

Über die chemische Natur des Blutgruppenfaktors Rh

Von WILLI SPIELMANN

Aus der Serologischen Abteilung des Paul-Ehrlich-Instituts, Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. R. Prigge)

(Z. Naturforschg. **4b**, 284—293 [1949]; eingegangen am 18. Juli 1949)

1. Es wird über ein verbessertes Verfahren zur Darstellung reiner, höchwirksamer Haptenpräparate aus menschlichem Blut berichtet. Verschiedene Lipoidextraktionsmittel wurden angewandt und miteinander verglichen. Der ätherlösliche Extrakt, aus dem alle wasserlöslichen Bestandteile sorgfältig entfernt waren, wurde mehrmals mit Aceton gefällt und die Substanz schließlich an der Aluminiumoxydsäule chromatographisch gereinigt.

2. Auf Grund der Elementaranalysen, der Löslichkeitsverhältnisse und anderer chemischer und physikalischer Eigenschaften kamen wir zu der Vermutung, daß es sich bei dem Rh-Hapten offenbar um ein Phosphatid, und zwar wahrscheinlich um ein Monoaminophosphatid handeln müsse.

3. Bei der Untersuchung verschiedener handelsüblicher Lipoide, wie Lecithin, Cephalin und Cholesterin, fanden wir, daß nur das erstere eine starke Rh-Haptenwirkung nicht nur im Absorptionstest und Komplementfixationstest, sondern auch bei der Rh-Antikörper-Absorption im Tierkörper (Meerschweinchen) besitzt. Andere Iso-Agglutinine des Blutes werden nicht beeinflusst.

4. Auf Grund dieser Ergebnisse gingen wir der Frage der Spezifität der Rh-Haptene nach. Dabei stellten wir fest, daß alle untersuchten Untergruppen-Antikörper ungefähr in gleichem Maße von den verschiedenen Haptenpräparaten, ganz gleichgültig, welche Rh-Untergruppe zur Haptenherstellung benutzt wurde, sowie vom Lecithin abgesättigt werden. Es wird angenommen, daß es sich bei dem Rh-Hapten um ein einheitliches, mit dem Lecithin verwandtes ubiquitär vorkommendes Phospholipoid handelt, das im allgemeinen am Lecithin haftet, während für die streng spezifische Reaktion der roten Blutkörperchen von verschiedenen Rh-Typen mit den homologen Rh-Antisera noch andere, vorläufig unbekannte Faktoren verantwortlich sind. Parallelen zur Wassermann-Reaktion werden dargelegt.

Durch die Arbeiten von Koßjakow¹ und Tribulew² sowie vor allem von Freudenberg und Mitarbb.³ ist bekannt, daß es sich bei den Gruppenstoffen A, B und 0 im wesentlichen um Substanzen mit Polysaccharidcharakter handelt, die Stickstoff in Form von Hexosaminen und Aminosäuren enthalten und sich durch einen hohen Gehalt (etwa 35%) an Galaktose auszeichnen. Die Angaben in älteren Darstellungen, wonach es auch A- und B-spezifische Substanzen mit Lipoidcharakter geben soll⁴⁻⁹, haben sich als unzutreffend erwiesen. Über die chemische Natur der

Blutgruppenfaktoren M und N ist noch nichts Sicheres bekannt; jedenfalls handelt es sich bei diesen Stoffen nicht um Lipoide, wie durch die eingehenden Untersuchungen Koßjakows und Tribulews² feststehen dürfte, da sie nicht durch Lipoidlösungsmittel extrahiert werden können, sondern im allgemeinen nach der Extraktion noch an den Erythrocyten nachweisbar sind.

Hinsichtlich der chemischen Natur der Rh-Substanz konnten M. Calvin und Mitarbb.¹⁰ deren Lipoidnatur wahrscheinlich machen. Sie stellten bei der Verarbeitung von Stroma hämolyzierter Erythrocyten fest, daß Rh-Antikörper nur

¹ P. N. Koßjakow, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **99**, 221 [1941].

² P. N. Koßjakow u. S. C. Tribulew, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **98**, 261 [1940].

³ K. Freudenberg u. F. Eichel, Liebigs Ann. Chem. **510**, 240; **518**, 97.

⁴ K. Landsteiner u. van der Scheer, J. exp. Med. **1925**, 427.

⁵ W. Dölter, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **43**, 95 [1925].

⁶ B. Brahn u. F. Schiff, Klin. Wschr. **1924**, 679; **1926**, 1455.

⁷ L. Lattes, Ph. Schneider u. K. v. Beöthy, Wien. klin. Wschr. **29**, 1038 [1928].

⁸ M. Eisler u. P. Morisch, Z. Immunitätsforsch. **57**, 421 [1928].

⁹ V. Schröder, Z. Immunitätsforsch. **75**, 77 [1932].

¹⁰ M. Calvin, R. S. Evans, V. Behrendt u. G. Calvin, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **61**, 416 [1946].

durch das Stroma Rh-positiver Zellen gebunden werden, nicht aber durch das Stroma rh-negativer Zellen. Die Bindung von Rh-Antikörpern erfolgt hier also in streng spezifischer Weise. Das durch Extraktion des Erythrocyten-Stromas gewonnene Rh-Antigen ist thermolabil; es wird wahrscheinlich durch Denaturierung seines Trägerproteins bei 56° C innerhalb von 5 Min. zerstört. Aus dem Stroma konnten die genannten Verfasser zwei verschiedene Stoffe isolieren: das bereits früher von Jorpes¹¹ beschriebene Stromatin und ein bisher unbekanntes Lipoprotein, das sie Elinin nannten, und das die Eigenschaften eines Rh-Antigens besitzt. Außerdem enthält das Elinin jedoch in hohem Maße A- und B-spezifische Substanzen. Aus dem Elinin konnten Calvin und Mitarbb. mit Äther einen Stoff extrahieren, der einen 4—5-mal höheren Gehalt an Rh-wirksamen Substanzen enthielt und bei 56° C völlig thermostabil war, jedoch durch Zusatz von Protein seine Thermolabilität wiedergewann. Diese Befunde konnten von den Autoren jedoch nicht immer reproduziert werden.

Die Arbeiten über die Natur des Rh-Faktors haben nicht nur theoretische Bedeutung, sondern sie gewinnen neuerdings auch praktischen Wert im Hinblick auf die Gewinnung von Rh-Haptenen zur Prophylaxe und Therapie der Erythroblastose. Für diese häufig erwogene Behandlungsmöglichkeit suchte Siegert¹² die experimentellen Voraussetzungen zu schaffen. Durch fraktionierte Extraktion von menschlichem Rh-Blut mit Alkohol, Äther und Aceton ließ sich ein „Acetonfaktor“ gewinnen, der im „Absorptionstest“ in vitro und in vivo ein gutes Bindungsvermögen für agglutinierende Rh-Antikörper aufwies. Diese Substanz war frei von Eiweißbestandteilen und ohne antigene Eigenschaften, so daß man ihr Haptennatur zusprechen mußte. Diese rohen Haptenpräparate zeigten jedoch quantitative Unterschiede in ihrem Verhalten, so daß Präparate mit gleichbleibender chemischer Zusammensetzung und serologischer Wirkungsstärke gesucht werden mußten. In der vorliegenden Arbeit wurde

diese Aufgabe in Angriff genommen. Im Laufe unserer experimentellen Arbeiten konnten wir neue Anhaltspunkte über die chemische Natur des Rh-Haptens gewinnen, so daß schließlich die Bindungsreaktion auch mit einfachen chemischen Modellsubstanzen erreicht werden konnte.

Bei unseren Untersuchungen haben wir uns zunächst nach dem bekannten präparativen Verfahren zur Isolierung von Lipoiden aus Blutkörperchen gerichtet^{13, 14, 8, 6, 15}.

Die Extraktion bei 37° C mit 95-proz. reinem Alkohol sowie mit Benzol ergab die besten Resultate. Außerdem wurden Chloroform, Äther, Aceton und Methylenchlorid angewandt. Wir stellten fest, daß beim Ausziehen mit Benzol oder Benzol-Alkoholgemischen die Ausbeute an Rh-wirksamen Lipoiden zwar erheblich geringer ist als bei Verwendung von reinem Alkohol, daß aber die so erhaltene Lipoidfraktion einen höheren Reinheitsgrad besitzt und sich leichter von unerwünschten Begleitstoffen befreien läßt. Dennoch extrahierten wir meist wegen der besseren Ausbeute und der Möglichkeit, die Lipide nach anderen Methoden zu reinigen, mit 95-proz. reinem Alkohol. Es erwies sich als unnötig, die Blutkörperchen vor der Extraktion zu hämolysieren, wie es von Calvin und Mitarbb. ursprünglich empfohlen wurde und wie es auch Carter^{16, 17} vorschreibt. Eine unmittelbare Extraktion des Haptens aus dem Stroma nach vorsichtiger Alkoholextraktion bei 4° C nach Carter lieferte schlechtere Ausbeuten und weniger reine Präparate. Wiederholt man aber die Extraktion 3—4-mal mit frischem Alkohol, so kann die Ausbeute an Lipoiden wesentlich erhöht werden und der Rückstand ergibt weder mit Äther noch mit Chloroform nennenswerte Mengen an Lipoiden.

Bei längerem Stehenlassen des zunächst klaren alkoholischen Filtrats bei Zimmertemperatur setzt sich zuweilen ein flockiger weißer Niederschlag ab, der aus Kephalin oder ähnlichen colaminhaltigen Phosphatiden besteht und serologisch unwirksam ist. Von dem so gewonnenen trockenen Alkoholextrakt zeigen 1—2 mg in ccm häufig schon eine schwache Rh-Haptenwirkung im Absorptionstest.

¹¹ E. Jorpes, *Biochem. J.* **26**, 1488 [1932].

¹² R. Siegert, 1. Vortr. Med. Ges. Frankfurt a. M. 7. Jan. 1948; 2. Vortr. Tg. Mittelrhein. Ges. für Gynäkologie Frankfurt a. M. 1. Oktober 1948; 3. R. Siegert u. W. Spielmann, *Z. exp. Medizin* (im Druck).

¹³ E. Woolridge, *Arch. Anat. u. Physiol.* **1881**, 389; Ref.: Abderhalden, *Handb. d. biol. Arb.-Meth.* IV, 3, S. 672.

¹⁴ Ph. A. Levene u. C. J. West, *J. biol. Chemistry* **33**, 111 [1917].

¹⁵ K. Ohya, *Z. Immunitätsforsch. exp. Therap.* **63**, 337 [1929].

¹⁶ B. B. Carter, *Amer. J. clin. Pathol.* **177**, 646 [1947].

¹⁷ B. B. Carter, *J. Immunology* **1949**, 79.

Es wurde jedoch immer eine weitere Reinigung angeschlossen durch Ausziehen mit Äther und sorgfältige Entfernung des wasserlöslichen Anteils durch mehrmaliges Ausschütteln der Ätherlösung mit Wasser im Scheidetrichter. Die sorgfältige Trennung der äther- und alkohollöslichen Extraktanteile halten wir für besonders wichtig, da bei den älteren Haptenpräparaten je nach dem Feuchtigkeitsgehalt des Rückstandes oder des benutzten Äthers in wechselndem Maße Wasser mitgeschleppt wurde. Der wasserlösliche Anteil des Alkoholextraktes wurde nach Abdampfen des Wassers bei 25 °C und 15–20 mm Hg gesondert untersucht. Es handelte sich dabei um ein dunkelgrünes Pulver, das zwar eine große Menge Gruppenantigene A bzw. B enthielt, jedoch nur eine minimale Rh-Haptenwirkung entfaltete. 5 mg in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung waren notwendig, um die Rh-Antikörper aus einem Standardserum vom Titer 1:8 (= 3 Stufen) zu binden.* Gegen blockierende Antikörper war keine Wirkung festzustellen.

Die ätherlösliche Fraktion wurde durch mehrmaliges Fällen mit Aceton gereinigt. Bei der Acetonfällung der Lipide gingen jedesmal etwa 30% der Lipoidsubstanz verloren. Dieser Verlust wurde jedoch wegen der dabei erzielten Reinigung in Kauf genommen. Durch 5-maliges Umfällen konnten Präparate gewonnen werden, die im Absorptionstest eine Rh-Wirksamkeit entfalteten, die das Rohprodukt zuweilen um das Zehnfache übertrafen.

Eine weitere, wenn auch weniger in Erscheinung tretende Reinigung konnte durch chromatographische Adsorption an der Aluminiumoxydsäule¹⁸ erzielt werden, wobei die haptenhaltige Zone unter der UV-Lampe an ihrer charakteristischen Fluoreszenz gut zu erkennen war. Hierdurch wurden die gruppenspezifischen Substanzen A und B, die sonst die Lipoidfraktion hartnäckig begleiten, weitgehend entfernt. Die Rh-Haptenwirkung betrug maximal 10–20 γ pro ccm bei einem 3-stufigen Standardserum.

Sowohl vom Rohprodukt als von verschiedenen gereinigten Haptenpräparaten wurden Elementar-

* Unter Standardserum verstehe ich ein absorbiertes Meerschweinchen-Immunsrum, das nur Anti-Rh-Antikörper enthält.

¹⁸ Die chromatographische Adsorption wurde von mir im Laboratorium des Chemie-Werks Homburg Ffm. durchgeführt. Ich möchte Hrn. Dr. Reuber für die Erlaubnis zur Benutzung der notwendigen Apparate danken.

analysen¹⁹ angefertigt. Der N- und O-Gehalt nahm mit zunehmender Reinigung ab, was auf eine Eliminierung der Aminosäuren und Polysaccharide hindeutet; das Verhältnis P:N näherte sich dem für Monoaminophosphatide charakteristischen Wert 1:1. Die Eiweißreaktionen, wie die Sulfosalicylsäureprobe, die Molisch- und Biuretreaktion, waren negativ. Cholesterin und ähnliche Steroide mit positiver Reaktion nach Liebermann-Burchard waren nur in geringer Menge (weniger als 2%) in den gereinigten Präparaten enthalten. Da sie in Aceton leichter löslich sind als die Phosphatide, findet man sie im Rückstand des Ätheracetongemisches angereichert, der oft zu 90% aus Stoffen besteht, die positiv nach Liebermann-Burchard reagieren, aber serologisch nahezu unwirksam sind.

Als serologische Testreaktion wurde außer dem Absorptionstest der Komplementfixationstest in der quantitativen Versuchsanordnung nach Kolmer²⁰ durchgeführt. Jedoch konnte durch diese Versuche nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich bei unseren gereinigten Präparaten, die sich sämtlich sogar bei 1-stdg. Erhitzen auf 100 °C als thermostabil erwiesen, wohl etwa um unspezifische Agglutinations- bzw. Hämolysehemmungen handeln könnte; zwar wurde die Agglutination von A- und B-Blutkörperchen sowie von M- und N-Blutkörperchen durch die entsprechenden Antiseren bei Gegenwart des Haptens nicht oder nur in sehr geringem Grade beeinflusst. Es könnte jedoch sein, daß die Rh-Antikörper eine große Affinität zu allen möglichen Lipoiden besitzen. Diese Annahme einer nicht streng spezifischen Wirkung der Lipide wurde dadurch unterstützt, daß auch aus dem Serum²¹ und dem Urin¹² (2., 3.) Rh-positiver Menschen Stoffe mit Rh-Haptenwirkung isoliert werden konnten; ja es gelang sogar, aus alten, vollkommen verdorbenen 0Rh-Erythrocyten, die vor Beginn der Extraktion nicht im geringsten mehr mit Rh-Seren reagierten, erhebliche Mengen Rh-Hapten zu isolieren.

Um diese Frage der Spezifität genauer zu klären, prüften wir zunächst verschiedene bekannte handelsübliche Lipide in unseren serologischen Testversuchen. Da es sich bei dem Rh-Hapten auf Grund unserer Analysenergebnisse, der Löslich-

¹⁹ Die Elementaranalysen wurden in den Höchster Farbwerken durchgeführt.

²⁰ J. A. Kolmer u. Boerner, *Approved Laboratory Technique* 4th Edition 1945.

²¹ Unveröff. Untersuchungen von Spielmann.

keitsverhältnisse und gewisser chemischer Eigenschaften²², offenbar um ein Phosphatid handelt, wurden außer dem reinen Cholesterin, das keine Wirkung zeigte, das Lecithin und Kephalin genau untersucht. Während auch das Kephalin praktisch keine Rh-Wirksamkeit zeigte, übertraf das handelsübliche Lecithin²³ selbst unsere reinsten, wirksamsten, aus Blutkörperchen hergestellten Lipoidpräparate, an Rh-Wirksamkeit. Weniger als 10 γ in 1 ccm können aus einem 3-stufigen Anti-Rh-Serum die Antikörper völlig absättigen, wie wir nicht nur im Absorptionsversuch, sondern auch im Komplementbindungsversuch nachweisen konnten. Auch gegen blockierende Antikörper ist es wirksam. Dagegen zeigte es sowohl gegen A- und B-Antikörper als auch gegen M- und N-Antikörper in der angewandten Konzentration keine antikörperbindende Fähigkeit. Die Handelspräparate wurden durch Umfällen aus ätherischer Lösung in Aceton oder nach der Vorschrift von Levene und Rolf bzw. nach Pangborn²⁴ vor der serologischen Austestung gereinigt. Auf diese Weise konnten wir bei den verschiedenen Lecithinpräparaten zu einer befriedigenden Übereinstimmung hinsichtlich der Wirkung auf die normalen agglutinierenden Rh-Antikörper gelangen. Dennoch ist es durchaus möglich, daß kleine Mengen von chemisch ähnlichen Begleitstoffen für die Haptenwirkung verantwortlich sein können.

Es ist also wahrscheinlich, daß das Lecithin entweder in reiner Form oder in Verbindung mit geringen Mengen noch unbekannter Begleitstoffe ebenso wie das Rh-Hapten mit den Rh-Antikörpern reagiert. Weiterhin scheint in dem natürlichen Rh-Antigen als wirksamer Haptenbestandteil offenbar Lecithin oder ein verwandter Körper, der aber nicht nur an das Rh-positive Blut gebunden ist, sondern auch in anderen lecithinhaltigen Geweben verschiedener tierischer Herkunft z. B. im Eidotter vorkommt, vorzuliegen. Dieses „Rh-Grundlipoid“ reagiert in annähernd gleicher Weise mit den Antikörpern aller Rh-Untergruppen. Bei den Rh-Untergruppenantigenen könnte man sich dann entweder vorstellen, daß

²² Über die chemischen Eigenschaften der Spaltstücke der Verseifung sind Untersuchungen im Gange, die später im Zusammenhang veröffentlicht werden sollen.

²³ Lecithin ex ovo puriss Merck.

²⁴ Ph. A. Levene u. Rolf, J. biol. Chemistry **72**, 587 [1927]; M. C. Pangborn, ebenda **137**, 540 [1941].

sieh die verschiedenen Untergruppenlipoide nur sehr wenig voneinander unterscheiden, vielleicht durch die Struktur ihrer Fettsäurereste, so daß es bei der Verwendung der Haptene leicht zu übergreifenden (overlapping) Reaktionen kommt, oder, was mir als wahrscheinlicher erscheint, daß gewisse wirksame molekulare Bezirke des gleichen Grundlipoids durch Anlagerung bestimmter spezifischer Eiweißpartialantigene blockiert oder maskiert werden können, so daß sie mit den entsprechenden Antikörpern erst nach Abtrennung der Eiweißbestandteile reagieren können. Durch Denaturierung des Trägerproteins wird die Agglutinationsfähigkeit vollkommen aufgehoben. Die Annahme eines allen Blutarten gemeinsamen Grundlipoids gibt auch eine Erklärung dafür ab, daß man auch aus altem verdorbenem Rh-positivem Blut sowie aus Rh-negativem Blut Stoffe mit Rh-Hapten-Charakter gewinnen kann. Die Tatsache, daß man aus alten, mit Anti-Rh-Seren nicht mehr reagierenden Blutkörperchen leicht, aus Rh-negativem Blut jedoch nur schwer durch besonders sorgfältige ausgiebige Extraktion Rh-Hapten gewinnen kann, spricht nur für diese Annahme, da man in letzterem Falle durch die Alkoholbehandlung die meisten Eiweißstoffe vom Grundlipoid abtrennen muß. Weiter wird diese Hypothese dadurch gestützt, daß man mit den von uns hergestellten Haptenpräparaten sowie mit Lecithin alle untersuchten Untergruppenantikörper²⁵: Anti-C, Anti-D, Anti-E sowie in geringerem Grade sogar Anti-c absättigen kann (andere Untergruppenserum standen uns nicht zur Verfügung). Weiterhin haben Longhrey und Carter²⁶ mit ihrem aus Rh-positivem Blut (nähere Angaben über die Rh-Untergruppen des zur Hapten-Darstellung verwandten Blutes fehlen) hergestellten Hapten bei einem Kind, das nur Anti-E Antikörper besaß, diese völlig neutralisieren und das Kind retten können, das ohne diese Behandlung wenig Aussicht auf Heilung hatte. Es ist nicht anzunehmen, daß die Verfasserin zufällig ausschließlich oder vorwiegend die relativ seltenen Untergruppen Rh' oder Rh₂, die den E-Anteil enthalten, für ihre Hapten-Darstellung ausgesucht hat, von den noch selteneren Gruppen Rh₁Rh₂ und Rh'Rh'' ganz zu schweigen. Wei-

²⁵ Wir sind Hrn. Dr. E. A. Mourant, The Lister Institute, London, für die Überlassung der Untergruppenserum zu großem Dank verpflichtet.

²⁶ F. Longhrey u. B. B. Carter Amer. J. Obstetr. Gynecol. **55**, 1051 [1948].

terhin spricht für diese Annahme, daß wir bei einem menschlichen Anti-Rh-Serum, das ein typisches „Prozone Phänomen“²⁷ zeigte, mit einem schwachen agglutinierenden Anti-C-Anteil, dieser letztere zuerst, und mit kleinen Haptenmengen gebunden werden konnte, während zur Entfernung des blockierenden Anti-D-Anteils erheblich größere Mengen Hapten notwendig waren.

Als ein weiteres wesentliches Argument für eine echte Haptenwirkung des Lecithins erachten wir die Tatsache, daß das Lecithin auch die Antikörper bei immunisierten Meerschweinchen *in vivo* in wesentlich höherem Maße bindet, als die aus Blut hergestellten Haptene. 40 mg Lecithin konnten bei einem 500 g schweren Meerschweinchen alle spezifischen Rh-Antikörper absättigen.

Daß es sich sowohl bei unseren aus Blut hergestellten Haptenpräparaten als auch beim Lecithin um Stoffe handelt, die einer echten Antikörperbindung fähig sind, konnte endlich noch durch den Agglutininabsprengungsversuch bewiesen werden. Diese Absprengung, die, wie üblich, bei 56°C vorgenommen wurde, gelang jedoch bisher nur bei Verwendung eines hochwertigen, agglutinierenden Anti-D-Serums vom Titer 1:256²⁸. Der Titer der Absprengungsflüssigkeit betrug maximal 1:8. Bei Verwendung anderer agglutinierender Seren mit geringerem Antikörpergehalt (z. B. Titer 1:16) gelang der Absprengungsversuch nicht. Ebensowenig konnten die an das Hapten gebundenen blockierenden Antikörper in AB-Serum oder Gelatinelösung abgesprengt werden. Dennoch konnte auch hier in vielen Fällen, ähnlich wie bei der Verwendung agglutinierender Seren, die Antikörperbindung an einer massiven Flockung erkannt werden, während antikörperfreie Seren mit den gleichen Haptenlösungen nur eine Trübung zeigten.

Aus unseren Versuchsergebnissen glauben wir schließen zu dürfen, daß zwar unsere Haptenpräparate sowie das Lecithin *ex ovo* einer echten Rh-Antikörperbindung fähig sind, daß die Lipidhaptene jedoch nicht allein für die Agglutination der Rh-positiven Erythrocyten durch die entsprechenden Rh-Antiseren verantwortlich sind, sondern daß hier in wechselndem Maße noch zusätz-

liche, vermutlich eiweißähnliche Partialantigene eine Rolle spielen. Hier denkt man unwillkürlich an gewisse Parallelitäten zwischen dem Rh- und dem Wassermann-Antigen. Auch bei der Wassermannschen Reaktion reagieren gewisse Lipidantigene in spezifischer Weise mit den Lues-Antikörpern insofern, als diese Lipide unter dem Einfluß der Lues-Spirochaeten (und gewisser anderer Mikroorganismen) aus normalen Organen in Freiheit gesetzt und so reaktionsfähig werden. Diese Wassermannantigene sind nach Pangborn²⁹ (ebenso wie das Rh-Antigen) Phospholipide (Cardiolipin), die zur Entfaltung ihrer Wirkung einen Lecithinzusatz erfordern. Nach E. und F. Maltaner³⁰ bindet auch das Lecithin allein unter bestimmten Bedingungen die Lues-Antikörper aus dem syphilitischen Serum und gibt so Anlaß zu einer positiven Komplementbindungsreaktion. Daneben gibt es auch im luetischen Organismus, wie Gaethgens³¹ zeigen konnte, Antikörper anderer Art, die nur gegen das Spirochaeteneiweiß gerichtet sind.

Jedenfalls ergeben sich beim Studium der chemischen Natur der Rh-Haptene viele interessante Parallelen zu verschiedenen Gebieten der Serologie, um deren Erforschung wir uns weiterhin bemühen werden.

Experimenteller Teil

Präparation von Rh-Hapten³²

1. 800 ccm einmal gewaschene Rh-positive Erythrocyten (Sediment) werden unter Rühren langsam mit der fünffachen Menge reinem 95-proz. Alkohol versetzt. Man läßt das Gemisch 8 Tage bei 37°C stehen und schüttelt täglich 3—4 Stdn. kräftig auf der Maschine.

2. Der alkoholische Extrakt wird von dem Blutkörperchenrückstand abgesaugt. Der Rückstand wird zweckmäßig noch zweimal mit Alkohol extrahiert. Ein aus der alkoholischen Lösung etwa abgeschiedener weißer Niederschlag von Kephalin oder ähnlichen Substanzen wird vor der weiteren Verarbeitung durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen. Die gesammelten alkoholischen Filtrate werden bei 25°C i. V. zur Trockne gedampft.

3. Der getrocknete Alkoholextrakt wird in Wasser aufgenommen und erschöpfend ausgeäthert. Die gesammelten Ätherauszüge werden mit *n*/20-HCl und

²⁷ Hattersley u. Fawcett, Amer. J. clin. Pathol. **1947**, 695.

²⁸ Wir danken Hrn. Dr. Fiscoeder, Serag-Werke München, für die Überlassung dieses Serums.

²⁹ M. C. Pangborn, J. biol. Chemistry **143**, 247 [1942]; **153**, 343 [1944]; **157**, 691 [1945].

³⁰ E. u. F. Maltaner, J. Immunology **51**, 195 [1945].

³¹ Gaethgens, Med. Klin. **1929**, 390.

³² Die geschilderten Reinigungsversuche und die serologische Auswertung der einzelnen Fraktionen wurden z. Tl. in Zusammenarbeit mit R. Siegert durchgeführt.

dann mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und nach Entfernen des Na_2SO_4 auf etwa 20 ccm eingengt.

4. Die schwach gelbe Ätherlösung wird langsam unter Schütteln mit der fünffachen Menge reinen, eisgekühlten Acetons versetzt. Nach kurzer Zeit scheidet sich ein flockiger, weißer, voluminöser Niederschlag ab. Um die Ausbeute an Lipoidschubstanz zu erhöhen, läßt man das Gemisch zweckmäßig bei 4°C über Nacht stehen. Dann wird zentrifugiert und nach Entfernen des „Abgusses“, der verworfen wird, im dunklen Vacuumexsiccator unter CO_2 bei $40\text{--}50^\circ\text{C}$ getrocknet. Ausb. 500—600 mg.

5. Zur Reinigung des Rohproduktes wird es in wenig Äther gelöst und in der eben beschriebenen Weise wieder mit Aceton gefällt. Die Umfällung ist 4—5-mal zu wiederholen, wenn man Präparate von annähernd gleicher Reinheit und serologischer Wirksamkeit erhalten will. Ausb. 100—150 mg.

6. Anschließend wurde die Substanz noch chromatographisch gereinigt. Dazu wurde eine möglichst konzentrierte Haptenlösung in Cyclohexan (z. B. 200 mg in 2 ccm) hergestellt. Diese wurde langsam durch eine Säule ($15 \times 1,2$ cm), die zu $\frac{3}{4}$ mit Aluminiumoxyd³³ gefüllt war, geschickt. Unter der UV-Lampe konnte man während der Elution gut die Wanderung durch die Säule beobachten. Die haptenhaltige Zone zeigte eine bläulich, milchigweiße Fluoreszenz, die sich von der schwach violetten Eigenfluoreszenz des Aluminiumoxydes und Cyclohexan gut abhob. Im oberen Teil der Säule setzte sich ein gelblich fluoreszierender Anteil fest, der am Aluminiumoxyd sehr fest haftete und dadurch von der gereinigten Substanz gut zu trennen war. Da die Elution schwierig war, gingen wir so vor, daß wir das Aluminiumoxyd aus dem oberen Teil der Säule, der die Verunreinigung enthielt, verwarfen und das übrige Aluminiumoxyd mit abs. Alkohol am Rückfluß auskochten. Die so gereinigte Substanz wies durchweg einen geringeren N-Wert auf als das nicht chromatographisch gereinigte Hapten, und die serologische Wirkung wurde etwa auf das Doppelte gesteigert. Auf diese Weise konnten wir als Endprodukt 60—80 mg einer hellbraunen, klebrigen, zuweilen wachsartigen Substanz isolieren, die sich als hochwirksames Rh-Hapten erwies. Die Elementaranalysen des Rohproduktes und der gereinigten Substanzen sind in Tab. 1 zusammengestellt.

	Rohprodukt	Durch Umfällen teilweise gereinigte Substanz	Endprodukt
% P	2,9 — 3,1	3,0 — 3,2	3,3 — 3,4
% N	3,0 — 3,2	2,3 — 2,4	1,9 — 2,0
% C	56,8 — 57,0	61,0 — 61,3	62,4 — 62,6
% H	7,44 — 7,48	9,72 — 9,84	11,17 — 11,20
J. Z.	43,3	59,2	66,4

Tab. 1.

Serologische Untersuchungen

Bei der serologischen Austestung der Haptenpräparate wandten wir zunächst den in einer früheren Arbeit ausführlich beschriebenen Absorptionsversuch an. Um genau dosierte Haptenlösungen zu erhalten, lösten wir zunächst eine genau abgewogene Menge des Haptens in absol. Alkohol, worin es relativ gut unter schwacher Gelbfärbung löslich ist. Meist arbeiteten wir mit einer alkoholischen Stammlösung, die 2% Hapten enthielt. Diese Lösung verdünnten wir mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5; handelte es sich um den Nachweis einer Absättigung sogenannter monovalenter oder blockierender Antikörper, so wurde die alkoholische Stammlösung mit AB-Serum oder Gelatinelösung im gleichen Verhältnis 1:5 verdünnt. Wir verwendeten dabei nicht die von Fisk und Gee³⁴ angegebene 10-proz. Gelatinelösung, sondern eine 8-proz., wie sie von der Fa. Biotest in Frankfurt in den Handel gebracht wird. Da der Alkohol als solcher in geringem Grade die Agglutination unspezifisch hemmen kann, legten wir Wert darauf, Kontrollen mit der gleichen Alkoholkonzentration wie im eigentlichen Versuch zu verwenden.

Zunächst sei die Wirksamkeit der verschieden weit gereinigten Haptenpräparate im Hinblick auf ihr Vermögen, Rh-Antikörper aus Meerschweinchenimmunsere zu binden, an einigen Tabellen erläutert. Wir verwendeten einen Abguß des Anti-Rh-Serums vom Meerschweinchen (Nr. 79,2) in einer Ausgangsverdünnung 1:10. Da die abgestuften Haptenmengen immer im gleichen Volumen des Lösungsmittels hinzugegeben wurden, betrug die erste Verdünnungsstufe 1:20 (Tab. 2).

Auswertung des Rohproduktes	Auswertung der gereinigten Substanz							
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/20	1/40	1/80	1/160
1 mg/1 ccm	—	—	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 ccm	±	—	—	—	—	—	—	—
250 γ /1 ccm	+	+	±	—	—	—	—	—
100 γ /1 ccm	+	+	±	—	—	—	—	—
50 γ /1 ccm	+	+	±	—	±	—	—	—
25 γ /1 ccm	+	+	±	—	+	+	±	—
Kontrolle	+	+	±	—	+	+	±	—

Tab. 2.

Die gruppenspezifischen Anteile A bzw. B, die bei der Verwendung von ARh- oder BRh-Blut den Lipoidschubstanz immer hartnäckig anhaften, konnten durch die Reinigungsmethoden erheblich reduziert werden, wie aus folgenden Tabellen hervorgeht. Als Beispiel sei die antikörperbindende Wirkung aus B-Serum durch ein aus ARh-Blut hergestelltes Hapten erläutert (Tab. 3 u. 4).

³³ Merck (zur chromatograph. Adsorptionsanalyse, standardisiert nach Brockmann).

³⁴ Fisk u. Gee, Amer. J. clin. Pathol. 1947, 737.

Rohprodukt							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1 mg/1 ccm	--	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 ccm	+	\pm	—	—	—	—	—
250 γ /1 ccm	+	+	+	\pm	—	—	—
Kontrolle	++	++	+	+	+	\pm	—

Tab. 3.

Gereinigtes Rh-Hapten							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1 mg/1 ccm	\pm	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 ccm	+	+	\pm	\pm	—	—	—
250 γ /1 ccm	++	+	+	+	\pm	—	—
Kontrolle	++	++	+	+	+	\pm	—

Tab. 4.

Die antikörperbindende Wirkung des Rh-Haptens auf Seren, die nur blockierende Antikörper enthalten, war schwächer, aber an verschiedenen Seren in gleicher Stärke nachweisbar (Tab. 5 u. 6).

Rh-Serum M.: 0 rh; blockierende Antikörper 1: 64 +; keine agglutinierende Antikörper							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1 mg/1 ccm	—	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 ccm	\pm	—	—	—	—	—	—
250 γ /1 ccm	+	+	\pm	—	—	—	—
100 γ /1 ccm	+	+	+	+	\pm	—	—
Kontrolle	++	+	+	+	\pm	\pm	—

Tab. 5.

Rh-Serum S.: A, rh; blockierende Antikörper 1: 256 +; keine agglutinierende Antikörper									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
2 mg/ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 mg/1 ccm	+	+	\pm	\pm	—	—	—	—	—
0,5 mg/1 ccm	++	+	+	+	\pm	\pm	—	—	—
Kontrolle	++	++	+	+	+	+	\pm	\pm	—

Tab. 6.

Das Serum M. und das Serum S. wurden mit Gelatinelösung soweit verdünnt, bis der Titer gerade 1:32 betrug. Dann entfaltete das Haptenpräparat auf beide Serumverdünnungen die gleiche Wirksamkeit, wie Tab. 7 zeigt.

Als weiteres Beispiel sei die Auswertung eines hochwertigen Anti-Rh-Serums wiedergegeben, das zweierlei Rh-Antikörper besaß: einen agglutinierenden Anteil vom Titer 1:8 (wahrscheinlich Anti-C)

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1 mg/1 ccm	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 ccm	\pm	—	—	—	—	—
250 γ /1 ccm	+	\pm	\pm	—	—	—
100 γ /1 ccm	++	+	+	\pm	—	—
Kontrolle	++	+	+	+	\pm	—

Tab. 7.

und einen blockierenden Anti-D-Anteil, der das Prozonephänomen²⁷ zeigte, und einen Titer von 1:1024 \pm bei Verdünnung mit Gelatinelösung besaß. Zunächst sei die Absorption der Antikörper in Gelatinelösung an Tab. 8 erläutert.

Die Absorption wurde mit mehreren Haptenpräparaten bei diesem Serum in der gleichen Weise durchgeführt. Wir hatten jedesmal fast das gleiche Ergebnis; immer wurde zunächst der agglutinierende Anteil und erst mit erheblich höheren Haptenmengen der blockierende Anteil der Antikörper abgesättigt (Tab. 9).

Außer dem Agglutinationshemmungstest wurde in vielen Fällen noch der Komplementfixationstest in der quantitativen Versuchsanordnung nach Kolmer²⁸ durchgeführt. Wir gaben in jedes Röhrchen 0,5 ccm des zu untersuchenden Rh-Serums, 0,5 ccm der Haptenverdünnung und zwei Einheiten Komplement vom Meerschweinchen in 1 ccm. Das Gemisch ließen wir über Nacht im Kühlschrank bei 4°C stehen. Dann kam es noch für 10 Min. in den Brutschrank (37°C), bevor das hämolytische Gemisch, bestehend aus 2 Einheiten Ambozeptorlösung (Volumen 0,5 ccm) und 0,5 ccm einer 2-proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen, zugefügt wurde. Nach 60 Min. Brutschrankaufenthalt wurde die Ablesung vorgenommen. Zur Bezeichnung der Hämolysegrade verwandten wir die gleiche Symbolik, wie sie bei der Wa.R. üblich ist.

In Tab. 10 sei ein Beispiel der Anwendung des Komplementfixationstestes angegeben. Es wurde ein Anti-Rh-Serum mit agglutinierenden Anti-D-Körpern vom Titer 1:256 und ein gereinigtes Haptenpräparat aus 0 Rh-positiven Erythrocyten benutzt.

Der Komplementbindungsversuch besitzt jedoch keine Vorzüge im Vergleich zum Absorptionsversuch (Agglutinationshemmungsversuch), der auch ebenso empfindlich ist. Zwei Tatsachen machen sich jedoch

Anti-Rh-Serum Kr.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
2 mg/1 ccm	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—
1 mg/1 ccm	—	—	—	—	±	+	+	±	±	—
0,5 mg/1 ccm	±	±	±	±	±	+	+	+	±	—
Kontrolle	+	+	±	±	+	++	++	+	+	±

Tab. 8.

Absorption der agglutinierenden Antikörper aus Serum Kr. (in physiologischer Kochsalzlösung).				
Anti-Rh-Serum Kr.	1/2	1/4	1/8	1/16
1 mg/1 ccm	—	—	—	—
500 γ/1 ccm	—	—	—	—
100 γ/1 ccm	±	±	—	—
Kontrolle	+	+	±	—

Tab. 9.

0,5 ccm Anti-Rh-Serum
+ 0,5 ccm Haptenlösung 1: 1000 +++
0,5 ccm Anti-Rh-Serum
+ 0,5 ccm Haptenlösung 1: 2000 ++
0,5 ccm Anti-Rh-Serum
+ 0,5 ccm Haptenlösung 1: 5000 ±
0,5 ccm Anti-Rh-Serum
+ 0,5 ccm Haptenlösung 1: 10 000 —
0,5 ccm Anti-Rh-Serum
+ 0,5 ccm phys. Kochsalzlösung —
0,5 ccm norm. AB-Serum
+ 0,5 ccm Haptenlösung 1: 1000 —

Tab. 10.

als außerordentlich störend bemerkbar: Konzentrierte Haptenlösungen (häufig schon 1:500) geben oft eine Eigenhemmung; weiterhin zeigen hochwertige Anti-Rh-Seren, besonders wenn sie länger aufbewahrt werden, auch ohne Haptenzusatz ein beträchtliches Komplementbindungsvermögen, welches man vor Beginn des Versuchs durch Absättigung mit Komplement ausschalten muß. Schwache Anti-Rh-Seren geben oft überhaupt keine Hämolysehemmung, auch nicht bei Zusatz der stärksten Haptenkonzentrationen.

Versuche mit Haptenpräparaten aus altem, hämolytischen Rh-Blut und aus rh-Blut

Als ein 0 Rh-Blut, das zur Haptendarstellung vorgesehen war, wegen Alkoholmangel einmal nicht sofort, sondern erst nach 10 Tagen, als es schon hämolytisch und teilweise bakteriell zersetzt war, verarbeitet werden konnte, erhielten wir dennoch nach dem oben beschriebenen Verfahren eine sehr gute Haptenausbeute mit ausgezeichneter antikörperbindender Wirkung. Dieser Umstand veranlaßte uns, eine Portion 0 Rh-Blut (100 ccm) 14 Tage steril im Kühlschrank aufzubewahren, so daß es vor der Extraktion teilweise hämolytisch war und mit Anti-Rh-

Seren nicht mehr positiv reagierte. Dieses Blut wurde in der gleichen Weise behandelt. Wir konnten nach zweimaliger Fällung mit Aceton 60 mg Hapten erhalten, das an Wirksamkeit den anderen gereinigten Präparaten nicht nachstand³⁵. In Tab. 11 sei nur die Auswertung mit Standardserum (Abguß 79,6) wiedergegeben.

	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
1 mg/1 ccm	—	—	—	—	—
500 γ/1 ccm	—	—	—	—	—
250 γ/1 ccm	—	—	—	—	—
100 γ/1 ccm	±	—	—	—	—
50 γ/1 ccm	+	±	±	—	—
Kontrolle	+	+	±	±	—

Tab. 11.

Weiterhin wurde aus A₁ rh-Blut nach der oben beschriebenen Methode ein Haptenpräparat gewonnen, das zwar auch nach fünfmaligem Umfällen eine schwächere Wirksamkeit zeigte, aber aus verschiedenen untersuchten Anti-Rh-Seren die Antikörper absättigen konnte. In Tab. 12 sei nur ein Beispiel wiedergegeben.

Anti-Rh-Serum 79,6	1/20	1/40	1/80	1/160
1 mg/ccm	—	—	—	—
500 γ/1 ccm	±	—	—	—
250 γ/1 ccm	+	±	±	—
Kontrolle	+	+	±	±

Tab. 12.

Versuche mit reinen, natürlichen Lipoiden

Wir untersuchten reine Präparate von Cholesterin, Kephalin und Lecithin auf ihre Rh-antikörperbindende Fähigkeit. Da Cholesterin und Kephalin in unseren orientierenden Vorversuchen keine serologische Wirkung zeigten, wurde nur das Lecithin genauer untersucht. Im folgenden wurde nur das Lecithin puriss. ex ovo (Merck) ausschließlich angewandt. (Das Lecithin ex cerebro hätte eine erheblich schwächere Wirkung.) Aus den Tab. 13—15 geht hervor, daß das

³⁵ Nach Abschluß der Arbeit erfahren wir, daß auch Carter dazu übergegangen ist, das Blut vor der Extraktion zur Haptengewinnung eine Woche im Kühlschrank aufzubewahren.

Lecithin auch die reinsten, aus Blut hergestellten Präparate an Rh-Haptenwirkung übertrifft.

Anti-Rh-Serum 59,6	1/20	1/40	1/80	1/160
100 γ /1 cm	—	—	—	—
50 γ /1 cm	—	—	—	—
25 γ /1 cm	—	—	—	—
10 γ /1 cm	—	—	—	—
5 γ /1 cm	±	±	—	—
Kontrolle	+	+	+	±

Tab. 13.

Auch die blockierenden Antikörper wurden vom Lecithin erheblich stärker gebunden als von den aus Blutkörperchen hergestellten Präparaten (als Beispiel vgl. Tab. 14).

Unsere Lecithinpräparate zeigten keinerlei Beeinflussung der Anti-A- und Anti-B- sowie der Anti-M- und Anti-N-Agglutinine; selbst Konzentrationen von 5 mg im cm waren unwirksam. Auf eine ausführliche Wiedergabe der Tabellen soll verzichtet werden.

Mit Lecithin konnten auch die Rh-Antikörper in vivo beim Meerschweinchen abgesättigt werden.

Beispiel: Ein Meerschweinchen (420 g) besaß nach der Immunisierung mit 0Rh-Blut in seinem Serum die in Tab. 14 aufgeführten Antikörpertiter.

Aus Tab. 15 geht hervor, daß eine einmalige Injektion von 40 mg Lecithin in diesem Falle sämtliche spezifischen Rh-Antikörper absättigen konnte.

Versuche mit Rh-Untergruppenserum

Zum Schluß seien noch die Reaktionen der verschiedenen Haptenpräparate mit Anti-C + D-Serum und mit Anti-c-Serum wiedergegeben (Tab. 16 u. 17).

Anti-Rh-Serum Kr.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
1 mg/1 cm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
500 γ /1 cm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250 γ /1 cm	—	—	—	—	±	±	±	—	—	—
100 γ /1 cm	—	—	—	±	±	+	+	±	—	—
50 γ /1 cm	±	—	—	±	+	++	+	+	±	—
Kontrolle	+	+	±	±	+	++	++	+	+	±

Tab. 14.

	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
A ₁ Rh	++	++	+	+	+	±	±	—
A ₁ rh	++	++	+	±	—	—	—	—
2 Stdn. nach der Injektion von 40 mg Lecithin i. m.								
A ₁ Rh	±	—	—	—	—	—	—	—
A ₁ rh	±	—	—	—	—	—	—	—
24 Stdn. nach der Behandlung								
A ₁ Rh	±	—	—	—	—	—	—	—
A ₁ rh	±	—	—	—	—	—	—	—
48 Stdn. nach der Behandlung								
A ₁ Rh	+	±	—	—	—	—	—	—
A ₁ rh	+	±	—	—	—	—	—	—
4 Tage nach der Behandlung								
A ₁ Rh	+	±	—	—	—	—	—	—
A ₁ rh	+	±	—	—	—	—	—	—

Tab. 15.

Anti-C + D-Serum	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
0,05 Serum + 0,05 Haptenlösung aus 0 Rh-Blut 1 mg/1 cm	—	—	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 Haptenlösung aus 0 Rh-Blut 500 γ /1 cm	±	—	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 Haptenlösung aus 0 Rh-Blut 100 γ /1 cm	+	+	±	±	—
0,05 Serum + 0,05 Haptenlösung aus A rh-Blut 1 mg/1 cm	—	—	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 Haptenlösung aus A rh-Blut 500 γ /1 cm	+	±	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 Lecithinlösung 100 γ /1 cm	—	—	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 Lecithinlösung 50 γ /1 cm	+	±	—	—	—
0,05 Serum + 0,05 physiolog. Kochsalzlösung	++	+	+	+	±

Tab. 16.

Anti-c-Serum	1/20	1/40	1/80	1/160
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Haptenlösung aus 0 Rh-Blut 1 mg/1 ccm	—	—	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Haptenlösung aus 0 Rh-Blut 500 γ /1 ccm	+	±	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Haptenlösung aus A rh-Blut 1 mg/1 ccm	—	—	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Haptenlösung aus A rh-Blut 500 γ /1 ccm	±	±	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Lecithinlösung 500 γ /1 ccm	—	—	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Lecithinlösung 100 γ /1 ccm	±	—	—	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm Lecithinlösung 50 γ /1 ccm	+	+	±	—
0,05 ccm Serum + 0,05 ccm physiolog Kochsalzlösung	+	+	±	—

Tab. 17.

Auswertung des Abgusses					
Abgußverdünnung	1	1/2	1/4	1/8	1/16
I	+	±	—	—	—
II	—	—	—	—	—

Tab. 18.

Auswertung der Abspengungsflüssigkeit					
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
I	+	±	—	—	—
II	+	+	±	±	—

Tab. 19.

Mit Anti-E-Serum wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei der Verwendung von Anti-C- und Anti-D-Serum.

Antikörperabspengungsversuch

Wir benutzten ein agglutinierendes Anti-Rh-Serum vom Titer 1:256 und folgende Haptenkonzentrationen:

- I 10 mg Lecithin/0,5 ccm Alkohol
+ 2,0 ccm physiolog. Kochsalzlösung
- II 10 mg Lecithin/0,5 ccm Alkohol
+ 0,5 ccm physiolog. Kochsalzlösung

Zu je 0,1 ccm beider Haptenlösungen wurden 0,5 ccm Anti-Rh-Serum gegeben und das Gemisch eine halbe Stunde lang bei 37°C aufbewahrt. Dann wurde zentrifugiert. Die Auswertung des Abgusses bringt Tab. 18.

Der Rückstand wurde zweimal mit eisgekühlter phys. NaCl-Lösung gewaschen. Im Waschwasser waren keine Antikörper mehr nachweisbar. Dann erfolgte die Abspengung bei 56°C. Wegen der Auswertung der Abspengungsflüssigkeit vgl. Tab. 19.

Bei der Verwendung von Haptenlösungen aus 0 Rh-Erythrocyten war bei der gleichen Versuchsanordnung eine schwächere Antikörperabspengung nachweisbar.

Untersuchungen über die intrazellulären Bakterien von *Pelomyxa palustris* Greeff

Von HERBERT KELLER

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Erlangen
(Z. Naturforschg. 4b 292—297 [1949]; eingegangen am 20. Juni 1949)

Es wird eine Methode zur Zucht und Kultur der intrazellulären Bakterien von *Pelomyxa palustris* Greeff angegeben und deren Fähigkeit, Cellulase zu produzieren, nachgewiesen. Die Organismen werden bestimmt und *Myxococcus pelomyxae* und *Bacterium parapelomyxae* genannt. Die Identität dieser Keime mit den Symbionten im lebenden Tier wird serologisch nachgewiesen.

Seit P. Buchner¹ und seine Schüler die morphologischen Grundlagen der Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien ausgebaut haben, zeigte sich eine Fülle neuer Probleme, deren Lösung nicht nur für den einzelnen Fall

¹ P. Buchner, Tier und Pflanze in Symbiose, Berlin 1930.

bedeutungsvoll ist, sondern darüber hinaus an Grundprobleme des Lebens rührt und deren Konsequenzen weit über das Gebiet der Zoologie und Biologie hinausreichen.

Die intrazelluläre Symbiose, als Spezialfall einer aufs engste verknüpften Lebensgemeinschaft, ist verständlicherweise einer kausalen Erklärung