien. Bei Benutzung einer größeren Bakterienmenge ging auch die bakterizide Wirkung gegenüber anderen Bakterien verloren, und schließlich gelang durch energische Behandlung mit diesen Bakterien auch die Absorption des hämolytischen Komplements. Sind diese Versuche nun zwingend, um eine Vielheit von Komplementen annehmen zu müssen? Meines Erachtens müßten sie sich einfacher erklären

¹⁾ *Felix* und *Oblitzki*, Journ. of Immun. **11**, 31 (1926); Brit. Journ. exper. Path. **10**, 26 (1929).

²⁾ *Felix* und *Robertson*, Brit. Journ. exper. Path. **9**, 6 (1928).

³⁾ *Lubinski*, Zbl. Bakt. **106**, 200 (1928).

⁴⁾ *Braun* und *Nodake*, Zbl. Bakt. **92**, 429 (1924).

lassen mit der Annahme verschieden leicht adsorbierbarer Globuline, die trotzdem die gleiche biologische Funktion nicht nur als Antikörper, sondern evtl. auch als Komplement ausüben.

Nach A. Fleming¹⁾ setzt Erhöhung wie Verminderung des Salzgehaltes die bakterizide Wirkung des Blutes *in vitro* herab. *In vivo* hat beim Menschen die Injektion einer Salzmenge, die den Salzgehalt des Blutes nur um 0,01 Proz. erhöht, nach 3 Stunden eine starke Erhöhung der bakteriziden Wirkung zur Folge. Vielleicht kann diese Tatsache die Beobachtung von G. J. Pfalz²⁾ erklären, wonach eine ganz bedeutende Vermehrung der Blutbakterizidie nach Laparotomien eintritt ganz unabhängig von den einzelnen zur Schmerzbetäubung verwandten Methoden und Substanzen.

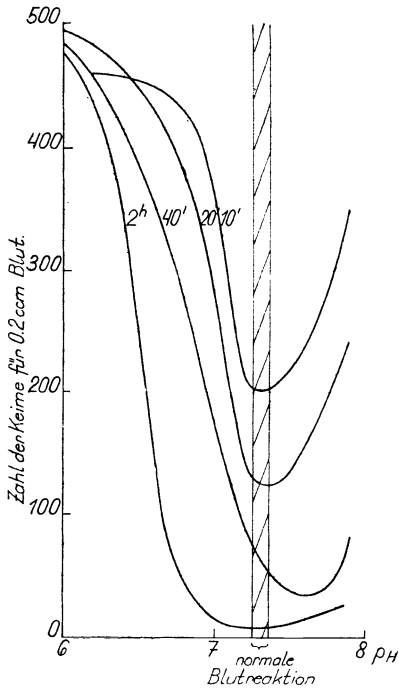


Fig. 20. Bakterizide Kraft von Kaninchenblut gegenüber Typhusbazillen nach verschieden langer Einwirkungszeit bei verschiedenem p_H [nach L. Boez, Compt. rend. Soc. Biol. **104**, 40 (1930)].

Die Feststellungen von Fleming erfuhren von Boez und Marneffe³⁾ eine Bestätigung. Bei einem NaCl-Gehalt von 8—10 Promille ist die Blutbakterizidie maximal, darunter und darüber (teils durch die Salzwirkung selbst) nimmt die bakterizide Wirkung ab. Nach A. S. Isralimski⁴⁾ entspricht jedem Salz eine gewisse Konzentrationszone, in der die Bakteriolyse stattfinden kann. Sie war bei $\text{NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2$. Die bakterizide Wirkung ist ferner deutlich abhängig von der H-Ionenkonzentration. Gegenüber Cholera-bazillen findet sie nach A. S. Isralimski nur zwischen $p_H = 6,2-7,7$ statt. L. Boez⁵⁾ untersuchte die Bakterizidie normalen Kaninchenblutes gegenüber Typhusbazillen nach verschiedener Inkubationszeit und bei verschiedener p_H . Aus der Fig. 20 geht deutlich die maximale Wirkung bei der normalen p_H des Blutes hervor. Boez

1) A. Fleming, Brit. Journ. of exper. Path. **7**, 274 (1926).

2) G. J. Pfalz, Klin. Wschr. **1930**, Nr. 29.

3) Boez und Marneffe, Compt. rend Soc. Biol. **106**, 358 (1931).

4) A. S. Isralimski, russ., ref. Chem. Zbl. **1**, 2746 (1930).

5) L. Boez, Compt. rend Soc. Biol. **101**, 848 (1929); **104**, 40 (1930).

und *Robin*¹⁾ empfehlen daher für die Blutkultur das Patientenblut in 2 ccm einer sauren Lösung (von 3,75 g Na-Zitrat, 5,60 g Kaliumbisulfat, Aqua dest. zu 100. $p_H = 2,38$) einfließen zu lassen. Die Blutreaktion beträgt dann p_H 5,3—5,5, wodurch die bakterizide Wirkung irreversibel zerstört wird. Das Blut wird dann zu Platten verarbeitet, indem 10 ccm Blut auf 100 ccm Traubenzuckeragar $p_H = 8,3$ genommen werden.

Bakterizidie ohne Komplement.

(Leukine, Endolysine, Plakine, β -Lysine, Lysozym).

Analog der Fähigkeit des Komplementes für sich allein Mikroben opsonieren zu können, scheint auch das Komplement allein gewisse bakterizide Wirkung zu besitzen. Aber auch ohne Komplement können gewisse Stoffe, die man aus Leukozyten gewinnen kann, Bakterien töten (nicht lösen). Diese als Leukine bezeichneten Stoffe unterscheiden sich durch ihre relative Thermostabilität und ihre Fähigkeit, Bakterien, wie z. B. Milzbrand, Pneumo- und Streptokokken ohne Vermittlung von spezifischen Antikörpern zu töten, soweit von Komplement, daß selbst wenn die diskutierte Möglichkeit bestände, daß in den Leukozyten Komplement vorkommt, die besondere Natur der Leukine als erwiesen gelten darf.

Erwähnt seien noch die anthrakoziden Endolysine aus Leukozyten und die ebenso wirkenden Plakine aus Blutplättchen (*Gruber* und *Futaki* 1907), die gleichfalls keine echten Antikörper sind, wenn auch sonst nichts bestimmtes über sie bekannt ist.

Hierher gehören auch die β -Lysine von *A. Pettersson*²⁾, die im Serum zahlreicher Tierarten vorkommen. Sie bestehen nach dem Autor aus einer aktivierenden Substanz, die etwas stabiler wie Komplement erst bei 63° zerstört wird, und einer aktivierbaren noch thermostabileren Substanz. Die erstere überwiegt in der Regel der Menge nach die letztere und muß unbedingt vorhanden sein, damit die aktivierbare Substanz sich mit den Bakterien verbinden kann. Letztere kann daher auch nicht aus einem inaktivierten Serum durch Bakterien absorbiert werden. *Pettersson* hält seine β -Lysine für verschieden von den oben genannten Leukinen, Plakinen und Endolysinen. Sie sind wirksam gegen Anthrax-, subtilis-, murisepticus-Bakterien, wie auch gegen verschiedene Anaeroben.

1922 beschrieb *Fleming*³⁾ eine fermentative, von ihm als Lysozym bezeichnete Substanz, die in den Organextrakten von Menschen und Tieren sowie in einigen Pflanzen vorkommt. Obgleich Lysozym auch gegenüber einigen pathogenen Bakterien wirksam ist, so läßt sich seine ganz außerordentliche bakteriolytische Fähigkeit am leichtesten gegenüber einigen Saprophyten zeigen, obwohl unter diesen sehr verschiedene Grade der Empfindlichkeit bestehen. *Fleming* fand eine zitronengelbe Sarzine, die er *Micrococcus lysodeicticus* bezeichnete, die in ungewöhnlich hohem Maße gelöst wird.

Das Lysozym findet sich beim Menschen in hoher Konzentration vor allem in den Tränen, dann im Knorpel und weiterhin in allen Sekreten, ausgenommen Urin, Schweiß, Liquor cerebrospinalis, ferner kommt es in allen Geweben vor. In außerordentlich hoher Konzentration ist Lysozym im Hühnereiklar. Das

¹⁾ *Boez* und *Robin*, Compt. rend. Soc. Biol. **101**, 1009 (1929).

²⁾ *A. Pettersson*, Ztschr. Immunitätsforsch. **40**, 43, (1924); **48**, 233 (1926); **54**, 292 (1927); Zbl. Bakt. **106**, 294 (1928).

³⁾ *Fleming*, Proc. Roy. Soc. B. **93**, 315 (1922); Lancet **1**, 217 (1929).

Verhalten von Hühnereiklar gegenüber *Micr. lysodeicticus* ähnelt sehr der Fähigkeit von Hühnereiklar, Saprophyten der Anthrax-subtilis-Gruppe mit großer Geschwindigkeit zu zerstören [*Laschtenko*¹⁾, *Rettger* und *Sperry*²⁾]. Außer dem *M. lysodeicticus* sind besonders Enterokokken leicht lösbar, dagegen nicht Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe.

Was die physikalischen Eigenschaften von Lysozym betrifft, so kann es durch eiweißfällende Mittel ausgefällt werden und soll von *Wolff*³⁾ in eiweißfreiem Zustand hergestellt worden sein. Es ist relativ thermostabil, braucht etwa 75°, in Tränen sogar Kochhitze, zur völligen Zerstörung. 0,5 Proz. NaCl begünstigt die Bakteriolyse stark, bei 5 Proz. NaCl ist Lysozym wirkungslos, ebenso in salzfreiem Milieu [*O. Andersen*⁴⁾]. Nach *Z. W. Jermoljewa* und *J. S. Bujanowskaja*⁵⁾ ist Lysozym nicht dialysabel, adsorbierbar durch Zellulose, Kieselgur, Kaolin, Kohle, Bolusalba usw. Mit steigender Temperatur nimmt die Lysozymwirkung stark zu, von 17—37° um das 8fache. Es enthält ein proteolytisches Ferment, das nach Reinigung und bei einem sehr geringen Amino-Stickstoffgehalt eine Wirksamkeit von $1:7 \times 10^6$ hatte.

Nach *Friedberger* und *F. Hoder*⁶⁾ wird das Lysozym nicht in merklicher Weise von den dafür empfindlichen Bakterien gebunden, so daß eine Erschöpfung des Eiklars an Lysozymwirkung selbst mit dem *Micr. lysodeicticus* nicht gelang. Werden Bakterien nicht gelöst oder nur wenig, so wird selbst in hohen Verdünnungen von Eiklarlösungen eine Flockung beobachtet, die mit der Lysozymwirkung eng verknüpft zu sein scheint, insofern Erhitzen und Erhöhung der Salzkonzentration beide Wirkungen in gleicher Weise hemmt und aufheben kann, so daß es den Anschein hat, als wären Lysozym- und Flockungswirkung verschiedene Äußerungen desselben Prinzips. [Es könnten hier gewisse Beziehungen zu dem *Thomsen*'schen Phänomen bei der Hämagglutination bestehen.]

Analog wie gegenüber Bakteriophagen gelang es auch Lysozym-resistente Stämme zu züchten. *Fleming* fand, daß solche gegen Hühnereiklar resistente Stämme auch gegenüber der bakteriziden Kraft des Gesamtblutes resistent geworden waren.

Zwischen den Leukinen und β -Lysinen und dem Lysozym gibt es manche Analogien, die auf gewisse Ähnlichkeit dieser Stoffe schließen lassen wie die beträchtliche Thermostabilität, die gewisse Beschränkung der Wirkung auf Saprophyten und deren ungewöhnlich schnelle Vernichtung und der Umstand, daß keine dieser Stoffe in ihrer Wirkung sich immunisatorisch steigern lassen.

Weitere Forschung auf diesem Gebiete muß zeigen, inwieweit diese Stoffe verschieden sind und ob ihnen eine gemeinsame Grundlage in Form einer Mikrozytase (*Fleming*) zukommt. Wegen der hohen bakteriziden Kraft des Duodenalsaftes [*Löwenberg*⁷⁾] wäre auch dieser Stoff einzubeziehen.

1) *Laschtenko*, Ztschr. Hyg. **64**, 419 (1909).

2) *Rettger* und *Sperry*, Journ. med. Res. **26**, 55 (1912).

3) *Wolff*, Ztschr. Immunitätsforsch. **50**, 88 (1927); **54**, 188 (1928).

4) *Oluf Andersen*, Ztschr. Immunitätsforsch. **70**, 90 (1931).

5) *Z. W. Jermoljewa* und *J. S. Bujanowskaja*, Zbl. Bakt. **122**, 267 (1931).

6) *Friedberger* und *F. Hoder*, Ztschr. Immunitätsforsch. **74**, 429 (1932).

7) *Löwenberg*, Ztschr. Hyg. **108**, 1 (1928).

XII. Toxine und Antitoxine.

1. Die Toxin-Antitoxinbindung.

Es sollen hier nicht die verschiedenen bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Toxine und deren Antitoxine erörtert werden, ebensowenig die Technik ihrer Auswertung¹⁾, sondern in erster Linie die serologischen Reaktionen zwischen Toxinen und Antitoxinen und auch diese nur soweit sie mehr grundlegende Probleme der Serologie berühren. Da wir die antigenen Toxine, besonders bakterieller Natur, in reiner Form noch nicht kennen, sondern unter Toxinen das Kulturfiltrat verstehen, das mehr oder weniger durch Fällungs- und Filtrationsverfahren gereinigt sein kann oder durch Formoleinwirkung in bekannter Weise als (Anatoxin) Formoltoxoid (im folgenden als Toxoid bezeichnet) unter völligem Erhalten der antigenen Eigenschaften entgiftet ist, so seien die folgenden Erörterungen unter besonderer Berücksichtigung des Diphtherie- oder Tetanusgiftes gemacht. Mit diesen Giften ist wissenschaftlich am meisten gearbeitet worden und, soweit man übersehen kann, bestehen zwischen diesen und den anderen Toxinen, was ihre Reaktionen mit Antitoxin betrifft, keine prinzipiellen Unterschiede.

Man hat bis vor kurzem die Antitoxine, da sich die bei Antikörpern üblichen Nachweise *in vitro* mit ihnen nicht vornehmen ließen, als besondere Antikörper aufgefaßt mit der besonderen Fähigkeit, das Gift, dem sie ihre Entstehung verdanken, binden und neutralisieren zu können. Diese Sonderstellung der Antitoxine ist heute nicht mehr gerechtfertigt. Im Gegenteil kann man heute mit Antitoxinen unter geeigneten Versuchsbedingungen die meisten *Invitrophänomene* der A. A.-Reaktionen ausführen wie mit den anderen Antikörpern.

Bekanntlich bedeutet die Bindung von Antitoxin an Toxin nicht dessen Zerstörung, sondern die Bindung ist reversibel, durch verdünnte Säure (*Morgenroth*), durch Phenol und Gefrieren oder Erwärmen (*Glenny*), durch Verdünnung (*Otto* und *Sachs*), durch Zusatz von Toxoid (*Kraus*, *H. Schmidt*, *S. Schmidt*, *Ramon* u. a.). Sowohl das Gift wie auch das Antitoxin können für sich aus der Toxin-Antitoxin-(T. A.)-Bindung befreit werden. Die Bindung selbst beruht auf der zwischen Antigen und Antikörper vorhandenen spezifischen Affinität und ist ein Adsorptionsprozeß, der aber innerhalb weiter Grenzen (solange Gift in flüssiger Form benutzt wird) multiple Proportionen einhält, auf die unsere Meßverfahren von Toxinen und Antitoxinen aufgebaut sind. Durch eine gewisse Antitoxinmenge wird ein Gift neutralisiert, insofern die Einspritzung eines solchen neutralen T. A.-Gemisches bei Tieren reaktionslos vertragen wird. Trotzdem ist eine solche neutrale Mischung für das Tier nicht gleichgültig, denn im Organismus findet wahrscheinlich eine Aufspaltung statt, wobei das Toxin seine immunisatorische Wirkung entfalten kann. Vielleicht wirkt aber der T. A.-Komplex als solcher in diesem Sinne.

¹⁾ Diese ist ausführlich dargestellt in *H. Schmidt*, Die Praxis der Auswertung von Toxinen und Antitoxinen (Jena 1931).

Die theoretisch besonders interessante Frage war nun nach der Art dieser T. A.-Bindung, die trotz Erhaltung des Giftes dessen Neutralisation bewirkt. Die Schwierigkeit, die Frage experimentell zu klären, lag in dem Umstand, daß das Gift flüssig ist und nur einen wahrscheinlich sehr kleinen Teil des Kulturfiltrates ausmacht, dessen übrige Bestandteile sich vielfach störend bei den serologischen Reaktionen bemerkbar machen. Es war daher von großer Bedeutung, daß es gelang, Toxine an Kolloidiumteilchen zu adsorbieren (*J. Freund*). Solche Toxin-beladene Kolloidiumteilchen sind als solche giftig und verhalten sich in jeder Hinsicht wie feste größere Toxinmizellen, mit denen man besser experimentell arbeiten konnte, weil man sie u. a. zum Beispiel durch Zentrifugieren aus dem Reaktionsgemisch entfernen konnte.

Es gelang *J. Freund*¹⁾, die bekannte Präzipitation von flüssigem Diphtherietoxin durch Antitoxin, dadurch daß das Toxin an Kolloidiumteilchen adsorbiert wurde, die dann gründlich gewaschen und in NaCl-Lösung resuspendiert waren, in eine spezifische Agglutination dieser Kolloidiumteilchen zu verwandeln. Die mit Toxin beladenen Kolloidiumteilchen konnten durch Antitoxin entgiftet werden, d. h. es gelang der Nachweis, daß Toxin gewissermaßen in fester Phase durch Antitoxin neutralisiert werden konnte. Aber die ganz besondere und praktisch wie theoretisch gleich wichtige Bedeutung dieser Feststellung liegt in der gleichfalls von *J. Freund* gemachten Beobachtung, daß die Reihenfolge der Adsorption für das Ergebnis der Neutralisation maßgebend ist.

J. Freund behandelte gewaschene Kolloidiumteilchen (von der Größe von Staphylokokken)

- a) Zuerst mit Tetanusantitoxin und dann mit Toxin;
- b) zuerst mit normalem Serum und dann mit Toxin;
- c) zuerst mit Tetanus-Antitoxin, dann mit Toxin und dann wieder mit Antitoxin;
- d) mit Toxin allein.

Dann war in der Regel die Giftigkeit der so behandelten Kolloidiumteilchen $a > d > b > c$. Ähnliche Versuche mit gegenseitiger Kombination von Diphtherie- und Tetanustoxin und deren Antitoxine führten *J. Freund*²⁾ zu folgenden summarischen Ergebnissen:

An Kolloidiumteilchen adsorbiert	In Lösung	Die Kolloidiumteilchen waren im Tierversuch
I Diphtherietoxin	+ Diphtherieantitoxin	nicht giftig
II Diphtherietoxin	+ Tetanusantitoxin	giftig
III Diphtherieantitoxin	+ Diphtherietoxin	giftig
IV Tetanusantitoxin	+ Diphtherietoxin	nicht giftig
V Tetanustoxin	+ Tetanusantitoxin	nicht giftig
VI Tetanustoxin	+ Diphtherieantitoxin	giftig
VII Tetanusantitoxin	+ Tetanustoxin	giftig
VIII Diphtherieantitoxin	+ Tetanustoxin	nicht giftig

¹⁾ *J. Freund*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **28**, 65 (1930).

²⁾ *J. Freund*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **28**, 1010 (1931); Journ. of exper. Med. **55**, 181 (1932).

Diese zunächst etwas überraschenden Ergebnisse (die ich experimentell voll bestätigen konnte), lassen sich auf Grund der Vorstellungen von *J. Freund* folgendermaßen erklären:

Ein Gift kann nur dann neutralisiert werden, wenn es als Adsorbens dienend Antitoxin adsorbiert, so daß, bildlich gesprochen, die Toxinmizelle von einem Außenwall von Antitoxin umgeben ist. Ist dies nicht der Fall, sondern bildet das Antitoxin als Adsorbens den Kern mit einer äußeren gebundenen Hülle von Toxin, dann wirkt der Komplex toxisch. Daß in obiger Tabelle IV und VIII nicht toxisch wirken, liegt daran, daß mangels spezifischer Affinität für das Toxin kein Grund zur Bindung an das mit Antitoxin beladene Kollodiumteilchen vorlag, und daß der gewissermaßen unspezifisch adsorbierte Teil durch den Waschungsprozeß der Teilchen am Schluß des Versuchs wieder zum größten Teil entfernt wurde.

Nun könnte man daran denken, daß eine Eluierung des an die Toxin-kollodiumteilchen gebundenen Antitoxins zur Herstellung besonders reiner Antitoxinlösungen führen könnte, aber nach bisherigen orientierenden Versuchen scheint die Bindung von Antitoxin an Toxin fester zu sein als die Toxin-Kollodiumbindung, weswegen der ganze T. A.-Komplex eluiert wird. Jedenfalls sprechen quantitative Versuche¹⁾ dafür, daß das Toxin durch die Adsorption an Kollodium einen Teil seiner Bindungsaffinität zu Antitoxin verloren hat.

Toxine können bekanntlich durch verschiedene Stoffe (Tierkohle, kolloides Fe(OH)₂, Kaolin usw.) adsorbiert werden [*Zuntz*²⁾, *S. Schmidt*³⁾ u. a.]. Das an Kohle adsorbierte Toxin vermag viel geringere Mengen Antitoxin aufzunehmen als die unvorbehandelte Kohle, und die Kohle-Toxin-Komplexe sind nur durch einen großen Überschuß von Immunsérum zu neutralisieren [*Eisler*⁴⁾]. Auch die verschiedenen Antitoxine verlieren durch die Adsorption an Kohle vollständig das Bindungsvermögen für ihre homologen Toxine. Unter Einhaltung geeigneter Versuchsbedingungen vermag aber das an Kohle adsorbierte antitoxische Pferdesérum Pferdeeiweißantikörper zu binden [*Eisler*⁴⁾].

Die Vorstellung einer Neutralisierung des Toxins durch Umhüllung entspricht der von *Larson*⁵⁾ zur Erklärung seiner Beobachtung der Entgiftung von Toxinen durch Na-Rizinoleat und verwandte kapillaraktive Substanzen. In diesem Zusammenhang seien auch die auf S. 80 zitierten Versuche von *F. S. Jones* erwähnt.

Die Beobachtung und Erklärung, daß ein T. A.-Komplex nur dann nicht toxisch ist, wenn das Antitoxin die Außenhülle darstellt, macht auch verständlich, warum das Danysz-Phänomen nicht umkehrbar ist.

¹⁾ *H. Schmidt*, unveröffentlicht.

²⁾ *Zuntz*, Ztschr. Immunitätsforsch. **19**, 326 (1913).

³⁾ *S. Schmidt*, Compt. rend. Soc. Biol. **103**, 1296 (1930).

⁴⁾ *Eisler*, Biochem. Ztschr. **135**, 416 (1923); **150**, 350 (1924).

⁵⁾ *Larson* und *Eder*, Journ. Amer. Med. Assoc. **86**, 998 (1926).

Das von *Danysz* beobachtete Phänomen besteht darin, daß, wenn zu einer bestimmten Antitoxinmenge eine bestimmte Toxinmenge zugefügt wird, die Mischung dann toxischer ist, wenn das Toxin fraktioniert zugegeben wird, als wenn es auf einmal zugegeben wird. Wird jedoch das Antitoxin fraktioniert zu Toxin gegeben, dann ist die Giftigkeit nicht größer, wie wenn man es auf einmal zugegeben hätte. Bei fraktioniertem Zusatz von Toxin dient die Antitoxinmizelle als Adsorbens und bei fraktioniertem Zusatz von Antitoxin ist das Toxin das Adsorbens.

Versuche, ob man mit Tannin auf Gift eine ähnliche Wirkung erzielen kann, wie die durch spezifisches Antitoxin, führten *Freund*¹⁾ zu folgenden Ergebnissen:

Mit Di.-Toxin beladene Kollodiumteilchen wurden behandelt mit Tanninverdünnungen 1:200, 1:400 usf. bis 1:51200. Bei den Verdünnungen 1:200 sowie 1:3200—1:12800 gaben die so behandelten Kollodiumteilchen keine intrakutane Reaktion bei Meerschweinchen. Es fand sich also eine lange Vorzone und ein ausgesprochenes Maximum für die entgiftende Wirkung von Tannin. Entsprechendes hatten *Reiner* und Mitarbeiter²⁾ sowie *Freund* (1929) für die Wirkung von Tannin auf die Agglutination roter Blutzellen, Komplementhämolyse und Phagozytose gefunden³⁾. Analog ließ sich auch an Kollodiumteilchen adsorbiertes Tetanustoxin durch Tannin entgiften mit einem Optimum bei 1:6400. Verringert man aber die Toxinmenge durch Verdünnung in Betracht, daß die Kollodiumteilchen nur eine geringe Menge Toxin adsorbieren, so war Tannin noch in sehr hohen Verdünnungen bis 1:51200 gegenüber Tetanustoxin wirksam. Von großem Einfluß ist dabei die Reaktion des Mediums, insofern die für die dehydratisierende Wirkung des Tannins verantwortlichen Phenolgruppen in alkalischem Milieu zu Phenolaten umgewandelt sind [*Kruyt* und *Bungenberg de Jong*⁴⁾]. Dementsprechend hatte Tannin auf hochverdünntes Tetanustoxin bei p_H 8,0 nur eine geringere Wirkung, nämlich bei 1:200 und 1:400 Verdünnung ohne Vorzone.

Die entgiftende Wirkung von Tannin muß als Adsorption an das Toxin gedeutet werden, wobei in vollkommener Analogie zu der Wirkung von Antikörpern die Giftmizellen hydrophober werden. Selbst eine der T. A.-Präzipitation entsprechende Flockung, wenn auch nicht so ausgeprägt, konnte *Freund* mit Toxin-Tannin-Mischungen erzielen. Entsprechend dieser Art der Neutralisation durch Adsorptionshülle ist wie beim T. A.-Komplex das durch Tannin entgiftete Toxin noch als Antigen wirksam und auch wieder gewinnbar, während die Entgiftung von Toxin durch Formol erstens sehr viel längere Zeit beansprucht und dann irrever-

¹⁾ *Freund*, Journ. of Immun. **21**, 127 (1931).

²⁾ *L. Reiner* und *O. Fischer*, Ztschr. Immunitätsforsch. **61**, 317 (1929); *L. Reiner* und *H. Kopp*, ebenda S. 397; *L. Reiner* und *L. Strillich*, ebenda S. 405; *L. Reiner*, ebenda S. 459.

³⁾ Die Wirkung von Tannin auf rote Blutzellen ist relativ schwach. Tannin-Phagozytose erst nach 2 Stunden gegenüber 15 Minuten bei Immunsrum.

⁴⁾ *H. R. Kruyt* und *H. G. Bungenberg de Jong*, Ztschr. physik. Chem. **100**, 250 (1922).

sibel ist, insofern es bis heute noch nicht gelang, ein Formoltoxoid wieder giftig zu machen.

Aus allen diesen Versuchen geht also hervor, daß Antitoxin sich dem homologen Antigen gegenüber, sofern das Antigen nur in fester Form entsprechend einer Bakterienzelle vorliegt, wie ein Agglutinin verhalten kann, und nichts scheint der Annahme zu widersprechen, daß der Reaktionsmechanismus in diesen Antitoxin-Kolloidiumtoxin-Reaktionen der gleiche ist, wie wir ihn bei der Agglutination und Präzipitation annehmen, und wie er auch der Adsorption der syphilitischen Antikörper an Lipoidteilen entspricht.

Aber das Antitoxin zeigt von den anderen in vitro nachweisbaren Antikörpern auch einige Besonderheiten, die, wie wir sehen werden, wahrscheinlich dadurch bedingt sind, daß Antitoxine wenigstens zum Teil an hoch lyophilen Globulinen des Serums gebunden sind und dadurch vielleicht mit den durch Pneumokokkenpolysacchariden bei Tieren erzeugten Schutzstoffen gewisse Analogien aufweisen (S. 39). Diese Besonderheit liegt darin, daß hochgereinigte und nur aus lyophilen Pseudoglobulinen bestehende antitoxische Sera mit Toxin keine Präzipitation geben und höchstwahrscheinlich auch die obigen Versuche von *Freund* mit an Kolloidium gebundenen Toxinen teilweise, wenigstens was die Agglutination betrifft, nicht zulassen.

Die Toxin-Antitoxin-Flockung¹⁾.

Die von *A. Calmette* und *Massol* (1909), *Nicolle*, *Débains* und *Césari* (1919) und *W. Georgi* (1920) unabhängig voneinander entdeckte Toxin-Antitoxin-Flockung ist nur eine Teilerscheinung der schon früher von *R. Kraus* gemachten Beobachtung, daß Bakterienkulturfiltrate mit ihrem homologen Antiserum eine Präzipitation geben. Die Erscheinung gewann aber erst größere Bedeutung, als *Ramon* (1922) sie zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin vorschlug. Seitdem ist es gelungen, mit fast allen bekannten antigenen Toxinen und deren Antitoxinen Flockungsreaktionen anzustellen. Die größte Bedeutung hat die Flockung aber bei Diphtherietoxin und Antitoxin behalten und alle grundlegenden Beobachtungen und gewonnenen Erkenntnisse in der Natur dieser Reaktion sind bei der Diphtherieflockung gemacht worden, weswegen der folgenden Erörterung nur diese zugrunde gelegt werden soll.

Wenn auch die T. A.-Flockung, als kolloidchemisches Phänomen genommen, eine Menge Analogien zu der als spezifische Präzipitation bekannten A. A.-Reaktion hat, so weist sie doch eine Reihe von Besonder-

¹⁾ Die Literatur findet sich, außer in den zitierten Arbeiten in den Arbeiten von *H. Schmidt* und *W. Scholz*: *Arch. Hyg.* **95**, 308, 339; **96**, 172, 185, 251, 294 (1925); *Ztschr. Immunitätsforsch.* **48**, 217 (1926); **58**, 98 (1928); **64**, 193, 226 (1929); **73**, 475, 494, 505, 517 (1932).

heiten auf, die in ihrem Wesen noch keineswegs als endgültig geklärt gelten dürfen.

Die T. A.-Flockung wird gewöhnlich zur Auswertung von Antitoxin so angestellt, daß zu gleichen Mengen eines Toxins fallende Mengen eines Antitoxins zugesetzt werden und die Mischungen nach gutem Durchschütteln in einem Wasserbad bei ca. 45° gehalten werden, bis zeitlich in einem „Indikatorröhrchen“ die erste Flockung auftritt, die dann bei weiterem Stehen sich auf eine Anzahl Röhrchen ausdehnt und somit eine Flockungszone entsteht. Ist von dem Gift der Lf-Wert, diejenige Menge, die mit einer Antitoxineinheit flockt, bekannt, läßt sich der AE-Gehalt des Serums bestimmen und, wenn letzterer bekannt, auch der Flockungswert eines Giftes.

Diese Art von Wertbestimmung setzt die Annahme von *Ramon* voraus, daß die Flockung zuerst da eintritt, wo das Antitoxin die gegebene Toxinmenge gerade völlig genau neutralisiert hat. Vergleicht man damit die spezifische Eiweiß-Antieiß-Präzipitation, so besteht dort ein ebenfalls quantitatives Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper für die optimale Präzipitation, aber die größte Präzipitatemenge bildet sich nicht dort, wo das A. A.-Verhältnis für die Reaktionsgeschwindigkeit optimal ist. Bei der im ganzen spärlichen Präzipitatemenge bei der T. A.-Flockung kann leicht die zuerst sichtbare Flockung für das Optimum gehalten werden, während sie nur die größere Präzipitatemenge darstellt, und die optimale Flockung kaum sichtbar ist. Dies allein erklärt aber keineswegs die von *Glenny* und Mitarbeitern, *Moloney* und *Beecher-Weld*, *Zingher*, *Bronfenbrenner* und *Reichert* u. a., beobachteten Unstimmigkeiten zwischen den durch Flockung und Tierversuch ermittelten Werten. Nach *Glenny* ist der Flockungswert ein Maß für die Bindungsfähigkeit zwischen Toxin und Antitoxin, während die Tierversuche nur eine partielle Neutralisation zu messen gestatten. Es erübrigt sich, an dieser Stelle näher auf diese Wertbestimmungsfragen einzugehen, da sie mit dem rein serologischen Phänomen der Flockung nichts zu tun haben. Die T. A.-Flocken sind für das Tier neutral, enthalten aber nachweislich sowohl Toxin als Antitoxin und sind daher für die aktive Schutzimpfung geeignet (*H. Schmidt* und *W. Scholz*, *P. Hartley* u. a.).

Der T. A.-Komplex ist auch in Form der Flocken reversibel. *Ramon*¹⁾, wie auch *Modern* und *Wernicke*²⁾ konnten aus den Flocken Antitoxin wieder gewinnen und durch Toxoidzusatz kann jede T. A.-Verbindung, also auch die Flocken, wieder toxisch gemacht werden [*H. Schmidt* und *W. Scholz*³⁾, *S. Schmidt* und *Madsen*⁴⁾, *Ramon*⁵⁾]. Durch den gleichen Kunstgriff mittels Toxoid ließ sich nachweisen, daß auch bei optimaler

1) *Ramon*, Compt. rend. Acad. Scienc. **176**, 267 (1923).

2) *Modern* und *Wernicke*, Rev. Soc. argent. Biol. **6**, 241 (1930).

3) *H. Schmidt* und *W. Scholz*, Ztschr. Immunitätsforsch. **64**, 226 (1929).

4) *S. Schmidt* und *Madsen*, Compt. rend. Soc. Biol. **102**, 1091, 1095 (1929).

5) *Ramon*, Compt. rend. Soc. Biol. **104**, 31, 41; **106**, 173 (1930).

Flockung in der überstehenden Flüssigkeit stets Toxin und Antitoxin nachweisbar ist [*H. Schmidt* und *W. Scholz*¹⁾], während nach *Dean* und *Webb* bei streng optimaler Eiweiß-Antieiß-Präzipitation beide Komponenten aus der überstehenden Flüssigkeit verschwinden. Die Ursache dafür ist, wie weiter unten näher ausgeführt wird, daß sich das an Pseudoglobulin gebundene Antitoxin nicht an der Flockung beteiligt, sondern als T. A. in Lösung bleibt.

Die Flockungsgeschwindigkeit wurde von *Ramon* sowie auch von *Madsen* und *S. Schmidt* hoch bewertet als ein geeignetes Maß für die Avidität von Antitoxin zu Toxin und umgekehrt, und es ist zweifellos, daß Toxine oder Toxoide von gleichem Bindungswert, sowie auch Antitoxine von gleichem Antitoxingehalt sich bezüglich der Geschwindigkeit, mit der sich die T. A.-Flockung unter sonst gleichen Umständen vollzieht, sehr verschieden verhalten können. Es ist aber meines Erachtens abwegig, daraus auf verschiedene Avidität der Antitoxine zu Toxin zu schließen und noch mehr, diese Avidität mit der therapeutischen Wirkung des Antitoxins in Beziehung zu bringen, denn erstens hängt das Zustandekommen der Flockung überhaupt sowie die Geschwindigkeit, mit der sich der Agglomerations- und Flockungsprozeß der A. A.-Komplexe vollzieht, von einer Reihe verschiedenartiger Faktoren sowohl im Toxin wie im Serum ab, und zweitens muß man den Bindungsprozeß zwischen Toxin und Antitoxin von dem Flockungsprozeß scharf trennen, denn, wie wir weiter unten sehen, ist es sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Eignung eines Antitoxins für die Flockung in erster Linie abhängt von der Art der Globuline, an die es gebunden ist.

Wollte man zwischen Antitoxinen bzgl. der Avidität zu Toxin Unterschiede machen, dann würde man logisch zu der Schlußfolgerung gelangen müssen, daß die spezifische Affinität, die Antitoxin zu binden vermag und die wir, mangels besseren Wissens, als eine chemische Affinität ansprechen müssen, nicht konstant ist, d. h. also, um ein Analogon aus der Chemie zu benutzen, die Kraft, die unter sonst gleichen Umständen zwei Moleküle zu einem Doppelsalz bindet, ist nicht immer die gleiche, und einen solchen Schluß zu ziehen erlauben die Tatsachen nicht.

Die Flockungsgeschwindigkeit hängt zunächst von der Temperatur ab, sie steigt mit höherer Temperatur. Von ca. 58° an tritt eine Verlangsamung ein, und bei noch höheren Temperaturen wird die Flockung unregelmäßig und verschwindet schließlich. Es ist aber interessant, daß der T. A.-Komplex als solcher sehr viel hitzebeständiger ist als die Komponenten allein, denn schon mäßiges Erhitzen nimmt dem Toxin wie auch dem Antitoxin seine Flockungsfähigkeit. Auf die Wirkung erhöhter Temperatur auf die Flockungsfähigkeit des Serums kommen wir weiter unten nochmals zurück.

¹⁾ *H. Schmidt* und *W. Scholz*, Ztschr. Immunitätsforsch. 64, 226 (1929).

Noch interessanter ist die von *Renaux*¹⁾ beim Serum, von *Ramon*²⁾ beim Toxin beschriebene und in der Folge von allen Untersuchern bestätigte Tatsache, daß erhitzte Sera und Toxine zwar allein mit frischem Toxin resp. Serum nicht flocken, wohl aber sich quantitativ an der Flockung beteiligen, wenn man sie mit frischem Serum und Toxin mischt. Ist das Mischungsverhältnis bekannt, kann man dadurch auch an und für sich nicht flockende Sera und Toxine auswerten. Die Flockung ist jedoch um so mehr verlangsamt, je größer das Verhältnis von erhitztem zu nicht erhitztem Serum resp. Toxin in der Mischung ist. Ähnliches ist bei der spezifischen Eiweißpräzipitation nicht bekannt. Dort kennt man zwar mit erhitztem Eiweiß hergestellte Präzipitine, die auch nicht erhitztes Eiweiß präzipitieren, aber mit erhitztem Toxin sind meines Erachtens noch keine Antisera hergestellt, und es wäre von theoretischem Interesse festzustellen, ob Toxine, die so lange resp. so hoch erhitzt sind, daß sie ihre Giftigkeit völlig verloren haben, sich noch im Mischungsversuch bei der Flockung beteiligen können und andererseits noch Antikörper zu erzeugen imstande sind, wenn sie auch allein nicht mehr flocken, doch mit frischem antitoxischem Serum gemischt, quantitativ an dem Prozeß teilnehmen. Es liegt nun eine noch nicht anderweitig bestätigte Angabe von *Archiepoff* und *Nowgorodskaja*³⁾ vor, der zufolge mit nicht flockendem Toxin auch ein nicht flockendes Serum gewonnen würde. Es ist aber zu bemerken, daß der Mischversuch von *Renaux* und *Ramon* nicht immer den berechneten Titer durch die Flockung wiedergibt, denn *S. Schmidt*⁴⁾ fand mitunter bei Seren auch bedeutende Abweichungen.

Ferner ist die Flockungsgeschwindigkeit von der Art des Toxins abhängig. Es gibt gut und schlecht flockende Toxine. Alte Toxine sind nicht mehr gut geeignet. Formoltoxioide flocken oft langsamer. Der Bouillon Nährboden ist auch von Einfluß. Zweifellos sind Martin-Bouillon oder ähnlich hergestellte Nährböden zur Erlangung gut flockender Toxine besonders geeignet [*S. Schmidt*⁵⁾].

Was den Einfluß von Elektrolyten auf die Flockungsgeschwindigkeit sowie auf die Stabilität der T. A.-Bindung betrifft, so verdanken wir *S. Schmidt*⁶⁾ einige ausführliche Arbeiten, denen folgendes entnommen sei:

Der Wärmeeinfluß auf die Stabilität und das Flockungsvermögen des Diphtherietoxins ist abhängig von der H-Ionenkonzentration. Bei 0° geht die Zerstörung sehr langsam vor sich, solange p_H 5,5—10 ist. Bei p_H 5,5 nimmt das Flockungsvermögen stark ab, kann aber wieder zunehmen, wenn das Toxin bei 0° und normaler p_H längere Zeit steht. Bei höherer Temperatur wird die

1) *Renaux*, Compt. rend. Soc. Biol. **90**, 964 (1924).

2) *Ramon*, Ann. Inst. Past. **37**, 1001 (1923).

3) *Archiepoff* und *Nowgorodskaja*, russ. ref. Zbl. Bakt. **87**, 101 (1927).

4) *S. Schmidt*, Ztschr. Immunitätsforsch. **66**, 292 (1930).

5) *S. Schmidt*, Ann. Inst. Past. **39**, 875 (1925).

6) *S. Schmidt*, Ztschr. Immunitätsforsch. **66**, 292, 506; **67**, 197 (1930).

obige Zone enger, bei 20° p_H 6—9, bei 37° p_H 6,5—8,5. Bei p_H 7 findet bei 37° die geringste Zerstörung des Toxins statt. Bei 55—60° ist das Toxin bezüglich Flockungsfähigkeit und antigener Wirkung in wenigen Minuten zerstört und wirkt dann auch hemmend auf einen normalen T. A.-Flockungsprozeß, allerdings verliert sich diese hemmende Eigenschaft bei längerem Stehen bei 0°. [Wir wissen noch zu wenig über die Konstitution des Toxins, um selbst nur Mutmaßungen über den ursächlichen Zusammenhang zwischen Hitzeeinwirkung und H-Ionen-Einfluß zu haben.] Das Antitoxin wird nach S. Schmidt bei 40° langsam zerstört bei $p_H > 3,5$ und < 8 . Beträgt $p_H > 7,5$, nimmt das Flockungsvermögen stark ab, und das Serum wirkt hemmend auf eine normale T. A.-Flockung [hydratisierender Einfluß der OH-Ionen]. Dagegen erfährt das Flockungsvermögen von antitoxischem Serum eine Steigerung bei 40° und einer p_H 4—5 [analog, wie durch HCl ein Wa.-negatives Serum positiv werden kann]. Die Flockungszeit wird wieder größer, wenn das Serum wieder durch Alkali auf die normale p_H gebracht wird. Ein Antitoxin, das unter dem Einfluß von H-Ionen schneller flocken kann, kann auch noch mit einem Toxin eine „spezifische“ Flockung geben, das durch Erwärmen oder durch Änderung der p_H frisches Antitoxin weder binden noch flocken kann.

Was nun den Einfluß von Elektrolyten betrifft, so konnte S. Schmidt folgendes beobachten:

Eine Reihe von Elektrolyten zerstören das Diphtherietoxin. Einige wirken vorzugsweise auf die Flockungsfähigkeit (darunter namentlich die Neutralsalze starker organischer Säuren) ohne die Zerstörung der antigenen Eigenschaften des Toxins wesentlich zu beschleunigen. Salze gewisser aromatischer Säuren (Benzoe- und besonders Salizylsäure) zerstören dagegen das Toxin in kurzer Zeit. Der Einfluß der Salze auf die Zerstörung des Antitoxins ist nur gering. Durch ein stark salzhaltiges Medium wird aber die Ausflockungsfähigkeit sehr herabgesetzt. Die Stabilität hochgereinigter Toxinlösungen ist bedeutend geringer als diejenige des gewöhnlichen Diphtherietoxins. Gereinigtes Toxin gibt Flockung mit Antitoxin bei 40° C und p_H 5,0—9,5. Je mehr die Reaktion nach der sauren oder alkalischen Seite abweicht, desto größer wird die Flockungszeit. In vielen salzarmen Lösungen verläuft die Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin äußerst langsam. Nimmt aber die Salzkonzentration stark zu, dann sinken sowohl die Flockungszeit als auch die Zeit zur Neutralisation bis zu einem gewissen Punkt, der für die meisten Salze etwa einer 0,1 Normallösung entspricht. Bei weiterer Zunahme steigen diese Werte wieder. In einer partiell gesättigten Antitoxinlösung verläuft die Reaktion ebenso rasch, wie wenn Toxin und Antitoxin in äquivalenten Mengen vorhanden sind. Der Einfluß der Elektrolyte ist in beiden Fällen der gleiche.

Ferner kann durch Verdünnung und Erniedrigung der Temperatur (siehe weiter oben) die Flockungszeit herabgesetzt werden [Glenny und Wallace¹⁾]. Man sieht also, daß die Flockungsgeschwindigkeit von einer Reihe von Faktoren abhängt und meines Erachtens nicht durch etwas im Serum bestimmt sein kann, was man mit Avidität der Antitoxine bezeichnet [Ramon²⁾, Locke u. a.³⁾]. Es ist auch schwer einzusehen, daß, wenn man aus einem antitoxischen Serum die Euglobuline entfernt und nunmehr das gereinigte Antitoxin-Pseudoglobulin nicht mehr flockt,

¹⁾ Glenny und Wallace, Journ. of. Path. 28, 317 (1925).

²⁾ Ramon, Compt. rend. Soc. Biol. 97, 6, 35 (1927).

³⁾ Locke, Main und Miller, Journ. inf. Dis. 41, 32 (1927).

gerade mit der Euglobulinfraktion dem Antitoxin die Avidität zu Toxin genommen sein soll. Die von *Madsen* und *S. Schmidt*¹⁾ empfohlene Methode der Aviditätsbestimmung am Kaninchen dadurch, daß einmal eine T. A.-Mischung zu verschiedenen Seiten nach der Mischung intravenös injiziert wird, sowie das Antitoxin in gewissen Zeiten nach einer vorherigen Toxingabe, konnte von *Glenny* und *M. Llewellyn-Jones*²⁾ mit der Flockungszeit nicht in Einklang gebracht werden, denn Sera, die nach dieser Kaninchenmethode den gleichen Aviditätswert hatten, wiesen sehr verschiedene Flockungszeiten auf. Ganz sicher hängt die Flockungszeit auch von dem zur Reaktion benutzten Toxin ab [*Hoehn* und *Tschertkow*³⁾ u. a.]. Meines Erachtens ist die Flockungszeit bei gegebenem Toxin durch denjenigen Anteil des Antitoxins bestimmt, der an relativ lyophoben Globulinen haftet, und die Größe dieses Anteils ist bei einzelnen Pferden verschieden und hängt auch ab von der Art des Toxins, was zur Immunisierung benutzt wurde. Zu ähnlicher Auffassung gelangte auch *Berthelsen*⁴⁾, der während der Periode der Immunisierung von Pferden eine gleichmäßige Zunahme der Flockungsreaktionszeit feststellen konnte. Er faßt die Schnelligkeit der Reaktion als Ausdruck des Zwischenflächenzustandes (Interfacial-State) des Antitoxin-Protein-Moleküls auf. Die Reaktionszeit steht in keinem direkten Verhältnis zu dem Titer, doch scheint eine Beziehung zu der individuellen Fähigkeit eines Pferdes, Antikörper zu produzieren, zu bestehen. Es ließ sich erweisen, daß die Zunahme der Flockungsreaktionszeit zu quantitativen Veränderungen der Proteinfraktionen nicht in Beziehung steht; sie beruht vielmehr offenbar auf qualitativen Differenzen, jedoch ließ sich mittels Bestimmungen der Oberflächenspannung eine qualitative Differenzierung der Proteinkomplexe nicht feststellen. Schließlich liegt kein Grund vor, den Antitoxinen des immunisierten Meerschweinchens jede Avidität abzusprechen, obwohl antitoxische Meerschweinchensera keine T. A.-Flockung geben [*Ramon*, *Debré* und *Mozer*⁵⁾], analog der Schwierigkeit, eine spezifische Eiweiß-Antieiß-Präzipitation und der Unfähigkeit, eine positive Wa. R. geben zu können.

2. Die Natur der T. A.-Flockung.

Wenn man die Toxin-Antitoxin-Flockung in Analogie bringt mit der von *R. Kraus* gemachten Beobachtung, daß bakterielle Antisera mit homologen Bouillonkulturfiltraten präzipitieren, dann liegt es nahe, auch die Toxin-Antitoxin-Flockung als eine Bakterien-Eiweiß-Antieiß-

1) *Madsen* und *S. Schmidt*, Ztschr. Immunitätsforsch. **55**, 357 (1930).

2) *Glenny* und *M. Llewellyn-Jones*, Journ. of Path. **34**, 110 (1931).

3) *Hoehn* und *Tschertkow*, Ztschr. Hyg. **109**, 375 (1928).

4) *Berthelsen*, Journ. of Immun. **21**, 43 (1931).

5) *Ramon*, *Debré* und *Mozer*, Compt. rend. Soc. Biol. **104**, 838 (1930).

Präzipitation aufzufassen, um so mehr, als das, was als Toxin zur Herstellung der antitoxischen Sera verwendet wird, zweifellos Bakterieneiweiß enthält. Zum Teil aus diesem Grund, aber auch wegen der Unstimmigkeit zwischen den durch die Flockung und durch Tierversuch ermittelten Auswertungen haben dann auch eine Reihe von Forschern, darunter *Moloney* und *Beecher-Weld*¹⁾, *Zingher*²⁾, *Bronfenbrenner* und *Reichert*³⁾ u. a. die T. A.-Flockung bei Diphtherie als eine Diphtherie-Bazilleneiweiß-Antieiweiß-Präzipitation angesehen. Auch bei der Tetanus-T. A.-Flockung war *Tohru Inoue*⁴⁾ zu gleicher Schlußfolgerung gelangt. Haben diese Autoren recht, oder gibt es tatsächlich eine echte Toxin-Antitoxin-Präzipitation? Die Frage kann man heute noch nicht mit genügender Sicherheit beantworten, da die Hauptschwierigkeit darin liegt, Toxine sicher frei von Bakterieneiweiß zu erhalten, doch gibt es gewichtige Gründe, die für die Existenz einer T. A.-Flockung sprechen.

Zunächst ist es die, wenn auch nicht völlige, so doch für alle praktischen Zwecke hinreichende Genauigkeit, mit der der Flockungswert und der im Tierversuch ermittelte Wert übereinstimmen. Schließlich könnte man darüber streiten, ob nicht die Flockung die genauere Auswertung darstellt, der der Tierversuch nicht immer wegen individuellen Reaktionen der Tiere genau entspricht. Es ist doch immerhin sehr zu beachten, daß z. B. zwei mit ganz verschiedenen Toxinen von verschiedenen Pferden gewonnene Sera, die im Tierversuch ausgewertet, gleichen antitoxischen Titer haben, auch im Flockungsversuch denselben Wert ergeben. Es müßte dann die gezwungene Annahme gemacht werden, daß in allen Toxinen das Verhältnis von gelöstem Bakterieneiweiß zu Toxin das gleiche ist, und alle mit solchen Toxinen von Pferden gewonnenen Sera ein gleiches Verhältnis von Antitoxin zu Eiweißantikörper aufweisen. Auch der von *Renaux* gemachte Versuch, demzufolge das fraktionsweise Zusetzen von Antitoxin zu Toxin im Flockungsversuch an dem Ausfall der Wertangabe nichts ändert, könnte für eine echte T. A.-Flockung geltend gemacht werden.

Was aber ganz besonders dafür spricht, ist die Tatsache, daß es eine echte Diphtheriebazilleneiweiß-Antieiweiß-Flockung gibt. Immunisiert man nämlich Kaninchen mit gewaschenen abgetöteten Diphtheriebazillen, so erhält man agglutinierende Sera, die frei von Antitoxin sind, aber doch mit Toxinbouillon ausflocken (*H. Schmidt*, *Moloney* und *Beecher-Weld*). Nun kommt es öfters vor, daß bei der T. A.-Flockung zwei voneinander getrennte Flockungszonen auftreten können, und *Glenny*, der das Phänomen zuerst beschrieb, betonte es als eine Eigentümlichkeit des betreffenden Pferdeserums. Andererseits scheinen auch manche Gifte sich bevorzugt zur Doppelflockung zu eignen (*H. Schmidt* und *W. Scholz*), wobei es aber wahrscheinlicher ist, daß solche Gifte nur dann Doppelflockung zeigen, wenn das betreffende Serum die Eignung dafür hat. Es gelang nun *H. Schmidt* und *W. Scholz*, den Beweis dafür zu erbringen, daß die eine der Flockungen sicher eine spezifische Bakterieneiweiß-Antieiweiß-Flockung darstellt, die man von der T. A.-Flockung experimentell trennen und auch bei Pferden als Doppelflockung experimentell erzeugen kann. War nun die andere Flockung eine spezifische T. A.-Flockung? Eine Untersuchung der

1) *Moloney* und *Beecher-Weld*, Journ. of Path. 28, 655 (1925).

2) *Zingher*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 22, 454 (1925).

3) *Bronfenbrenner* und *Reichert*, Journ. of exper. Med. 44, 553 (1926).

4) *Tohru Inoue*, Ref. Zbl. Hyg. 25, 620 (1931).

Flockensubstanz zeigte (*H. Schmidt* und *W. Scholz*), daß bei der Doppelflockung nur die dem Antitoxinwert des Serums zahlenmäßig entsprechende Flockung in der Flockensubstanz Toxin und Antitoxin enthielt, wohingegen die Flockensubstanz der Eiweiß-Antieiß-Flockung weder Toxin noch Antitoxin enthielt, wohl aber die überstehende Flüssigkeit, und zwar die ursprünglichen Mengen. Diese Feststellung macht daher die Annahme, daß Toxin und Antitoxin nur sekundär von den Eiweiß-Antieiß-Flocken mitgerissen wird, unzulässig.

Damit ist zwar die Möglichkeit einer echten Toxin-Antitoxin-Präzipitation sehr wahrscheinlich gemacht, aber nicht erwiesen. Es ist bekannt, daß man eine gute T. A.-Flockung nur erhält mit frischem Serum. Hat das Serum längere Zeit gelagert, so ist die Flockung zeitlich stark verzögert und kann unter Umständen überhaupt nicht mehr eintreten, obwohl Antitoxine vorhanden sind. Die Tatsache, daß ein solches Serum beim Vermischen mit einem anderen frischen antitoxischen (nicht normalen) Serum sich bezüglich seines Antitoxingehaltes quantitativ an der Flockung beteiligt, wodurch seine Auswertungsmöglichkeit durch das Flockungsverfahren gegeben ist, dürfte ebenfalls sehr für eine T. A.-Flockung sprechen. Wird ein Serum nach Entfernung des Albumins durch 50 Proz. Ammoniumsulfatsättigung auf elektroosmotischem Wege gründlichst von allem relativ hydrophobem Globulin befreit, so erhält man bekanntlich eine Pseudoglobulinlösung, die den größten Teil der Antitoxine enthält. Eine solche relativ reine Antitoxinlösung gibt keine Flockung mehr mit Toxin. Trotzdem darf man daraus nicht den Schluß ziehen, daß es also eine Toxin-Antitoxin-Flockung nicht gibt, sondern daraus folgt — und das dürfte allen Beobachtungen am meisten entsprechen — daß eine T. A.-Flockung nur durch solches Antitoxin zustande kommen kann, welches durch seinen relativ hydrophoben Charakter zuläßt, daß die A. A.-Komplexe, an denen sich alle Antitoxine beteiligen, agglomerieren und präzipitieren können.

Dies ist auch der Grund, daß frisches antitoxisches Serum besonders zur T. A.-Flockung geeignet ist, und daß Lagern und besonders Erhitzen, das eine Stabilisierung (im Sinne einer Hydrophilie) der labilen Globuline bedingt, die Flockungsfähigkeit beeinträchtigt. Auch wird hierdurch verständlich, daß im Gegensatz zur optimalen Eiweiß-Antieiß-Präzipitation bei der T. A.-Flockung stets Toxin und Antitoxin in der überstehenden Flüssigkeit bleiben, da es sich um in Lösung bleibendes T. A. handelt, bei dem nur die an lyophile Globuline gebundenen Antitoxine beteiligt sind.

Aber damit ist noch nicht alles geklärt, denn *H. Schultze* konnte im Behring-Institut in Marburg die interessante Feststellung machen, daß ein antitoxisches Serum, dem man durch Erhitzen auf 56° die Flockungsfähigkeit nahm, dieselbe durch eine Elektrodialyse wieder gewann, obwohl doch gerade letztere geeignet ist, die Labilglobuline aus dem Serum zu entfernen. Wurde das Serum wieder erhitzt, so verschwand die Flockungsfähigkeit wieder, um bei nochmaliger Elektrodialyse wieder zu kommen. Weitere Versuche zeigten, daß die Restituier-

barkeit des Flockungsvermögens nur so lange möglich ist, als das Serum noch Globuline enthält, die durch Elektrodialyse entfernbar sind. Wird letztere soweit getrieben, daß nichts mehr zum Ausfällen gebracht werden kann, so ist der antitoxinhaltige Pseudoglobulinrest definitiv zur Flockung unfähig.

Trotzdem also aus dem erhitzten Serum labile Globuline entfernt werden, wird das Serum flockungsfähig, was sich wahrscheinlich damit erklären läßt, daß durch den Elektrodialyseprozeß auch noch eine die Flockung hemmende Substanz, die durch die Erhitzung entsteht, mit entfernt wird. Und damit berühren wir die Bedeutung der Lipide für den T. A.-Flockungsprozeß im besonderen und für die in vitro A. A.-Reaktionen im allgemeinen, auf die aber in einem besonderen Abschnitt näher eingegangen werden soll. Hier sei nur erwähnt, daß Erhitzen des Serums (besonders bei Gegenwart von Phenol) eine Erniedrigung der Oberflächenspannung im Gefolge haben kann, die wahrscheinlich auf die Dissoziation von Lipoiden aus ihrem Verband mit Globulinen beruht. Solche Globuline dürften eine Beeinträchtigung der Hydrophobie ihrer polaren Lipoid-Gruppe erfahren (vgl. S. 117) und damit nach Bindung ihrer hydrophilen Gruppe an das Antigen eine Beeinträchtigung ihrer Agglomerationsfähigkeit erleiden. Werden die Lipide, wie *Hartley*¹⁾ experimentell bewies, restlos entfernt, so kann eine T. A.-Flockung nicht mehr stattfinden.

Durch alle diese Feststellungen und Deduktionen ist es sehr wahrscheinlich geworden, daß eine echte Toxin-Antitoxin-Flockung möglich ist, die nur an die Bedingung geknüpft ist, daß das Serum relativ hydrophobes antitoxinhaltiges Globulin enthält. Kommen wir nun auf die eingangs dieses Abschnittes erwähnten Versuche von *J. Freund* mit an Kolloidiumteilchen adsorbiertem Toxin zurück, so sehen wir, daß zwischen der Präzipitation von flüssigem Toxin und der Agglutination der Toxin-Kolloidiumteilchen kein prinzipieller Unterschied besteht. Antitoxin kann also, sofern es an das geeignete Globulin gebunden ist, sich wie ein Präzipitin verhalten. Da nun Versuche von *Dean*²⁾, *Renau*³⁾, *L. Sieber* und *Tschernochwostow*⁴⁾ sowie solche von *Pernice*⁵⁾ im Behring-Institut, Marburg, gezeigt haben, daß der T. A.-Komplex unter geeigneten Versuchsbedingungen auch Komplement binden kann, so ist damit die Schranke gefallen, die Antitoxine als besondere Antikörper aufzufassen.

¹⁾ *Hartley*, Brit. Journ. of exper. Path. 6, 180 (1915).

²⁾ *A. R. Dean*, Journ. of Path. 30, 675 (1927).

³⁾ *E. Renau*, Ann. Inst. Past. 42, 356 (1928).

⁴⁾ *L. Sieber* und *Tschernochwostow*, Ztschr. Immunitätsforsch. 48, 472 (1926).

⁵⁾ *Wo. Pernice*, Dissertation (Marburg 1933).

XIII. Über die Rolle der Lipoide in serologischen Reaktionen.

Die Bedeutung der Lipoide für die Immunbiologie in weiterem Sinne ist in stetem Wachsen begriffen, und selbst für das engere Gebiet der Serologie ist die Literatur so groß geworden, daß hier nur ein sehr kleiner Teil berücksichtigt werden kann, nämlich nur soweit, als Lipoide für die in diesem Buche erörterten *in vitro* Antigen-Antikörper-Reaktionen eine Rolle spielen. Daß Lipoide eine solche spielen, ist bereits an verschiedenen Stellen erwähnt worden.

Man muß nun scharf unterscheiden zwischen der Bedeutung der Lipoide im Antigen und den Lipoiden im antikörperhaltigen Serum. Alle natürlich vorkommenden Antigene enthalten Lipoide, und die Frage, ob und wie Lipoide als Antigene wirken können, ist im Abschnitt I dieses Buches erörtert worden. Je nachdem ob es sich um Lipoid- oder Eiweiß-antikörper handelt, wird es eine Rolle bei der A. A.-Reaktion spielen können, ob das Antigen (z. B. Bakterienzelle) von Lipoiden befreit ist oder nicht. Dagegen ist das Antikörper-Substrat ein relativ einheitliches, nämlich Serum, und da jedes Serum Lipoide enthält, ist es nicht nur für die Frage nach der Natur der Antikörper, sondern auch für die nach dem Mechanismus der A. A.-Reaktion von größter Bedeutung zu wissen, welche Rolle die Serumlipoide für die Antikörperfunktionen haben.

Die Serumlipoide.

Das Serum enthält Lezithin (Phosphatide) und Cholesterin, aber in verschieden fester Bindung. Ein Teil der Lipoide ist in relativ freiem Zustande durch Hydrotropie des Eiweißes in Lösung gehalten und ein anderer Teil ist mit Eiweiß relativ fest gebunden. Es gelingt daher nur sehr schwer, mittels Äther-Extraktion die ätherlöslichen Bestandteile restlos zu entfernen. *H. Chick*¹⁾ hat wohl zuerst die Vermutung ausgesprochen, daß die Lipoide in irgendeiner Weise mit dem Pseudoglobulin des Serums verbunden sind, und daß solche Lipoid-Pseudoglobulinkomplexe das darstellen, was wir im Serum als Euglobulin bezeichnen. Über die Art dieser Lipoid-Eiweißverbindung wissen wir nichts Sicheres. Nur soviel kann man sagen, daß die Verbindung dissoziabel ist, daß es also gelingt, aus dem Globulin durch geeignete Ätherextraktionsmethoden das Lipoid abzuspalten, besonders, wenn man dabei noch Mittel, wie z. B. Phenol, nimmt, die nach *H. Sachs* fähig sind, die Serumlipoide zu demaskieren. Andererseits ist aber entweder der Lipoidanteil nicht absolut restlos entfernbar, oder aber dies gelingt nur unter mehr oder weniger tiefgreifenden Veränderungen des Globulinmoleküls, denn es ist bisher nicht gelungen, durch Lipoidextraktion aus Euglobulinen diesen die Eigenschaften des Pseudoglobulins zu geben. Da aber bekanntlich die Grenze zwischen Eu- und Pseudoglobulin nicht scharf

¹⁾ *H. Chick*, Biochem. Journ. 8, 404 (1914).

ist, so kann, wenn man auf der Annahme fußt, daß nur die Verbindung mit Lipoiden das Globulin zum Euglobulin stempelt, diese Verbindung keine chemisch-stöchiometrische sein, sondern die Art und Festigkeit der Bindung muß graduell vom Eu- zum Pseudoglobulin hin abnehmen. Ganz lipoidfrei dürfte wohl kein Serumweiß sein, denn nach *Theorell*¹⁾ enthält auch die mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung erhaltene und klar dialysierte Albuminlösung noch cholesterin-ätherlöslichen Phosphor im Verhältnis zum Globulin wie 9,7 zu 16,9. Vielleicht kann man sich die Bindung des Lipoids, soweit es nicht einfach durch Äther ausschüttelbar ist, so vorstellen, daß das Lipoidmolekül in den Bau der Euglobulinmizelle polar eingebaut ist, so daß, wie auf S. 117 erwähnt, eine solche Lipoid-Globulinmizelle einen heteropolaren Charakter annimmt, was das Verständnis für die Grenzflächeneigenschaften der A. A.-Komplexe erleichtert.

Andererseits hat man sich große Mühe gegeben, aus Pseudoglobulinen und Lipoiden Komplexe zu schaffen, die klar in Lösung gehen und den Pseudoglobulinen wieder den Euglobulincharakter geben. *H. Chick* glaubte dies dadurch erreicht zu haben, daß sie große Mengen von Serum-Lipoid zu kleinen Mengen von Pseudoglobulinen brachte. *Went* und *Fr. Farago*²⁾ untersuchten die Frage, wie die Lezithine im Serum klar gelöst sein können, und haben Pferdeserum mit Lezithinemulsionen verschiedener Konzentration gemischt und diese Mischungen mit Na_2SO_4 fraktioniert. Es zeigte sich, daß in solchen Gemischen die Menge der einzelnen Serumweißfraktionen sich derart verändert, daß zwischen der Menge des Euglobulins und Pseudoglobulins I einerseits und des Pseudoglobulins II und Albumins andererseits eine ausgeprägte Reziprozität besteht. Sie nehmen, wie *H. Chick*, an, daß Euglobulin ein kolloider Komplex von Pseudoglobulin I und Lezithin ist, und daß dasselbe Verhältnis zwischen Albumin und Pseudoglobulin II besteht, daß also letzteres ein Albumin-Lezithin-Komplex ist. Innerhalb dieser zwei Haupttypen der Serumweißfraktionen werden noch weitere weniger gut definierbare Eiweiß-Lezithin-Dispersoide angenommen, deren Stabilität (Neutralsalz gegenüber) sich nach der Menge des gelösten resp. suspendierten Lezithins richtet.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die Versuche von *Bungenberg de Jong* und *Westerkamp*³⁾ über die Entstehung einer Komplex-Koazervation bei hydrophilen Eiweiß-Lezithin-Gemischen hingewiesen. Es ist auch *Theorell*⁴⁾ gelungen, in bestimmter Weise hergestellte Cholesterin- und Lezithin-Suspensionen in Serum oder Plasma in klare Lösung zu bringen. Die zu dem Serum resp. Plasma neu hinzugekommenen Lipide werden beim Aussalzen der verschiedenen Eiweißfraktionen mit Ammoniumsulfat sowohl mit der Fibrinogen- als auch mit der Globulinfraktion ausgefällt. Auch hier wie in früheren Untersuchungen *Theorell's*⁵⁾ enthalten die beim Aussalzen und auch in einem Falle bei Elektrodialyse ausgefallten Fraktionen alle Lipide in gewissen regelmäßigen Proportionen, so daß vom Fibrinogen zu Globulin zum Albumin der Quotient Cholesterin : Lipoidphosphor sukzessive abnimmt.

Trotz allen Versuchen ist es aber bisher noch nicht gelungen, einen bindenden Beweis für die Annahme von *H. Chick* zu erbringen. Es müßte Lezithin mit vorher völlig lipoidfrei gemachtem Pseudoglobulin gebunden werden, so daß eine klare Lösung entsteht, aus der sich dann durch 33 Proz. Ammoniumsulfat-

1) *Theorell*, Biochem. Ztschr. **175**, 297 (1926).

2) *St. Went* und *Fr. Farago*, Biochem. Ztschr. **230**, 238 (1931).

3) *Bungenberg de Jong* und *Westerkamp*, Biochem. Ztschr. **234**, 367 (1931).

4) *Theorell*, Biochem. Ztschr. **223**, 1 (1930).

5) *Theorell*, Biochem. Ztschr. **175**, 297 (1926).

sättigung eine Fraktion von Euglobulincharakter ausscheiden läßt, und umgekehrt müßte gezeigt werden, daß aus völlig lipoidfrei gemachtem Serum sich weder Euglobulin bei 33proz. Sättigung noch überhaupt Globulin bei 50proz. Sättigung ausscheiden läßt, sondern daß alles Serumprotein bei der gleichen Neutralsalzkonzentration aussalzbar ist, wenn die obige Annahme von *Went* und *Farago* zu Recht besteht.

Die Frage ist nur, ob es in der Tat gelingt, ein Serum völlig lipoidfrei zu machen, ohne den Proteinen dabei ihre genuine Löslichkeit zu nehmen. Dies ist mit einfacher Ätherextraktion sehr schwierig, wenn nicht unmöglich (*H. Chick*). Andererseits ist die wirklich restlose Entfernung des Äthers ebenfalls sehr schwierig, was deswegen zu beachten ist, weil nach *Graham*¹⁾, *Forssman*²⁾ u. a. Spuren von zurückbleibendem Äther den Verlauf serologischer Reaktionen empfindlich beeinflussen können. *Forssman*³⁾ nimmt z. B. an, daß Spuren von Äther genügen, um ein Wassermann-positives Serum negativ zu machen. Diese und andere Schwierigkeiten sind nach *Hartley* wahrscheinlich schuld an den sich vielfach widersprechenden Ergebnissen verschiedener Autoren über die Rolle der Lipide bei serologischen Reaktionen.

Die Rolle der Lipide in serologischen Reaktionen.

*P. Hartley*⁴⁾ verdanken wir die bisher gründlichste Bearbeitung dieser Frage. Er verwandte mit einigen kleinen Modifikationen die Methode von *Hardy* und *Gardiner*⁵⁾, die im wesentlichen darin besteht, daß in eine sehr kalte, chemisch reine Alkohol-Äther-Mischung kaltes Serum tropfenweise gegeben wird, und das ausfallende Serumeiweiß weiterhin mit Äther in der Kälte extrahiert wird. Das so extrahierte Material wird getrocknet und behält seine gute Löslichkeit und ist auch sonst in seinen physiologischen Eigenschaften nicht verändert, wie besonders die von *Dean*⁶⁾ erwiesene Möglichkeit zeigt, das bekanntlich so labile Meerschweinchenkomplement auf diese Weise zu konservieren. Sein so erhaltenes Trockenpulver war reich an Mittelstück und enthielt auch Spuren von Endstück. Aus *Dean's* Versuchen geht hervor, daß die Serum-Lipide und überhaupt alle im Serum befindlichen ätherlöslichen Substanzen für die Komplementfunktion keine Rolle spielen.

Hartley kam nun zu folgenden Ergebnissen:

Nach Extraktion der Lipide von normalem Menschen- und Pferdeserum behalten die Proteine ihre antigene Fähigkeit. Die mit so vorbehandelten Antigenen erhaltenen Antisera wurden von Lipiden befreit, und dann konnte eine spezifische Präzipitation nicht mehr stattfinden, wohl aber, wenn auch in abgeschwächtem Maße, wenn entweder nur das Antigen oder nur das Immuneserum lipoidfrei extrahiert war. Trotzdem

¹⁾ *Graham*, Journ. inf. Dis. 8, 147 (1911).

²⁾ *Forssman*, Biochem. Ztschr. 121, 180 (1921); Compt. rend. Soc. Biol. 85, 828 (1921).

³⁾ *Forssman*, Klin. Wschr. 1922, 1054.

⁴⁾ *P. Hartley*, Brit. Journ. of exper. Path. 6, 180 (1915).

⁵⁾ *Hardy* und *Gardiner*, Journ. of Physiol. 33, 281 (1905).

⁶⁾ *Dean*, Journ. of Path. 18,, 118 (1913); 40, 68 (1910).

steht nichts im Wege, eine A. A.-Bindung anzunehmen, was *Hartley* allein daraus folgern zu können glaubt, daß bei manchen Versuchen mit extrahierten Reagentien dort, wo sonst Präzipitation auftrat, sich eine feine Opaleszenz bemerkbar machte. Es ist von besonderem Interesse, daß eine Präzipitation dann eintreten kann, wenn nur das Immuneserum, nicht aber das Antigen extrahiert war und umgekehrt, so daß also Abwesenheit von Lipoiden die A. A.-Bindung nicht hindert, wohl aber die folgende Agglomeration der A. A.-Komplexe, daß aber andererseits die dafür nötigen Lipide nicht notwendigerweise vom Antikörper geliefert zu werden brauchen, sondern auch die des Antigens, wenn auch, aus *Hartley's* Versuchen zu schließen, in anscheinend geringerem Maße, dafür genügen können.

Nun enthält ein gewöhnliches spezifisches Eiweiß-Antieiß-Präzipitat in Trockenform etwa 25 Proz. ätherlösliches Material (*Douglas* und *Dudley*), und das ist anscheinend mehr, als selbst das labilste Euglobulin an Lipoiden enthält. Immerhin bedarf dies einer genauen zahlenmäßigen Vergleichsanalyse zwischen getrocknetem Euglobulin und getrocknetem A. A.-Präzipitat, ehe man sich *Hartley's* Ansicht anschließen kann, daß durch die spezifische A. A.-Bindung ein Entmischungsvorgang stattfindet, bei dem Lipoid frei wird, in Flocken ausfällt und dabei Antigen und Antikörper-Eiweiß mitreißt, deren Gegenwart im Präzipitat außer Zweifel steht.

Die Diphtherietoxin-Antitoxin-Bindung ist nach *Hartley* unabhängig von dem Lipoidgehalt des Serums. Wohl aber kann eine T. A.-Flockung mit extrahiertem Serum nicht mehr eintreten. Über den Zusammenhang von Eu- und Pseudoglobulinen des antitoxischen Serums ist bereits auf S. 172 hingewiesen. Hier ist interessant, daß eine Lipoidreaktion des Toxins nicht stattzufinden brauchte, um die Flockung mit extrahiertem Antitoxin zu verhindern. Wahrscheinlich ist der Gehalt des Toxins an ätherlöslichem Material an sich sehr gering, doch kann, wie aus *W. Georgi's*¹⁾ Versuchen hervorgeht, eine Erhöhung des Lipoidgehaltes des Toxins eine T. A.-Flockung verstärken.

Bei seinen Agglutinationsversuchen mit lipoidfrei extrahiertem Typhusbazillenanterum konnte *Hartley* keinen Unterschied gegenüber nicht extrahiertem Immuneserum feststellen. Da er aber nicht mit gleichzeitig lipoidfrei extrahierten Typhusbazillen gearbeitet hat, so ist sein Schluß, daß für die Agglutination die Serumlipide keine Rolle spielen, nicht genügend gesichert, zumal darüber einige sich widersprechende Literaturangaben vorliegen (*Stuber* 1915, *Krumwiede* und *Noble* 1921). Bei der spezifischen Präzipitation war der Lipoidgehalt des Antigens nicht ohne Einfluß. Hier fehlen ergänzende Agglutinationsversuche, bei

¹⁾ *W. Georgi*, Med. Klin. 1920, 1061.

denen beide Komponenten extrahiert sind. Schließlich ist zu bedenken, daß bei der Immunisierung mit Typhusbazillen sowohl Antieweiß- wie auch Antilipoid-Immunkörper entstehen können.

Die spezifische Hämolyse fand *Hartley* unabhängig von dem Lipidgehalt des Hämolsins, was ja auch aus den auf S. 116 erwähnten Reinigungsversuchen des Hämolsins hervorgeht. Hier läßt sich naturgemäß das Antigen ohne Hämolyse nicht mit Äther extrahieren, wohl aber könnten Agglutinationsversuche mit extrahiertem Serum und extrahierten Stromata gemacht werden. *A. Locke* und *E. F. Hirsch*¹⁾ nehmen an, daß für die Produktion von Hämagglutininen das lipoidfreie Stromaprotein, für die Bildung von Hämolsinen jedoch der ganze Lipoidproteincomplex erforderlich ist.

Bei der Wassermann'schen Reaktion fand *Hartley*, daß ein vorher positiv reagierendes Serum nach Extraktion der ätherlöslichen Substanzen und nach rigoroser Entfernung der letzten Ätherspuren negativ reagierte. Dabei bleibt zwar vorderhand unbewiesen, ob eine Bindung der extrahierten Immunglobuline an das Lipoidantigen ebenfalls ausgeblieben ist (man müßte nachzuweisen versuchen, ob ein mit extrahiertem positivem Serum behandeltes Lipoidsol noch als Antigen dienen kann). Wahrscheinlich hat aber die spezifische A. A.-Bindung stattgefunden, und nur die Fähigkeit zur Komplementbindung resp. Flockung ist durch den Verlust der Lipide verloren gegangen.

Weitere Versuche über die Bedeutung der Lipide für die A. A.-Reaktionen *in vitro* liegen meines Erachtens nicht vor, so daß man als sichergestellt nur die Tatsache betrachten kann, daß ohne Mitwirkung von Lipoiden eine Reihe von *in vitro* A. A.-Reaktionen nicht stattfinden kann. In allen solchen Fällen aber die Beteiligung spezifischer Lipoidantikörper anzunehmen, scheint meines Erachtens nicht nötig. Vielmehr deutet vieles darauf hin, daß die Rolle der Lipide in diesen Prozessen mehr physikalisch-chemischer Natur ist, und darauf dürfte es beruhen, daß der Lipoidbegriff in der Serologie einen Inhalt hat, auch wenn eine chemische Definition der Lipide nicht gegeben werden kann.

¹⁾ *A. Locke* und *E. F. Hirsch*, Journ. inf. Dis. 37, 449 (1925).

XIV. Der Antikörper.

Wir haben nun im Vorausgegangenen das Wesentlichste der Antigen-Antikörper-Reaktionen kennen gelernt, soweit sie sich *in vitro* abspielen. *In vivo* wie bei der aktiven und passiven Anaphylaxie und allen Immunitätserscheinungen tritt die Reaktion des lebenden Organismus auf die A. A.-Prozesse in einer so verwickelten Weise ein, daß die Verhältnisse viel weniger klar liegen wie bei den *in vitro* Vorgängen. Wegen der Unmöglichkeit, in dem engen Rahmen dieses Buches die mit den *in vivo* Reaktionen aufs engste zusammenhängenden Probleme der Immunität erörtern zu können, ist davon Abstand genommen, die Erörterung der Methoden zum Nachweis spezifischer A. A.-Reaktionen auf die *in vivo* Vorgänge auszudehnen. Jedenfalls aber haben sich gerade die Anaphylaxie-Reaktionen als ganz besonders brauchbar in der Erforschung der Spezifität der A. A.-Prozesse erwiesen.

Wir haben eingangs festgestellt, daß die Bildung spezifischer Antikörper die Antigennatur eines Substrates beweist, d. h. wir haben das Antigen mit dem Antikörper definiert, und müssen nun sehen, was man über den Antikörper als solchen über das, was aus seiner Reaktionsfähigkeit mit Antigen hervorgeht, hinaus sagen kann. Es handelt sich um die grundlegenden Fragen: Wo entstehen die Antikörper, wie entstehen sie, was sind Antikörper und welcher Art sind die Beziehungen, die als Spezifität usw. zwischen Antigen und Antikörper existieren usw. Diese Fragen hängen auf das engste zusammen.

Für das Wo und Wie der Antikörperbildung scheint es nur zwei Möglichkeiten zu geben: Entweder bildet sich der Antikörper in Zellen oder im Säftestrom und zwar entweder unter dem Einfluß von Antigen oder direkt aus dem Antigen. Die Mehrzahl der Forscher neigt heute der Ansicht zu, daß die Antikörper in den Zellen, darunter besonders in den Retikulo-Endothel- und diesen verwandten Zellen entstehen und erst von den Zellen in das Blut gelangen. Beweisend dafür scheinen meines Erachtens besonders drei Tatsachen zu sein: Erstens die Antikörperbildung in Gewebskulturen, zumal die Versuche von *K. Meyer* und *H. Loewenthal*¹⁾ zeigten, daß schon 72 Stunden nach der Explantation von Geweben typhusimmunisierter Kaninchen in der zweiten Zellgeneration *in vitro* eine Steigerung des Agglutinintiters um das 4fache eingetreten

¹⁾ *K. Meyer* und *H. Loewenthal*, Ztschr. Immunitätsforsch. **54**, 409 (1928).

war¹⁾. Zweitens die sogenannte anamnestiche Reaktion *R. Bieling*²⁾, *S. M. Mackenzie* und *E. Frühbauer*³⁾ u. a. In einem bereits früher immunisierten Tier wird bei neuer Immunisierung mit einem anderen Antigen auch der Titer der früher gebildeten Antikörper erhöht. Drittens die Anaphylaxieversuche an blutfrei durchspülten Organen (*Dale*).

Wenn nun anzunehmen ist, daß die Antikörperbildung in der Zelle stattfindet oder vielleicht nur in der Zellmembran gemäß der Vorstellung von *Zinsser*, daß nur solche Teilchen antigen wirken, die vermöge ihrer Mizellengröße nicht in das Zellinnere diffundieren können, so muß das Antigen dabei irgendeine Rolle spielen, da sonst die Spezifität nicht zu verstehen wäre.

Die Annahme, daß der Antikörper sich direkt aus der Antigenmizelle bildet, ist letzthin von vielen Autoren vertreten worden, von manchen sogar die Entstehung von spezifischen Antikörpern aus Antigen *in vitro*. Z. B. *Shibley*⁴⁾, ferner *Locke, Main* und *Hirsch*⁵⁾ u. a. schlossen aus ihren Versuchen, daß das injizierte Antigen mit normalen kolloiden Stoffen aus Zellen und Blutflüssigkeit sich verbindet, und daß einige dieser Verbindungen, oder weitere Umwandlungsprodukte daraus, die spezifischen Antikörper darstellen. *Smirnow*⁶⁾ behauptet aus Diphtherietoxinbouillon *in vitro* Stoffe hergestellt zu haben, die im Tierversuch wie Antitoxin wirkten. *Kryszanowski*⁷⁾ berichtet über erfolgreiche Synthese von Diphtherie-Antitoxin durch Inkubation von Mischungen von Diphtherietoxin und normalem Serum, *C. Mez* und *H. Ziegenspeck*⁸⁾ geben an, daß es ihnen durch Mischung von Pflanzensäften mit normalem Serum gelang, künstliche spezifische Präzipitine und Agglutinine gegen Pflanzeneiweiß und Pflanzenzellen herzustellen. In ähnlicher Weise stellte *Kabelik*⁹⁾ spezifische Präzipitine gegen tierisches Eiweiß her. *Baschkirzew*¹⁰⁾ berichtet die erfolgreiche *in vitro* Herstellung eines spezifischen antibakteriellen Serums gegen Gonokokken usw. Diese und andere Arbeiten entbehren aber bisher der Bestätigung und dürften zum Teil auch der Kritik nicht standhalten.

Unbedingt ernst zu nehmen sind dagegen die Arbeiten von *W. H. Manwaring* und dessen Mitarbeiter¹¹⁾. *Manwaring* ging von folgenden Beobachtungen aus:

Einem normalen Hund wurden 2 ccm Pferdeserum pro Kilo intravenös gegeben. In den nächsten 7 Tagen ergab die spezifische Präzipitation nachweis-

¹⁾ Ähnliche Ergebnisse hatte *Comatsu*, Ztschr. Immunitätsforsch. **71**, 76 (1931).

²⁾ *Bieling*, Ztschr. Immunitätsforsch. **28**, 246 (1919).

³⁾ *S. M. Mackenzie* und *E. Frühbauer*, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **24**, 419 (1927).

⁴⁾ *Shibley*, Arch. Path. **2**, 438 (1926).

⁵⁾ *Locke, Main* und *Hirsch*, Arch. Path. **2**, 437 (1926).

⁶⁾ *Smirnow*, Beitr. Klin. Tbk. **59**, 278 (1924).

⁷⁾ *Kryszanowski*, Zbl. Bakt. **110**, 1 (1929).

⁸⁾ *C. Mez* und *H. Ziegenspeck*, Botan. Arch. **12**, 163 (1925).

⁹⁾ *Kabelik*, Biol. Listy (tschech.) **1927**, 31.

¹⁰⁾ *Baschkirzew*, Ztschr. Urol. **23**, 92 (1929).

¹¹⁾ *W. H. Manwaring* und Mitarbeiter, Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **27**, 13 (1929); **24**, 82 (1926); Scient. Monthly. 1927, 362; Journ. amer. med. Assoc. **90**, 2090; **91**, 386 (1928).

bares Vorhandensein des injizierten Pferdeeiweiß, was sich aber in biologischem Sinne doch verändert haben mußte, denn wenn man kurze Zeit nach der intravenösen Injektion dem Hunde Blut entnimmt und dieses einem gegen Pferdeserumeiweiß passiv überempfindlich gemachten Hund injiziert, so ist das Blut für diesen zweiten Hund wesentlich giftiger, wie Pferdeserum, obwohl es an einem normalen Hund keine Wirkung auslöst. Wird dagegen dem ersten Hund nach ca. 6 Stunden Blut entnommen und wieder einem passiv sensibilisierten Hund injiziert, so ist jede spezifische toxische Wirkung verschwunden, trotzdem die Eiweißmenge nicht vermindert ist. *Manwaring* nimmt bei dem ersten Hunde eine sofort nach der Injektion von Pferdeserum einsetzende enzymatische Spaltung des Eiweißes an, wodurch das Blut für kurze Zeit toxisch wirkt, aber nur für andere passiv sensibilisierte Hunde, nicht für immunisierte, die eine spezifische Widerstandsfähigkeit gegen die giftigen Abbauprodukte erworben haben (Enzymtheorie der Antikörperbildung).

Wird dem ersten Hund zu verschiedenen Zeiten Blut entnommen und einem teilweise entbluteten, Pferdeserum überempfindlichen Hunde transfundiert, so ist nach 48 Stunden der ausgelöste Transfusionsschock nur halb so groß, nach 3 Tagen nur $\frac{1}{4}$ so groß und bleibt nach 4 Tagen überhaupt aus, d. h. also daß mindestens 85 Proz. des eingeführten Pferdeserums chemisch so verändert ist, daß es keinen spezifischen anaphylaktischen Schock mehr hervorrufen kann. Auch verliert das Hundeblood nach der Pferdeserumeinspritzung allmählich seine gegen Pferdeeiweiß sensibilisierende Eigenschaft, so daß nach 7 Tagen 97 Proz. des injizierten Pferdeserums so verändert wird, daß es nicht mehr sensibilisieren kann. 30 Tage nach der intravenösen Injektion gibt das Blut bei 1:2 bis 1:16 Verdünnung keine Präzipitation mehr mit Anti-Pferdeeiweiß-Kaninchen-Serum, wohl aber bei weiteren Verdünnungen bis 1:512. Das teilweise denaturalisierte Eiweiß wird also wenigstens 30 Tage (selbst 4 Monate) im Blut zurückbehalten, während dem sich ein für die Präzipitation hemmender Faktor bildet, also über die Zeit für die maximale spezifische Antikörperbildung hinaus (21 Tage), was anscheinend die Ansicht stützt, als könnten spezifische Antikörper ein irgendwie verändertes denaturiertes Antigen sein. Aber auch dann müssen Zellen irgendwie beteiligt sein, denn erhält der erste Hund chinesische Tusche vor der intravenösen Injektion von Pferdeserum, so bleibt letzteres noch mindestens 14 Tage bezüglich seiner Fähigkeit, anaphylaktischen Schock auszulösen, unverändert [*Boone*¹⁾].

Die Theorie von *Kapsenberg*²⁾, die die bekannten Vorstellungen von *Herzfeld* und *Klinger*³⁾ unter Heranziehung der Nebenvalenztheorie von *Werner* verwertet, besagt, daß die Antigene im Blut aufgespalten werden. Abbaustoffe, die noch einen Teil der spezifischen Antigenstruktur behalten haben, dringen in Zellen ein, wo eine besondere Aminosäurekette („primäre Antikörperkette“) entsteht, die ihrerseits die Bildung „sekundärer Antikörperketten“ zur Folge hat, die dann als spezifische Antikörper aus der Zelle in das Blut gelangen. Auch *Ramon*⁴⁾ nimmt neuerdings einen teilweisen Aufbau des Antikörpers aus dem

¹⁾ *Boone*, Journ. of Immun. **13**, 357 (1927); **21**, 139 (1931).

²⁾ *Kapsenberg*, Nederl. Tijdschr. Hyg. **3**, 71 (1928).

³⁾ *Herzfeld* und *Klinger*, Biochem. Ztschr. 1917, 1918, 1919. *Weichardt's* Erg. Hyg. **4**, 282 (1920).

⁴⁾ *Ramon*, Compt. rend. Soc. Biol. **102**, 381 (1929).

Antigen an. Er führt aus, daß jedes Mikrobenantigen, das mehrere genügend differenzierte antigene Substanzen enthält, auch zur Bildung mehrerer spezifischer Antikörper führt. Wenn die Antigene zweier verschiedener Mikrobenarten ein oder mehrere Substanzen enthalten, welche die gleiche oder eine nahe verwandte chemische Konstitution haben, so haben auch die Antikörperkomplexe eine identische oder verwandte Zusammensetzung (gekreuzte oder Grenzreaktionen). Hierbei handelt es sich um den Antikörperanteil, der dem Antigen entstammt, und der dem Antikörper die Spezifität verleiht. Wie wichtig der zu diesem noch hinzutretende Anteil ist, den der Organismus liefert, geht schon daraus hervor, daß verschiedene Individuen bei ganz gleichartiger Immunisierung Antikörper von sehr verschiedener Wertigkeit liefern. Bemerkenswert ist weiter in diesem Zusammenhang, daß das Tetanustoxin im Blute des Huhnes bis zu dem Augenblick nachweisbar ist, wo das Antitoxin erscheint, und ebenso beim Pferde das Diphtherietoxin bis kurz vor dem Auftreten des Antitoxins.

Die notwendige Folgerung aus solchen Annahmen, daß Antikörper aus dem Antigen gebildet werden, ist die, daß nicht mehr Antikörper gebildet werden, als verfügbares Antigen vorhanden ist, und gerade diese quantitative Beziehung hat manche Autoren, darunter letzthin *S. B. Hooker* und *W. C. Boyd*¹⁾ veranlaßt, diese Theorien abzulehnen. *Hooker* kam zu dem zahlenmäßigen Schluß, daß ein Molekül Antigen Agglutinin bildet, das 600 Bakterien ausflocken kann. Die Oberflächen von einem Molekül Antigen und 600 Bakterien stehen aber im Verhältnis von 1:2500000, was den Übergang von Antigen in Antikörpersubstanz sehr unwahrscheinlich macht.

Von Antikörpern selbst können wir nur bei unserem gegenwärtigen Wissen mit einiger Bestimmtheit die beiden Aussagen machen: Sie haben eine mehr oder weniger ausgeprägte Spezifität, und sie sind untrennbar mit Globulin verbunden.

Die Spezifität ist jedenfalls etwas quantitatives (Gruppen- und Verwandtschaftsreaktionen) und erreicht ihr Maximum, wenn das Antigen mit dem Antikörper reagiert, den es immunisatorisch gebildet hat. Die Affinität zwischen Antigen und Antikörper muß auf chemischen Kräften beruhen, wie sie ja auch jeder Adsorption zugrunde liegend angenommen werden müssen. Im übrigen besteht auch heute noch vollinhaltlich, was *G. Wells* 1924²⁾ schrieb:

„Die immunologischen Differenzen, die zwischen Bakterien, Pflanzen, Blut und Geweben verschiedener Tierarten bestehen, hängen, soweit Versuche vorliegen, von der chemischen Zusammensetzung der Proteine ab. Bei Anwendung geeigneter Untersuchungsmethoden haben sich immunologisch

¹⁾ *S. B. Hooker* und *W. C. Boyd*, Journ. of Immun. 21, 113 (1931).

²⁾ *G. Wells*, Journ. of Immun. 9, 291 (1924).

differente Körper auch als chemisch different erwiesen und umgekehrt. Der Antigencharakter eines Proteins hängt von der Kolloidstruktur, die Spezifität von bestimmten Radikalen im Molekül ab. Mehrere spezifische immunologische Reaktionen ein und desselben Proteins erklären sich durch das Vorhandensein mehrerer spezifischer Radikale. Übereinstimmend hiermit kann die immunologische Spezifität durch Einführung von Radikalen verändert werden (bei der auch stereochemische Differenzen eine Rolle spielen). Es steht noch nicht fest, ob physikalische Veränderungen an einem Antigen seine Spezifität beeinflussen, auch scheint noch kein erwiesener Fall vorzuliegen, der eine spezifische Immunität von rein physikalischen Eigenschaften abhängig erweist. Daher besteht zur Zeit kein Grund für die Annahme, daß die spezifische Immunität von solchen Veränderungen resp. Unterschieden der Proteine abhängt, welche nicht wenigstens in Zukunft sich als chemische Unterschiede erweisen lassen.“

Es ist bisher nicht mit Sicherheit gelungen, Antikörper von Globulin zu trennen, trotzdem man Antikörper von Eiweiß soweit hat reinigen können, daß die chemischen Nachweisverfahren für Eiweiß versagen. Es gelang, Agglutinine, Hämolytine, Antitoxine u. a. hochgradig zu reinigen und selbst chemisch eiweißfrei herzustellen (*Huntoon, Olitzky* u. v. a.). Aber der Beweis, daß diese Präparate auch in biologischem Sinne eiweißfrei waren, ist nicht erbracht worden, so daß alle solche Versuche nur zeigen, daß die wirksame antikörperhaltige Substanz in einem Serum in einer zum Gesamteiweißgehalt äußerst geringen Menge vorhanden ist.

Fest steht zunächst, daß alle Antikörper, die wir nachweisen können, an Globuline und nicht an Albumin gebunden sind, wobei es offen bleiben muß, ob nicht mit Albumin Antikörper verbunden sein können, die wir noch nicht kennen.

Nimmt man an, daß der Antikörper in den Zellen entsteht und von diesen in das Blut abgegeben wird, so scheinen nur zwei Möglichkeiten zu bestehen: Entweder ist der Antikörper kein Eiweiß und verbindet sich sofort, wenn er in das Blut gelangt, mit gewissen Globulinen desselben, oder aber der Antikörper ist ein bestimmtes Globulin, das als solches von der Zelle in das Blut gelangt.

Im ersteren Falle wäre zu erklären, daß der Antikörper sich nur mit Globulinen verbindet und auch da besondere Auswahl trifft, insofern z. B. Agglutinine und Präzipitine bevorzugt an relativ lyophoben, Antitoxine an relativ lyophilen Globulinen sich binden. Im zweiten Falle gelangt antikörperhaltiges Globulin direkt in das Blut, aber in so geringem Maße, daß dadurch der Gesamteiweißgehalt des Serums nicht meßbar geändert zu sein braucht. Die bekannte Verkleinerung des Albumin/Globulin-Quotienten im Blut immunisierter Tiere — z. B. kann ein über 2000faches genuines Di-Antitoxin haltiges Pferdeserum unter Umständen nur noch 0,6 Proz. Albumin aufweisen — braucht nicht darauf zurückgeführt werden, daß relativ viel Immunglobulin aus den Zellen in das Blut gelangt ist.

Immerhin fehlen bis jetzt quantitative Messungen desjenigen Eiweißes im Serum, das antikörperhaltig ist. Sicher ist aber der betr. Anteil sehr gering. Man beachte z. B. die großen Verdünnungen, bei denen hämolysierende oder agglutinierende Sera noch wirksam sein können. Andererseits ist meines Erachtens noch nicht sicher erwiesen, ob der Titer eines antikörperhaltigen Serums angibt, wieviel mengenmäßig 1 ccm Immunglobulinteilchen von unter sich gleicher Beschaffenheit enthält, oder ein Maß für die Wirksamkeit des Immunglobulins darstellt. Mit anderen Worten könnte z. B. ein agglutinierendes Serum mit einem schwachen Titer genau so viel mengenmäßig Immunglobulin enthalten wie ein solches mit einem hohen Titer mit dem Unterschied, daß die Affinität oder Avidität zum Antigen in ersterem Falle geringer ist.

Bekanntlich steht der Annahme einer Wesensverschiedenheit der einzelnen Antikörper, die zur Erklärung der verschiedenartigen Reaktionen (Agglutination — Lyse — Bakteriotropie usw.) dient, die unitarische Theorie gegenüber, nach der es nur einen Antikörper gibt, der sich aber je nach der Art des antigenen Substrates und je nach den Milieubedingungen des Versuchs verschieden äußern kann. Eine definitive Entscheidung ist noch nicht möglich, doch gewinnt die unitarische Auffassung an Boden und stellt jedenfalls zur Zeit eine sehr fruchtbare Arbeitshypothese dar.

*H. Zinsser*¹⁾ hat die antigenen Substanzen in zwei allgemeine Gruppen eingeteilt.

Nach seiner Definition umfaßt die eine Gruppe alle jene Substanzen bakterieller, tierischer oder pflanzlicher Herkunft, welche nach Injektion in den Tierkörper das Auftreten von spezifischen neutralisierenden oder antitoxischen Qualitäten im Blute des vorbehandelten Tieres hervorrufen. Die Reaktion, die sie im Tierkörper veranlassen, scheint die spezifische Neutralisierung zu sein; diese Reaktion ist so einzigartig und verschieden von der durch andere Antigene hervorgerufenen, daß es angezeigt wäre, die betreffenden Antigene mit einem besonderen Ausdruck wie „Antitoxinogene“ zu bezeichnen und ihnen als solchen einen getrennten Platz einzuräumen. Unter der zweiten Gruppe faßt *Zinsser* alle Eiweißkörper zusammen, welche unwirksam sind und weder toxische noch fermentähnliche Eigenschaften zeigen. Ihre parenterale Einführung in den Tierkörper ist von einer Reaktion gefolgt, die sich wesentlich von derjenigen der Antitoxine unterscheidet und welche im wesentlichen auf die Assimilierung oder Entfernung des infektiösen Materials abgestimmt ist. Nach *Zinsser's* Ansicht sind die Antikörper, die dieser Gruppe von Antigenen ihre Entstehung verdanken (Zytolysine, Agglutinine und Präzipitine), untereinander identisch in ihrer Struktur und ihrer Bedeutung.

Wie an mehreren Stellen dieses Buches näher ausgeführt wurde, dürfte meines Erachtens die Annahme, daß für die Wirkung des Antikörpers in erster Linie der Hydratationsgrad des betr. Immunglobulins in Betracht kommt, und daß für letzteren die Größe der Antigenmizelle maßgebend ist, geeignet sein, die beiden Theorien zu überbrücken. Hier sei zu dem an anderen Stellen bereits Gesagten noch einiges zur Stütze dieser Ansicht erwähnt.

¹⁾ *H. Zinsser*, *Infection and Resistance* (New York 1923).

Bekannt sind die bedeutungsvollen Beobachtungen von *A. Klopstock* und *Selter*, daß die von *Landsteiner* zur Entfaltung der vollen Antigenwirkung von z. B. Atoxyl für erforderlich erachtete chemische Kuppelung an Eiweiß nicht nötig ist, sondern daß analog zur Lipoidaktivierung durch Schleppereiweiß auch im Falle von Atoxyl oder Metanilsäure ein einfaches Mischen des diazotierten Atoxyls mit Serum zur Erreichung der vollen antigenen Atoxylwirkung ausreicht. Ausgehend von der Auffassung, daß das Atoxyl an sich in vitro nur deshalb keine antigene Funktion ausübt, weil sein Dispersitätsgrad (Mizellengröße) nicht geeignet ist, gelang es ihnen, diese für die Manifestation der A. A.-Reaktion geeignete Mizellengröße durch Zugabe von Lezithin (Mischung bei schwach saurer Reaktion) zu erreichen. Hier ist also durch Vergrößerung des Atoxylmoleküls durch Adsorption an Lezithin sowohl dessen antigene Wirkung als auch dessen Fähigkeit, in vitro zu reagieren, erreicht worden. Im ersten Abschnitt dieses Buches konnte es wahrscheinlich gemacht werden, daß die Schleppfunktion des Eiweißes nur auf einer Vergrößerung der Antigenmizelle beruht, und daß es nur dadurch gelingt, diejenigen A. A.-Reaktionen zu erzielen, für deren Zustandekommen relativ lyophile Immunglobuline vorhanden sein müssen.

E. Fränkel und *Tamari*¹⁾ gelang es ebenfalls, durch rein physikalische Beeinflussung Lipoiden antigen zu gestalten.

Von zwei kolloiden Lezithin-Cholesterin-Lösungen, von denen A durch Überführung von alkoholischer in wässrige Lösung hergestellt, B durch direktes Verreiben in wässrige Lösung gewonnen war, hatte B eine höhere antigene Wirkung. B war gröber dispers, dem isoelektrischen Punkt näher und hatte auch eine geringere Azidität als Lösung A. Brachte man aber die Lösung A möglichst nahe an den isoelektrischen Punkt durch Zusatz von CaCl₂, so hatte die nunmehr entladene Lösung A bedeutend bessere antigene Wirkung (Erzeugung komplementbindender Antikörper beim Kaninchen) als die Lösung B. Eine durch das CaCl₂ bedingte stimulierende Wirkung auf die Antikörperbildung glauben die Autoren deswegen ausschließen zu können, als eine solche höchstens eine Steigerung um 30—50 Proz., nicht aber um das 2—3fache bewirkt haben würde.

Nach *H. Fernbach* und *Fr. Heppner*²⁾ wird der Anreiz zur Agglutininbildung nicht durch molekulardisperse, sondern nur durch kolloidverteilte Bakterienbestandteile gegeben. *E. W. Schultz*³⁾ glaubt zeigen zu können, daß die ultravisiblen Virusarten zu der ersten Gruppe der antigenen Substanzen (im Sinne von *Zinsser*) gehören, also zu derjenigen Gruppe, welche nach Injektion in den Tierkörper spezifische neutralisierende oder antitoxische Antikörper erzeugen. Gerade die ultravisiblen Virusarten scheinen meines Erachtens geeignet zu sein zu beweisen, daß das gleiche

¹⁾ *E. Fränkel* und *Tamari*, *Klin. Wschr.* 6, 1148 (1927).

²⁾ *H. Fernbach* und *Fr. Heppner*, *Zbl. Bakt.* 100, 358 (1926).

³⁾ *E. W. Schultz*, *Erg. Hyg.* 9, 184 (1928).

Virus bei Vergrößerung der Mizelle imstande ist, Antikörper zu erzeugen, die auch die üblichen in vitro A. A.-Reaktionen geben können.

Was nun die Reaktionsweise zwischen Antigen und Antikörper betrifft, so scheinen die an verschiedenen Stellen dieses Buches erwähnten Arbeiten von *Shibley, Eagle, Reiner, Freund* u. a. die Möglichkeit zu erweisen, dieselbe für alle Antikörper einheitlich annehmen zu können. Auf Grund spezifischer Affinitäten wird das Immunglobulin an die Antigenmizelle gebunden und erfährt durch diese Adsorption eine Denaturierung im Sinne einer Dehydratation, die bewirkt, daß der A. A.-Komplex entweder unter dem Einfluß von Elektrolyten präzipitiert oder Komplement binden kann, dessen lytische Wirkung sich dadurch auf das Antigen überträgt, oder phagozytiert werden kann usw., wobei das Antigen selbst evtl. durch Komplement eine Lyse erfahren kann, aber sonst intakt bleibt und im Falle von Toxin durch die Adsorptionshülle des Immunglobulins neutralisiert wird. Es ist aber noch viel Arbeit zu leisten, bis diese durch ihre Einfachheit bestechende Theorie über jeden Zweifel bewiesen ist.

[Abgeschlossen Juli 1932.]

SACH-REGISTER

- A-Substanz, Natur der 65
 A-Untergruppen 70
 Agglutination 9
 — Bedeutung von Serumeigenschaften für die 20
 — Bedeutung der Lipoide für 177
 — erhitzter Bakterien 13
 — fein- und grobflockige 24, 27, 29, 52
 — Hemmungszone bei 148
 — H-Ionen-Rolle bei 16
 — Immunologische Grundlagen 22
 — physikalisch-chem. Grundlagen 9
 — sensibilisierter Thyphusbazillen durch Elektrolyte 17
 — spontane 22, 49
 — Temperatur-Einfluß 13, 20, 149
 — Unvermögen von Bakterien zur 21
 — Vorgang der 50
 — Zusammenhang mit Präzipitation 50
 Agglutinine 49
 — normale 49
 Agglutino-gen 22
 Agglutinoide 149
 Albumin-Globulin—Quotient 183
 — bei der Präzipitation 84
 Alkohol-Rolle bei der Wassermann-Reaktion 139
 Anamnestiche Reaktion 180
 Antibakterizide Wirkung v. Pneumokokkenpolysacchariden 44, 46
 Antifibrinogen 114
 Antigen, Bedingungen des Eiweißes 7
 — Definition 1, 2, 8
 — Geißel- 28
 — H- und O- bei Salmonellen 26
 — Komplexität bei d. Präzipitation 84
 — Mizellengröße 1, 5, 184
 — — Bedeutung für die Art des Antikörpers 7
 — — Bedeutung für den Unterschied zwischen Agglutination und Präzipitation 51
 — Soma- 28
 — Struktur bei Typhus-, Coli- und Ruhr-Bazillen 35
 Antigen-Antikörper-Komplex, Agglutination durch Elektrolyte 19
 — Flockungsfähigkeit 15
 — lyophobe Natur 15
 Anti-Immunkörper 112
 Antikörper 179
 — allgemeine Eigenschaften 182
 — Bildung aus Antigen 180
 — Bildung in Gewebeskultur 179
 — Reinigung 87
 — Trennung von Eiweiß 183
 — Wassermann'sche Reaktion 136
 Antikomplementäre Wirkung 146, 147
 Antiprothrombin 102
 Antiserumwirkung auf Pneumokokken 44
 Antitoxine 161
 — Avidität der 170
 Artfremdheit 1
 Autolipoid-Antikörpertheorie bei der Wa. R. 142

 B-Substanz 65
 Bakterizide Antikörper 156
 Bakterizidie 156
 — Aufhebung durch Polysaccharide 44
 — ohne Komplement 159
 Bakterioly sine 156
 Bakteriotropine 151
 β -Lysine 159
 Blutfremdes Antigen 2
 Blutgerinnung 100
 — bei Hämophilie 101, 102
 Blutgruppen 60
 — Bildung der -Antigene 61
 — Konstanz 62, 63
 Blutzellen-Membran 103
 — -Sedimentation 53
 — — Rolle der Lipoide 54
 Brillantgrün-Hämolyse 105

 Chemospezifität 2
 Cholesterin-Antikörper 3
 — -Lipoidphosphorquotient 175

- Cholesterin-Antikörper, Rolle bei der Blutzellensedimentation 54
 — Wassermann-Reaktion 134
 Konstanz der Blutgruppen 72
- Danzysz-Phänomen 164
 Denaturierung des Antigeneiweißes durch Antikörperbindung 15
 Dextran 42
 Diazotiertes Antigen 3, 40, 82
 Diphase Variation 25, 30
 Dispersitätsgrad des Antigens bei der Wa. R. 136
 — der Hämolyse 115
 Dissoziation der Kälteagglutinine 57, 59, 61
 — der Toxin-Antitoxinbindung 161, 166
- Eiweiß, Bedingungen für antigene Wirkung 7
 — razemisiertes 7
 Elektrische Ladung von Bakterien 10
 Elektrolyte, Einfluß auf Agglutination 10, 17
 — — — Bakteriozidie 158
 — — — Hämolyse 110
 — — — Ladung von Bakterien 11
 — — — Lipoidsol 123, 129, u. ff.
 — — — Phagozytose 156
 — — — Präzipitation 90
 — — — Toxin-Antitoxin-Flockung 168, 169
 Endolysine 159
 Ergosterinantikörper 3
 Extrakt, Dispersitätsgrad 136
 — für Wa. R. 123 u. ff.
 — Sensibilisierung 123, 131
- Flemings-Lysozym 159
 Flockungsreaktionen für Luesdiagnose 137, 140
 Forssman'sches Antigen 31, 36, 64, 66, 68
 Friedländerbaz.-Polysaccharid 33
- Geißelantigen 23 u. ff.
 Gelatine, kein Antigen 7
 Geldrollenbildung 53
 Globuline, Beziehung zu Lipoiden 175
 Gruppenspezifische Agglutinine, immunisatorische Gewinnung 67
 Gruppenspezifische Eigenschaften von Flüssigkeiten 64
- Gruppenspezifische Eigenschaften von Zellen 64
 Gummiarabikum 43
 — Schutzwirkung 48
- H-Antigen der X-Stämme 23
 Hämagglutination 52
 — bei Kindern 61
 — Bildung der Hämagglutino- und Agglutinine 61
 — spezifische 59
 — unspezifische 53
 — Untergruppen 69
 Hämagglutinine, Entstehung 62
 — Titterschwankungen 62
 Hämagglutinogene, Isolierung 63, 66
 Hämolyse, Beeinflussung durch Elektrolyte 110
 — — des Eiweißzusatzes 112
 — Beziehung zum Färbungsprozeß 120
 — Brillantgrün 105
 — durch Saponin 104
 — Kieselsäure 105
 — Kolloide Zinnsäure 105
 — quantitative Beziehungen 109
 — spezifische 106, 107
 — spezifische ohne Kompl. 113
 — Tannin 106
 — Vorgang der Lyse 106
 — unspezifische 103
 — Rolle der Lipide 178
 Hämolysin 114
 — Bindung und Dissoziation 115
 — immunisatorische Erzeugung 114
 — Natur 117
 — normale 115
 — Reindarstellung 115
 Hämotoxin 113
 Haptene 3
 — der Bakterien 31
 Hapten-Schlepper-Theorie 4
 Haptennatur der Pneumok. Polysaccharide 39
 Hefe-Polysaccharide 33
 H-Ionen bei Agglutination 12
 — — Bakterizidie 158
 — — Lipoidsol 122, 124, 137
 — — Komplementhämolyse 111
 — — Präzipitation 89
 — — Wa. R. 138
 Hemmungsphänomen bei Agglutination 20, 21
 Hemmungszone 146
 — bei Präzipitation 79

- Heparin 101, 103
 Heterogenetische Antikörper (siehe Forssman-Antigen)
 Heteropolarität des Antikörpers 117, 173
 Hirnlipoid 144
 Hitzeeinwirkung auf Agglutination 28
 — — Antigene 48
 Hitzekoagulierte Eiweiß als Antigen 7

 Isoagglutinogene, Abwaschbarkeit 66
 I-Bakterien 73
 Isoelektrischer Punkt bei Agglutination 16 u. ff., 59
 Isohämagoagglutination 59
 Isohämolyse 63
 — Opsonine 63
 — Präzipitine 63

 Kälteagglutination 55, 58
 — Absorbierbarkeit und Eluierbarkeit der Kälteagglutinine 57
 — Beziehung zu A-Untergruppen 71
 Kältehämolyse 113
 Kapsel der Pneumok. 44
 Kieselsäurehämolyse 105
 Kohäsion bei Agglutination 10, 11
 Kohlehydrate (siehe unter Polysaccharide)
 Kolloidium als Adsorbens und Schlepper 41, 50, 80, 162
 — als Schleppersubstanz 5
 Komplement 93
 — Allgemeine Eigenschaft 94, 100
 — bei Bakterizidie und Bakteriolyse 157
 — bei Phagozytose 152
 — Bindung und Ablenkung 118
 — Bindung bei Wa. R. 132
 — dritte Komponente 95, 98
 — Erklärungsversuche für die Zerlegung d. Ko. 96
 — -Hämolyse 107
 — Inaktivierung 94, 133
 — Mangel bei Meerschweinchen 98
 — Mittel- und Endstück 94
 — quantitative Beziehung zum Antikörper 109, 119, 120
 — Spezifität 108
 — vierte Komponente 96
 — Zerlegung in Einzelkomponenten 94
 — Zonenphänomen bei Komplementbindung 148

 Komplement, Zusammenhang mit Blutgerinnung 100
 — -bindung, Beziehung zur Präzipitation 90
 Komplettierung der Polysaccharidhaptene 39
 Körperflüssigkeiten, Gruppenspezifität 64
 Körperfremdes Antigen 2
 Kritisches Potential bei Agglutination 10, 17

 Ladung der Bakterien 10 u. ff.
 — durch Adsorption 14
 — Beeinflussung durch Elektrolyte 11
 — — — Nichtelektrolyte 12
 Lezithinrolle bei der B. S. G. 54
 Leukine 159
 Leukozyten, Gruppenspezifität 64
 Lipoidantikörper 5, 138, 185
 Lipoide, Bedeutung für die Blutzellsedimentierung 54
 Lipoide Beziehung zu Globulin 175
 — bei serologischer Reaktion 176
 — des Serums 174
 — Entfernung aus dem Serum 176
 — Rolle bei Agglutination 177
 — — bei Präzipitation 176
 — — — serologischen Reaktionen 174
 — — — T. A.-Flockung 177
 Lipoidmindestmenge bei Wa. R. 136
 Lipoidsol, Beeinflussung d. Serum 122 u. ff.
 — isoelektrischer Punkt 122
 — Rolle der Dispersität bei Wa. R. 136
 Lipoid-Spezifität 144
 Lösungsvorgang der roten Blutzellen 106
 Lyophobie des A. A. Komplexes 15
 Lysozym 159

 M-Bakterien 73
 Meerschweinchen ohne Komplement 98
 Methodisches zur Wa. R. 145
Microc. lysodeicticus 159
 M-Rezeptor 69

 Nichtagglutinabilität 21
 Normalagglutinine 49
 Normalhämolyse 115
 N-Rezeptor 69

 O-Antigen der X-Stämme 13
 Oberflächengröße, Rolle bei der A. A.-Reaktion 47

- Oberflächenspannung, Rolle für Stabilität von Bact. suspension 22
Oberflächenwirkung des Cholesterins 134
— bei Phagozytose 155
— — T. A.-Flockung 173
Opsonine 151
- Panagglutination 56
Paraffinemulsion als Antigen bei Wa. R. 139
Paroxysmale Hämoglobinurie 2, 55
Periodizität bei Lipoidsoltrübungen 129 u. ff
Pfeiffer'sches Phänomen 156
Phagozytose 45, 151
— Mechanismus 155
— spontane 153
Phenolalkohol bei Wa. R. 139
Phenolwirkung auf Oberflächenspannung erhitzten Serums 173
Plakine 159
Plazenta-Gruppenspezifität 64
Pneumokokken-Typen 32 u. ff., 38
— Umwandlung 37
Pneumonie-Lungenpreßsft 47
Pneumonie-Rekonvaleszentenblut 47
Polysaccharide aus versch. Bakterien 31—38
— Bedeutung für Virulenz 36
— der Pneumokokken 31
— Friedländer Baz. 33
— als Haptene 4
— Hefe 33
— Typenspezifität 32 u. ff.
Polysaccharide der Pneumokokken, ihre antigenen Eigenschaften 38
— antibakterizide Wirkung 44
— funktionelle Neutralisation durch Antiserum 44
— Zusammenhang mit R- und S-Form 47
Präzipitation 76
— der Polysaccharide 77
— Optimum 77, 82, 91, 133
— quantitative Verhältnisse 77
— Vorzone 79, 148
— und Lipoidanwesenheit 176
— Zusammenhang mit Agglutination 51
Präzipitat, Zusammensetzung 80
Präzipitineinheit 77
Präzipitinbildung gegen mehrere Antigene 85
- Präzipitinbildung, Antigen-Antikörper-Verhältnis 81
— Beteiligung verschiedener Antikörper 87
— Bez. z. Komplementbindung 90
— Komplexität des Antigens 84, 88
— Mindestantigenmenge 86
— physikalische Einflüsse 88
— Überstehende Flüssigkeit 83
P-Rezeptor 69
Prothrombin 101
- Rezeptoren-Analyse 23
R-Formen 25, 29
— Zusammenhang mit Polysacchariden 47
Reihenfolge der Zusätze bei spezifischer Hämolyse 107
— — bei serologischer Reaktion 104, 105
Reversibilität der Toxin-Antitoxinbindung 161, 166
- Salzfällung von Bakterien 12
Saponin 104
Säureagglutination 12
Schutzstoffe gegen Pneumokokken 44
Schwein, A-Substanz beim 66
— Komplement 96, 98
Schwellenwert bei Agglutination durch Elektrolyte 11
Sedimentation der roten Blutzellen 53
— beeinflussende Faktoren 55
Semihaptene 3
Sensibilisierung von Eisenhydroxydsol 139
Serum, erhitztes, Wirkung auf Agglutination 20
Serumkrankheit 85
Serumlipoide 174
S-Formen 25, 29
— Zusammenhang mit Polysacchariden 47
— Wassergehalt 49
Spermatozoen, Gruppen-Spezifität 64
Spezifitätsänderung 2
— durch chemische Eingriffe 2
Spezifität der Kälteagglutination 58
— des Elementes bei der Hämolyse 108
Spirochäten-Antikörper 143
— -Extrakt 143
Spontane Agglutination 22, 49
Streptokokken-Polysaccharide 34

- Stroma 103
 Synthetisches Lipoid 3
- T. A.-Flockung, Natur der 170
 — Doppelflockung 171
 — Flockensubstanz, Natur 171
 — Rolle der Lipoide bei T. A.-Flockung 177
- Tannin-Hämolyse 106
 — bei Phagozytose 156
 Tannin-Wirkung auf Toxin 164
 Temperatureinfluß auf die Agglutination 13, 30, 149
 — — — Hämagglutination 75
 — — — Hämolyse 109, 111
 — — — Präzipitation 89
 — — — Wa. R. 147
 — — — Bakteriotropie 153
- Thermische Amplitude der Kälteagglutination 55, 57
 Thomsen'sches Phänomen 72
 Toxine 161
 Toxinadsorption an Kollodium 162
 Toxin-Antitoxin-Flockung 165, 167, 168, 172
 — Geschwindigkeit 167, 169
 Toxinneutralisation 163
 Toxoid 161
 Tränenlyse von Bakterien 159
 Tropine 151
 — Spezifität 154
 T-Rezeptor 73
 Trübung bei Präzipitation 92
 Trypanosomen Kompl.-Bindung 143
 Typhusbazillen agglutination durch Coliserum 41
 Tyrosin als Antigen 3
- Umwandlung der Pneumokokkentypen 37
 Untergruppen M, N, P 69
 Unitarische Theorie der Antikörper 184
 Variation der Bakterien 26, 30
 Verdünnung, Rolle bei Hämagglutination 61
 — — — Präzipitation 89
 Virulenz der Pneumokokken 36, 44
 Viskosität bei der Agglutination 21
 Vorzone bei der Agglutination 11
 — — — Präzipitation 79
- Wassermann'sche Reaktion 121
 — Antikörper 136
 — Autilipoidantikörper 142
 — Beeinflussung der Lipoidkonzentration 134
 — Extrakt 123
 — — Beeinflussung durch normales Serum 122 u. ff.
 — — — syphilitisches Serum 124
 — — Sensibilisierung 131
 — — Trübungsreaktion 126 u. ff.
 — Methodik 145
 — Reaktion von O. Sciarra 145
 — — Bachmann 145
 — im Eisschrank 147
 — nach Entfernung der Serumlipide 178
 — Zonenphänomen 147
 — Rolle des Cholesterins 134
 — Rolle der Globuline 141
 — Rolle des Komplements 132
- X-Stämme 23
 Zonenbildung 146

Soeben beginnt zu erscheinen:

Medizinische Kolloidlehre

Physiologie, Pathologie u. Therapie in kolloidchemischer Betrachtung

Herausgegeben von

Prof. Dr. L. Lichtwitz **Dr. Dr. R. E. Liesegang** **Prof. Dr. K. Spiro**†

Direktor der I. Inn.-Abt. des
Rudolf-Virchow-Krankenhauses
Berlin

Frankfurt a. M.

Direktor des Physiologisch-
Chem. Instituts der Univer-
sität Basel

Umfang des Werkes etwa 50—60 Bogen (800—1000 Seiten)

mit vielen Abbildungen, Tabellen und Kurven.

Erscheinungsweise: Das Werk erscheint zunächst in Lieferungen. Mit etwa 10 Lieferungen von je 5 Bogen soll das Werk abgeschlossen sein. Monatlich gelangt etwa eine Lieferung zur Ausgabe.

Preis: Der Subskriptionspreis beträgt pro Lieferung **RM 5,—**. Dieser Preis erlischt nach Vorliegen der letzten Lieferung; eine **Preiserhöhung** bleibt vorbehalten.

Zweck und Ziel: Seit vielen Jahren wächst in weiten Kreisen immer mehr die Überzeugung von der fruchtbaren Einwirkung kolloidchemischer Gesichtspunkte auf biologische, physiologische und rein medizinische Fragen. Ja, es wurde bereits die Behauptung aufgestellt, daß wirklich Fortschritte auf dem Gebiet der Pathologie und Therapie hauptsächlich durch physikalisch-chemische und kolloidchemische Betrachtungsweise zu erhoffen sind.

Aus dieser Erkenntnis heraus ist bei den Herausgebern und dem Verlag nach jahrelanger Vorarbeit der Entschluß zu einer

„Medizinischen Kolloidlehre“

entstanden. Die einzelnen Kapitel und Beiträge werden in der Hauptsache von solchen Mitarbeitern geschrieben, die als Forscher und Praktiker bereits längere Zeit unter Zugrundelegung kolloidchemischer Gedankengänge erfolgreich tätig waren und nun ihre fruchtbare Erkenntnis ihren medizinischen Kollegen vermitteln wollen.

Inhaltsverzeichnis:

I. Allgemeine Kolloidlehre in Beziehung zur Biologie und Pathologie

1. Einleitung (u. a. Protoplasma, Altern, Assimilation, Speicherung) *R. E. Liesegang*. 2. Kolloidosmotischer Druck biologischer Flüssigkeiten *Paul Meyer*. 3. Oberflächenspannung *F. Herék*. 4. Permeabilität *F. Leuthardt*. 5. Konkrementbildung *L. Lichtwitz* u. *K. G. Stern*. 6. Immunität *A. Klopstock*. 7. Fermentwirkungen *K. G. Stern*.

II. Medizin:

A. Organe und Systeme

1. Haut *O. Gans* u. *F. Herrmann*. 2. Nierenphysiologie und -pathologie *D. Nachmansohn*. 3. Auge *E. P. Fischer*. 4. Muskel (Herz) *G. Boehm*. 5. Obere Luftwege (Mundhöhle, Nase, Luftröhre, inkl. Inhalationstherapie) *J. Berberich*, *J. Kleeberg*. 6. Lunge *P. Spiro*. 7. Leber, Galle, Milz, Speicheldrüsen, Milch-, Talg-, Schweißdrüsen *Hinsberg* und *A. Schürmeyer*. 8. a) Blut *Kl. Gollwitzer-Meyer*; b) Blut-Hämolyse, c) Blutgerinnung, d) Lymphe *K. Klinke*; e) Vehikelfunktion *H. H. Bønnhold*. 9. Blutgefäße, Thrombose und Embolie (Synthese) *H. Lampert*. 10. Wasserhaus-

halt *Paul Meyer*. 11. Endokrines System *Hinsberg* u. *A. Schürmeyer*. 12. Nervensystem *J. Hallervorden*. 13. Knochensystem *R. Bucher*. 14. Zähne *W. Praeger*. 15. Gelenke (inkl. Arthritis deformans) *C. Häbeler*. 16. Verdauungskanal *K. Scheer*.

B. Heilmittel und Gifte

1. Kolloide und kolloid wirkende Heilmittel, 2. Narkose *E. Starckenstein*. 3. Kleinste Lebewesen und Desinfektion *H. Reichel*. 4. a) Diätetik im Kindesalter *K. Scheer*; b) Diätetik der Erwachsenen *H. Lampert*, *W. Heupke*, *J. Strasburger*. 5. Strahlentherapie *F. Dessauer* u. *R. E. Liesegang*. 6. Verbandstoffe *H. Moser*. 7. Balneologie *K. Harpuder*. 8. Medizinische Kosmetik *H. Süllmann*.

III. Untersuchungsmethoden

1. Labilitätsreaktionen *A. Klopstock*. 2. Wassermann-Reaktionen; 3. Goldsol- und andere Liquor-Reaktionen *C. Lange*. 4. Histologische Technik *K. Zeiger*.

IV. Schlußworte (Zusammenfassung)

1. Innere Medizin *L. Lichtwitz*. 2. Chirurgie *C. Häbeler*. 3. Gynäkologie und Geburtshilfe *H. Runge*.

VERLAG VON THEODOR STEINKOPFF, DRESDEN UND LEIPZIG

Elektrophorese, Elektroosmose, Elektrodialyse in Flüssigkeiten

Von Dr. Ing. **P. H. Prausnitz**, Jena, und Dipl.-Ing., Dr. phil., Dr. techn. **J. Reitschötter**, Patentanwalt, Berlin. (*Bd. XXIV der „Wissenschaftl. Forschungsberichte“*.) XII, 307 Seiten mit 54 Abb. (1931.) Preis RM. 16.65, geb. RM. 18.—.

Das vorliegende Werk bringt die erste vollständige, durchaus modern gehaltene Darstellung dieses so wichtigen Gebietes. Sie ist genügend knapp, vorzüglich gegliedert, gut verständlich unter restloser Berücksichtigung der gesamten einschlägigen, auch der medizinischen sowie der sonst schwer zugänglichen Patentliteratur. Ein vortrefflicher Führer für den Biologen und wissenschaftlich tätigen Arzt auf einem für ihn zukunftsreichen Arbeitsfeld. (*Deutsche med. Wochenschrift*.)

Die Kolloide in Biologie und Medizin

Von Prof. Dr. **H. Bechhold**, Mitglied des Instituts für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. 5., völlig umgearbeitete Auflage. XII, 586 Seiten mit 87 Abbildungen und 7 Tafeln. (1929.) Preis RM 28.80, gebunden RM 31.50.

INHALT: Einführung in die Kolloidforschung. I. Was sind Kolloide? — II. Grenzflächen — III. Teilchen, Mizelle, Molekel, Ion, Dynade, Individualgruppe — IV. Bewegungsercheinungen — V. Formbeständigkeit der Kolloide — VI. Optische und elektrische Eigenschaften der Kolloide — VII. Methoden der Kolloidforschung — Die Biokolloide — VIII. Kohlehydrate — IX. Lipoide — X. Proteine — XI. Die Nahrungs- und Genußmittel — XII. Die Enzyme — XIII. Immunitätsreaktionen — Der Organismus als kolloides System — XIV. Stoffverteilung und Stoffwechsel — XV. Formbildung und Formveränderung, Wachstum und Entwicklung — XVI. Die Zelle — XVII. Die Bewegungen der Organismen — XVIII. Blut, Atmung, Kreislauf und seine Störungen — XIX. Resorption — XX. Sekretion und Exkrete — XXI. Der Nerv — XXII. Toxikologie, Pharmakologie und Therapie — XXIII. Mikroskop, Technik — Namen- und Sachregister.

Besonders muß hervorgehoben werden, daß **Bechhold** die Interessen des Mediziners, insbesondere auch des Klinikers, durchaus berücksichtigt. Nirgends wird der Arzt, dem die physikalische Chemie ferner liegt, sich durch Betrachtungen oder mathematische Formulierungen, die ihm unverständlich bleiben, entmutigt fühlen, überall wird er in origineller Weise die Probleme der Medizin von kolloidchemischen Gesichtspunkten aus erörtert finden. . . . Alles in allem ein wertvolles Buch für Mediziner. Es sollte möglichst viel studiert werden, denn die Fragen der Pathologie und Pharmakologie, der Immunitätsforschung und der Therapie gewinnen hier eine so eigenartige Beleuchtung, daß jeder Leser Anregungen empfangen wird — wohl das Beste, was man von einem Werk sagen kann . . .

(*Deutsche medizin. Wochenschrift*.)

Pharmakologie in ihren Problemstellungen Eine Ergänzung zu den Lehrbüchern

Von Prof. Dr. **Hans Handovsky**, Göttingen. (Band XXV der *Wissenschaftl. Forschungsberichte*.) XII, 234 Seiten. (1931.) Preis brosch. RM 15.75, geb. RM 17.—.

Inhalt: (Hauptabschnitte) I. Pharmakologie der Energieverwertung — II. Pharmakologie des Wasser- und Ionenstoffwechsels unter Berücksichtigung der Permeabilitätsphänomene und der Struktur überhaupt — III. Pharmakologie der autonomen Innervierung der Organe — IV. Pharmakologie der motorischen Leistungen — V. Pharmakologie der zentralnervösen Regulationsvorgänge — VI. Nar-kose und Schlaf, Narkotica und Schlafmittel — VII. Pharmakologie der Verdauungstätigkeit — VIII. Pharmakologie der Geschlechtsfunktionen — IX. Pharmakologie der Umstimmungen — Literaturverzeichnis — Register.

Das Werk enthält in engem Rahmen eine ganz überraschend reichhaltige Zusammenstellung von experimentell-pharmakologischen Befunden und zahlreiche Hinweise auf ungelöste Probleme.

(*Klinische Wochenschrift*.)

Die Darstellung der physiologischen und pathologischen Grundlagen der pharmakologischen Probleme ist so ausführlich und verständlich gehalten, daß das Buch auch dem Arzte zugänglich ist und empfohlen werden soll, der auf den Höhen wissenschaftlicher Gedankenarbeit Erholung sucht von den praktischen Getriebe des Tages.

(*Therapie der Gegenwart*.)

VERLAG VON THEODOR STEINKOPFF, DRESDEN UND LEIPZIG

Allgemeine Chemie der Enzyme

Von Prof. Dr. **J. B. S. Haldane** (Cambridge) und Dr. **Kurt G. Stern** (Berlin).
Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. L. Michaelis (New York). (Wissenschaftliche Forschungsberichte Band XXVIII.) XII, 367 Seiten. 38 Abbildungen und 35 Tabellen. (1932.) Preis RM 22.—, geb. RM 23.50.

Von den zahlreichen bekannten Werken über Enzyme unterscheidet sich dieses Buch durch die neuartige Anordnung des Stoffes. Die Ergebnisse der Enzymforschung werden hier unter Verzicht auf strenge Systematik von einem allgemeineren Standpunkt aus betrachtet, vom Standpunkt der physikalischen Chemie. Viele Dinge erscheinen dadurch in neuem Licht, viele Lücken unseres Wissens werden offenbar. Sollte emand Anregungen für notwendige enzymatische Arbeiten suchen, so findet er sie hier in großer Zahl. Die Grundlinien der Enzymforschung und ihre Probleme hat Haldane klar erkannt — wenn sich auch in dem etwa 1000 Zitate umfassenden Literaturregister sein Name nur zweimal findet! Er hat mit der vorbildlichen Anschaulichkeit, die englischen Darstellungen eigen ist, auch die schwierigen Gebiete dargestellt und verständlich gemacht. Es sei nur an die Darstellung der Theorie von Michaelis und an ihre formale Übereinstimmung mit der Langmuir'schen Adsorptionstheorie erinnert, an die molekularstatistische Berechnung der Anzahl Enzymmoleküle pro Zelle, an die neuartige Einteilung der Oxydationsenzyme nach ihrem Aktivierungsvermögen, an die Einteilung der hemmenden Substanzen in kompetitive (die mit dem Substrat um das Enzym konkurrieren) und nicht-kompetitive. Man muß K. G. Stern Dank dafür wissen, daß er dieses Buch ins Deutsche übertragen und in mehrfacher Hinsicht durch eigene Beiträge ergänzt hat. Felix Haurowitz (Prag) in *Kolloid-Zeitschr.*

Fortschritte der Biochemie II. (1924—1931)

Von Dr. med. Dr. rer. nat. **Felix Haurowitz**, Professor für physiologische Chemie an der Deutschen Universität in Prag. (Band XXVI der Wissenschaftlichen Forschungsberichte.) X, 152 Seiten. (1932.) Preis RM 11.—, geb. RM 12.—.

INHALT (Hauptkapitel): 1. Materie, Strahlung und chemische Kräfte — 2. Elektrolyte und Mineralstoffe — 3. Phasengrenzen (Membranen) — 4. Katalyse und Enzyme. 1. Oxydationen — 5. Katalyse und Enzyme. 11. Hydrolysen — 6. Konstitution der Kohlehydrate — 7. Glykogen und Oxydation der Kohlehydrate — 8. Chemie der Muskelkontraktion — 9. Das Eiweißmolekül — 10. Eiweißabbau — 11. Nukleinsäuren und ihre Derivate — 12. Blutfarbstoff und verwandte Farbstoffe — 13. Immunitätsreaktionen — 14. Fette, Phosphatide, Zerebroside — 15. Sterine, Gallensäuren und Vitamin D — 16. Isoprenoderivate, Carotinoide und Vitamin A — 17. Hormone und Vitamine unbekannter Zusammensetzung — 18. Biochemische Methodik — Autoren- und Sachregister.

Dieses kleine Buch ist hoch erfreulich. Es ist wirklich erstaunlich, mit wie wenigen Worten ein klarer Kopf das Wichtigste über die aktuellen Probleme sagen kann. Die Hauptgesichtspunkte stehen deutlich da, und die Literaturzitate helfen weiter. So ist es ein überaus wertvolles Hilfsmittel ebensowohl für den Arzt oder Chemiker, der sich schnell informieren will, wie für den Lehrer (oder Schreiber), der nochmal eine (ihm an sich bekannte) Tatschengruppe oder die dazugehörige Hauptliteratur überschauen will. Dtsch. med. Wschr. 1932.

Der 1925 erschienene Band I über die

Fortschritte der Biochemie der Jahre 1914 bis 1924

ist noch lieferbar. Preis RM 6.—, geb. RM 7.20.

Die Konstitution der Kohlenhydrate

Von **W. N. Haworth**, Professor der Chemie und Direktor des chemischen Instituts der Universität Birmingham. Autorisierte Übersetzung von Dr. phil. **W. Ed. Hagenbuch**, ehemaliger Assistent an der Universität Basel. (Band XXIX der „Wissenschaftlichen Forschungsberichte.“) VIII, 104 Seiten mit 8 Abbildungen und 2 Tafeln. (1932.) Preis RM 8.—, gebunden RM 9.—.

INHALT: I. Einleitende Übersicht über die Reaktionen und die ältere Formulierung der Zucker — II. Einige Eigenschaften der Laktone und ihre Beziehungen zur Ringstruktur — III. Inkonssequenzen in der älteren Formulierung der Zucker und ihrer Methylderivate — IV. Methylierte Laktone und ihre Beziehungen zur Struktur der Zucker — V. Normale Fruktose. Die Verallgemeinerung, daß alle normalen Zucker mit Pyran verwandt sind — VI. Labile oder γ -Zucker und ihre Beziehungen zu Furan — VII. Acetonverbindungen und Zuckerkarbonate — VIII. Die reduzierenden Disaccharide—Laktose, Maltose, Cellobiose, Gentiobiose und Melibiose — IX. Saccharose (Rohzucker) und die Trisaccharide, Raffinose und Gentiobiose — X. Die Polysaccharide — Namen- und Sachregister.

VERLAG VON THEODOR STEINKOPFF, DRESDEN UND LEIPZIG

Elektrizität und Eiweiße insbesondere des Zellplasmas

Von Dr. **Hans Pfeiffer**, Bremen. (Band XXI der Wissenschaftl. Forschungsber.) XII, 149 Seiten. Mit 7 Abbildungen. (1929.) Preis RM 9.—, geb. RM 10.20.

INHALT: Vorbemerkungen: 1. Grenzen und Möglichkeiten einer Elektrophysiologie der Biokolloide und speziell der Zelleiweiße. 2. Allgemeine Charakteristik der Eiweiße als Kolloide — I. Die Vorgänge bei der elektrischen Beladung disperser Teilchen — II. Grundzüge des elektrischen Verhaltens disperser Eiweißteilchen — III. Grundlinien der Auswirkung elektrophysiologischer Erscheinungen am plasmatischen Eiweiß — Autoren- und Sachregister.

Das Werk steht auf einer hohen wissenschaftlichen Stufe. . . . Bei der zunehmenden Bedeutung, die die Elektrizität für die Betrachtung aller Naturvorgänge gewinnt, sei dieses Werk allen, die sich für diese modernste Richtung der Biologie interessieren, aufs angelegentlichste empfohlen.

Schweiz. mediz. Wchschr.

Das ungemein interessante und lesenswerte Buch, das ein gewaltiges Literaturmaterial über den Gegenstand bringt, führt den Leser in physikalisch-chemische Eigenschaften des Eiweißes und in die sich daraus ergebenden biologischen Probleme ein. Es dürfte kein Werk vorliegen, das in so knapper Form so die schwierige Materie behandelt und zugleich an der Hand der Literaturzitate ermöglicht, tiefer in den Stoff einzudringen.

Wien. mediz. Wchschr.

Die Globuline

Von Dr. **Mona Spiegel-Adolf**, Assistentin am Institut für Medizin. Kolloidchemie der Universität Wien. (Band IV vom: Handbuch der Kolloidwissenschaft in Einzeldarstellungen, herausgegeben von Prof. Dr. Wo. Ostwald, Leipzig.) XVI, 452 Seiten mit 68 Abbildungen u. 300 Tabellen. (1930.) Preis broschiert RM 29.50, gebunden RM 31.50.

INHALT: (Hauptkapitel): 1. Chemie der Globuline. — 2. Globuline und Laugen. — 3. Globuline und Säuren. — 4. Globuline und Neutralsalze. — 5. Globuline und Schwermetallsalze, Kolloide und Biokolloide. — 6. Die Globuline in Biologie und Medizin.

Das Buch ist ganz vortrefflich und stellt einen wertvollen Behelf für Physiologen, Chemiker und Immunitätsforscher wie für den experimentellen medizinischen Forscher überhaupt dar.

Wien. med. Wchschr.

Diese Monographie verdient unter den Medizinern einen möglichst großen Leserkreis zu finden. Für alle medizinischen Laboratorien und Kliniken, in denen an den genannten Fragen gearbeitet wird, dürfte das Buch als Führer geradezu unentbehrlich sein.

Münch. med. Wchschr.

Demnächst erscheint:

Lipide und Ionen

Eine allgemein biologische und ärztliche Studie über die physiologische Bedeutung der Zell-Lipide.

Von Prof. Dr. **Rud. Degkwitz**, Direktor der Universitätskinderklinik in Hamburg. Mit einer Widmung für Geh. Rat Prof. Dr. v. Pfaundler, München. (Wissenschaftliche Forschungsberichte Band XXXI.) XVI, 323 Seiten mit 54 Abb. und 110 Tabellen. (1933.) Preis etwa RM 20.—, geb. etwa RM 21.50.

Inhalt (stark gekürzt): 1. Einleitung und Problemstellung — 2. Lipide und Lipid-antagonismen — 3. Grenzflächenkräfte und Grenzflächenenergien (Adsorption — Stabilität hydrophober Kolloide — Hydrophile Kolloide — Eigenschaften von Grenzflächenschichten) — 4. Physikalische Eigenschaften polyphasiger Systeme (Lipoidzusätze und Quellungs Kapazität, Art der Wasserbindung und Elastizität von Gelatine-Gelen — Emulsionen und Emulsatoren) — 5. Wirkungen von Zell-Lipiden auf Einzelzellen, Zellstaaten und Einzelorgane — Cholesterin und Lecithin im Wasser-Säure-Basen-Haushalt — Autoren- und Sachregister.

Bei der zunehmenden Bedeutung der Lipide und Ionenantagonismen für die gesamte Biologie und Klinik — es sei nur an die Bedeutung der Lipide für die Leberfunktionen, der Lipid-Ionenwirkung auf die Nieren- und Darmausscheidungen, des bestrahlten Ergosterins usw. erinnert — wird das Erscheinen dieses Buches gerade bei Ärzten und Biologen größtem Interesse begegnen. Durch Einstreuung zahlreicher biologischer Beispiele, Beigabe zahlreicher Abbildungen und Tabellen wurde der Inhalt besonders interessant gestaltet. Das Buch trägt aber auch den Interessen des Biologen und naturwissenschaftlich Eingestellten Rechnung, ja man kann es gewissermaßen als ein neues Emulsionsbuch ansehen, das auch für viele Industriezweige von großer Bedeutung ist.

VERLAG VON THEODOR STEINKOPFF, DRESDEN UND LEIPZIG

Wissenschaftliche Forschungsberichte

Herausgegeben von R. E. Liesegang.

Band:

- I: **Analytische Chemie** von Prof. Dr. Th. Döring. VIII, 97 S. (1921.)
M. 2.40; geb. M. 3.60
- II: **Allgemeine Geologie und Stratigraphie** von Dr. A. Born. X, 145 S. (1921.)
M. 3.60; geb. M. 4.70
- III: **Organische Chemie** von Prof. Dr. R. Pummerer. 2., vermehrte und verbesserte Auflage. XII, 210 S. (1923.)
M. 4.—; geb. M. 5.20
- IV: **Die drahtlose Telegraphie und Telephonie** von Dr. P. Lertes. 2. Auflage. XII, 200 S., mit 48 Abb. (1922.)
M. 3.—; geb. M. 4.—
- V: **Die neuere Entwicklung der Quantentheorie** von Prof. Dr. A. Landé. 2. völlig umgearbeitete Auflage. XII, 180 S., mit 13 Abb. (1926.)
M. 10.—; geb. M. 11.20
- VI: **Kolloidchemie** von Dr. Raph. Ed. Liesegang. 2. völlig umgearbeitete Auflage. XII, 176 S. (1926.)
M. 7.20; geb. M. 8.50
- VII: **Materie, Elektrizität, Energie.** Grundlagen und Ergebnisse der experimentellen Atomforschung von Prof. Dr. W. Gerlach. 2. erweiterte Auflage. XII, 296 S., mit 119 Abb. (1926.)
M. 13.50; geb. M. 14.80
- VIII: **Physikalische Chemie.** I. Teil. Chemisch reine Stoffe. Lösungen, von Prof. Dr. A. Benrath. VIII, 107 S. (1923.)
M. 3.—; geb. M. 4.20
- IX: **Kolloide in der Technik** von Dr. Raph. Ed. Liesegang. VIII, 160 S. (1923.)
M. 3.60; geb. M. 4.70
- X: **Agrikulturchemie** von Prof. Dr. F. Honcamp und Dr. O. Nolte. VIII, 160 S. (1924.)
M. 3.60; geb. M. 4.70
- XI: **Wettervorhersage** von Prof. Dr. Wa. Georgii. VIII, 114 S., mit 58 Abb. (1924.)
M. 4.—; geb. M. 5.20
- XII: **Biochemie der Menschen und der Tiere (1914—1924)** von Dr. F. Haurowitz. XII, 148 S., mit 9 Abb. (1925.)
M. 6.—; geb. M. 7.20
- XIII: **Physikalisch-chemische Mineralogie und Petrologie** von Prof. Dr. W. Eitel. VIII, 176 S., mit 54 Abb. (1925.)
M. 7.20; geb. M. 8.40
- XIV: **Physikalische Chemie.** II. Teil. Thermische und photochemische Gleichgewichts- und Geschwindigkeitslehre von Prof. Dr. A. Benrath. X, 192 S. (1925.)
M. 7.—; geb. M. 8.20
- XV: **Methoden der angewandten Geophysik** von Dr. R. Ambronn. XII, 258 S., mit 84 Abb. (1926.)
M. 13.50; geb. M. 14.80
- XVI: **Anorganische Chemie** von Prof. Dr. R. Schwarz. VIII, 139 S. (1927.)
M. 6.—; geb. M. 7.20
- XVII: **Krankheitslehre der Gegenwart** von Prof. Dr. G. Herxheimer. XVI, 256 S. (1927.)
M. 10.80; geb. M. 12.—
- XVIII: **Erblichkeitsforschung an Pflanzen** von Prof. Dr. F. Oehlkers. VIII, 203 S., mit 10 Abb. (1927.)
M. 11.70; geb. M. 13.—
- XIX: **Hormone und innere Sekretion** von Prof. Dr. F. Laquer. VIII, 136 S. (1928.)
M. 7.65; geb. M. 9.—
- XX: **Biologische Kolloidchemie** von Dr. R. E. Liesegang. XII, 127 S. (1928.)
M. 7.20; geb. M. 8.50
- XXI: **Elektrizität und Eiweiße** insbesondere des Zellplasmas von Dr. H. Pfeiffer. XII, 149 S., 7 Abb. (1929.)
M. 9.—; geb. M. 10.20
- XXII: **Entwicklungsphysiologie der Tiere** von Dr. P. Weiss. VIII, 138 S. (1930.)
M. 9.80; geb. M. 11.—
- XXIII: **Heterogene Katalyse** von Dr. E. Sauter. VIII, 80 S., mit 15 Abb. (1930.)
M. 5.40; geb. M. 6.50
- XXIV: **Elektrophorese, Elektrosmose, Elektrodialyse** von Dr. P. Prausnitz und Dr. Dr. Jos. Reitstötter. XII, 307 S., 54 Abb. (1931.)
M. 16.65; geb. M. 18.—
- XXV: **Pharmakologie in ihren modernen Problemstellungen** von Prof. Dr. H. Handovsky. XII, 224 S. (1931.)
M. 15.75; geb. M. 17.—
- XXVI: **Fortschritte der Biochemie II (1924 bis 1931)** von Prof. Dr. F. Haurowitz. X, 152 S. (1932.)
M. 11.—; geb. M. 12.—
- XXVII: **Die lichtelektrische Zelle und ihre Herstellung** von Dr. R. Fleischer und Dr. H. Teichmann. XII, 175 S., 201 Abb. u. 29 Tab. (1932.)
M. 12.—; geb. M. 13.20
- XXVIII: **Allgemeine Chemie der Enzyme** von Haldane-Stern. Mit einer Einführung von Prof. Dr. L. Michaelis. XII, 367 S., mit 38 Abb. und 35 Tabellen. (1932.)
M. 22.—; geb. M. 23.50
- XXIX: **Die Konstitution der Kohlenhydrate** von W. N. Haworth. Ins Deutsche Übersetzt von Dr. W. E. Hagenbuch. VIII, 104 S., mit 8 Abb. u. 2 Tafeln. (1932.)
M. 8.—; geb. M. 9.—
- XXX: **Fortschritte der Serologie** von Prof. Dr. H. Schmidt. VIII, 191 S., mit 20 Abb. (1933.)
- XXXI: **Lipoide und Ionen.** Eine allgemein biologische und ärztliche Studie über die physiologische Bedeutung der Zell-Lipoide von Prof. Dr. R. Degkwitz. Mit einer Widmung für Geh. Rat Prof. Dr. v. Pfaundler, München. 323 S., mit 54 Abb. und 110 Tabellen. (1933.)
Ca. M. 20.—; geb. ca. M. 21.50
- XXXII: **Oberflächenspannung in der Biologie und Medizin** von Dr. med. et rer. nat. F. Herčík. Ca. 200 S., mit 56 Abb. und 35 Tabellen. (Erscheint 1933.)
Ca. M. 12.—; geb. ca. M. 13.20

Weitere Bändchen sind in Vorbereitung.