

die Bildung infektiöser Teilchen ebenfalls unterbleibt⁴¹.

Unter den geschilderten Umständen scheint die Bezeichnung „Inkomplette Form“ oder „Inkomplet-

⁴¹ R. M. FRANKLIN u. P. M. BREITENFELD, *Virology* **8**, 293 [1959].

tes Virus“ für die in Frage stehende Art von Teilchen richtig gewählt zu sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Mitteln, Fräulein L. PISTER, Fräulein D. KUNERT, Herrn G. BERGER und Herrn P. GIEBLER für ihre Mitarbeit.

Das cytolysierende Prinzip von Serumkomplement

Von H. FISCHER und I. HAUPT

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M. (Dir.: Prof. Dr. F. HOFF)

(Z. Naturforschg. **16 b**, 321–328 [1961]; eingegangen am 18. Februar 1961)

Serumkomplement (C'), welches nach dem heutigen Stand der Forschung aus mindestens vier Komponenten besteht, ist an zahlreichen immunologischen und nicht-immunologischen Vorgängen beteiligt. Am besten erforscht ist die Sequenz der C'-Reaktionsstufen bei der Hämolyse sensibilisierter Hammelerythrocyten, jedoch ist noch ungeklärt, welcher Mechanismus letztlich die Zellveränderung, die zum Austritt von Hämoglobin führt, bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit wird über das Endprodukt der C'-Reaktion — eine cytolytisch wirkende Substanz — berichtet. Es wird gezeigt, daß sowohl beim Altern von Komplement, wie auch bei C' fixierenden Antigen/Antikörperreaktionen im Serum eine Substanz entsteht, die zellschädigend und auflösend wirkt.

Seren, in denen durch mehr oder weniger spezifische Vorbehandlung C' oder einzelne seiner Komponenten ausgeschaltet wurden, sind nicht mehr zur Cytolysinbildung befähigt.

Das cytolytische Prinzip konnte gereinigt und papierchromatographisch als Lysolecithin charakterisiert werden.

Die Serumfaktoren, welche seit den klassischen Untersuchungen BORDETS¹ und EHRLICHS^{2,3} als Komplement bezeichnet werden, erfüllen im höheren Organismus Aufgaben, die sowohl bei Abwehr-, wie auch bei Regulationsvorgängen von Bedeutung sind. Serumkomplement (C') besteht aus mindestens 4 verschiedenen Komponenten, die man heute allgemein mit C'_{1,2,3} und C'₄ bezeichnet.

Am bekanntesten und bisher am besten untersucht ist die Fähigkeit von C', an Antigen-Antikörperreaktionen teilzunehmen und durch diese Teilnahme die schwere Schädigung sensibilisierter Zellen und Bakterien herbeizuführen, die als „Cytolyse“ oder „Bakteriolyse“ bezeichnet wird.

Die Bedeutung dieses Vorganges für immunologische Reaktionen ist seit langem erkannt; trotz

intensiver Forschung ist jedoch der biochemische Mechanismus der C'-induzierten Cytolyse bis heute unklar. Die Schwierigkeit ihn aufzudecken liegt darin, daß C' nicht eine einheitliche Substanz, etwa ein Proenzym, ist, sondern aus mehreren z. T. labilen und nur ungenau definierten Serumkomponenten besteht, deren Zusammenwirken erst in den letzten 15 Jahren mit kinetischen Methoden analysierbar geworden ist.

So haben die Arbeiten PILLEMERS⁴⁻⁶, LEPOWS⁷ und ihrer Schüler^{6,8} sowie die Studien von MAYER^{9,10}, LEVINE¹¹⁻¹⁴, RAPP^{13,15}, LEON⁵ u. a. gezeigt, daß die C'-Reaktion in mehrere Stufen zerlegbar ist:

Mit Antikörpern sensibilisierte Erythrocyten (EA-Zellen) fixieren bei 0 °C in Anwesenheit von Ca²⁺ die Komponenten C'₁ und C'₄ (Stufe I).

Bei Zusatz von Mg²⁺ wird anschließend auch die

¹ J. BORDET u. O. GENGOU, *Ann. Inst. Pasteur* **15**, 289 [1901].

² P. EHRLICH u. J. MORGENROTH, *Berliner klin. Wschr.* **36**, 1, 6, 481 [1889].

³ P. EHRLICH u. J. MORGENROTH, *Berliner klin. Wschr.* **36**, 69 [1899].

⁴ L. PILLEMER, *Chem. Reviews* **33**, 1 [1943].

⁵ M. LEON, *J. Immunology* **79**, 480 [1957].

⁶ I. H. LEPOW, O. D. RATNOFF, F. S. ROSEN u. L. PILLEMER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **92**, 111 [1956].

⁷ I. LEPOW, *Mechanisms of Hypersensitivity*, Intern. Symposium, Henry Ford Hospital 267 [1959].

⁸ U. BEISS u. O. ARMBRUSTER, *Z. Naturforschg.* **13 b**, 79 [1958].

⁹ M. HEIDELBERGER u. M. M. MAYER, *Advances in Enzymol.* **8**, 71 [1948].

¹⁰ M. M. MAYER, *Progr. in Allergy* **V**, 215 [1958].

¹¹ L. LEVINE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **18**, 283 [1955].

¹² L. LEVINE u. M. M. MAYER, *J. Immunology* **73**, 426 [1954].

¹³ L. LEVINE, M. M. MAYER u. H. J. RAPP, *J. Immunology* **73**, 435 [1954].

¹⁴ L. LEVINE, K. M. COWAN, A. G. OSLER u. M. M. MAYER, *J. Immunology* **71**, 359, 367 [1953].

¹⁵ H. J. RAPP, *Nature* [London] **127**, 235 [1958].

zweite Komponente C'_2 fixiert, wodurch C'_1 Esteraseaktivität erhält (Stufe II).

Bei erhöhter Temperatur wird C'_3 fixiert — oder enzymatisch angegriffen — und damit die Veränderung der Zelloberfläche bewirkt, die den Austritt von Hämoglobin bzw. von Zellinhaltsstoffen zur Folge hat (Stufe III).

PENSKY¹⁶ und ROTHER¹⁷ haben neuerdings gefunden, daß die Fixation von C'_3 ein Vorgang ist, der weiterer Co-Faktoren bedarf. Es ist durchaus möglich, daß einer dieser noch unbekannt Faktoren ebenfalls ein Proenzym oder Enzym ist.

Die bisherigen Analysen des komplexen Vorgangs haben entscheidende Argumente für die Enzymtheorie der Komplementwirkung beigebracht, sie erlauben aber nicht zwischen den folgenden Alternativen zu unterscheiden:

Entweder greift das aktivierte C' -Enzym direkt Zellwandstrukturen an und bewirkt auf diese Weise den Zusammenbruch der Permeabilitäts-Barrieren, oder das aktivierte Enzym benutzt eine der nachbarlich fixierten C' -Komponenten als Substrat und setzt dabei — in unmittelbarem Kontakt mit der Zelle — eine oberflächenaktive, zellschädigende Substanz frei.

Die letztgenannte Möglichkeit ist als Lysolecithin-Hypothese der Komplementwirkung diskutiert worden¹⁸, ohne bisher durch Experimente unterbaut zu sein. Im folgenden werden wir über solche Experimente berichten.

Überlegungen zur Versuchsanordnung

Geht man von der Arbeitshypothese aus, daß bei der Einwirkung von C' -Komponenten aufeinander eine zellschädigende Substanz entsteht, so ist zunächst zu klären, welche experimentelle Anordnung geeignet sein könnte, die fragliche Substanz nachzuweisen. Der übliche Weg, sensibilisierte Erythrocyten durch den Zusatz von komplementhaltigem Serum aufzulösen, scheidet aus. Das hypothetische, unmittelbar an der Zelloberfläche entstehende Cytolysin wird mit großer Wahrscheinlichkeit in Strukturen der Zelle „hineingelöst“ und damit dem chemischen Nachweis entzogen. Nur ein zellfreier Reaktionsansatz bietet die Möglichkeit, das hypothetische Cytolysin zu erfassen.

Wir gingen von der bekannten Tatsache aus, daß Serum bei längerem Stehen bei 37 °C seine C' -Aktivität einbüßt. Die innerhalb von Std. erfolgende C' -Inaktivierung könnte ein ähnlicher Vorgang sein wie die innerhalb von Min. bei der Antigen-Antikörperreaktion vor sich gehende C' -Inaktivierung. Träfe dies zu, so müßte in einem Fall sehr langsam, im anderen sehr rasch, aber in beiden Fällen etwa parallel mit dem C' -Abfall das gesuchte Cytolysin entstehen und sich vielleicht auch nachweisen lassen. Schließlich dürfte in einem von C' befreiten Serum kein Cytolysin mehr entstehen.

Diese spekulative Überlegung erfährt ihre Rechtfertigung durch Beobachtungen von BERGENHEM und FAHRAEUS^{19, 20}, die gefunden haben, daß tatsächlich bei längerem Stehen von Serum ein die Blutkörperchensenkungs-Geschwindigkeit verzögernder, „stabilisierender“ Faktor entsteht, welcher die Erythrocyten in ihrer Form verändert und bei längerer Einwirkung auch auflöst. Den Autoren gelang es auch, den Faktor im entweißten Serumfiltrat anzureichern und als Lysolecithin zu charakterisieren.

Methoden

1. Bestimmung der C' -Aktivität

Die Bestimmung von Gesamtkomplement mit Hilfe sensibilisierter Hammelerythrocyten erfolgte nach bekannten Prinzipien^{21, 22}; die der einzelnen C' -Komponenten mit Hilfe lyophilisierter Testseren (Behringwerke Marburg), über die früher berichtet wurde²². Als C' -Einheit wurde die Menge Serum bezeichnet, die 50% einer definierten Erythrocytenmenge aufzulösen vermag.

2. Ausschaltung der C' -Wirkung im Serum

Um die Gesamt- C' -Wirkung oder einzelne Komponenten mehr oder weniger spezifisch auszuschalten, wurde frisches Human-, Schweine- oder Meerschweinchenserum vorbehandelt. Seren, aus denen bestimmte Komponenten entfernt sind, werden allgemein als R-Seren (r = removed) bezeichnet.

a) *Herstellung von $R_{1,2}$ -Serum*: Erhitzen 30 Min. auf 56 °C.

b) *Herstellung von R_4 -Serum*: Pro ml Serum wurden 0,25 ml 0,15-n. Ammoniak zugesetzt und 90 Min. bei 37 °C inkubiert; anschließend mit 0,15-n. HCl neutralisiert.

¹⁶ J. PENSKY, L. WURZ, L. PILLEMER u. I. H. LEPOW, Z. Immunforsch. **118**, 329 [1959].

¹⁷ K. ROTHER, U. ROTHER u. O. GÖTZE, Z. Immunforsch. **118**, 404 [1959].

¹⁸ H. ISLIKER, Schweiz. med. Wschr. **88**, 127 [1958].

¹⁹ B. BERGENHEM, Acta pathol. microbiol. scand. Suppl. **39**, 1 [1938].

²⁰ B. BERGENHEM u. R. FAHRAEUS, Z. ges. exp. Med. **97**, 555 [1936].

²¹ E. A. KABAT u. M. M. MAYER, Experimental Immunochimistry. Illinois: Thomas, Springfield 1948.

²² W. FRITZSCHE, H. FISCHER, G. SCHWICK u. H. E. SCHULTZE, Klin. Wschr. **36**, 100 [1958].

c) *Herstellung von R₃-Serum*: Pro ml Serum wurden 2 mg unlösliches Zymosan (Behring) zugegeben und 60 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zymosan durch hochtouriges Zentrifugieren mit der präp. Spincozentrifuge abgetrennt.

d) *Ausschaltung der C'-Wirkung durch EDTA*: Frischem Serum wurde EDTA (Titriplex III, Merck) zur Endkonzentration 7,5 mMol zugesetzt.

e) *Ausschaltung der C'-Wirkung durch Heparin*: 1 ml Serum erhielt 100 E Heparin (Liquemin Roche) zugesetzt. Diese Konzentration reicht aus²³, um die C'-Wirkung weitgehend auszuschalten.

f) *Herstellung von R_{1,2,4}-Serum*: Serum wurde bei 0 °C im Verhältnis 1 : 1 mit einer 1,25-proz. Suspension amboceptor-sensibilisierter frischer Hammelerythrocyten versetzt und nach 60 Min. in der Kälte abzentrifugiert. Das überstehende Serum, das trotz vorsichtigen Arbeitens leicht hämolytisch ist, wurde als ein R_{1,2,4}-Serum bezeichnet, obwohl die Elimination dieser Komponenten bei der einmaligen Adsorption mit Erythrocyten unvollständig war. Mehrfach bei 0 °C mit EA-Zellen behandelte Seren wiesen meist einen zu hohen Hämolysegrad auf, um für unsere Zwecke brauchbar zu sein. Die geringe Hämolyse stört die nachfolgenden C'-Bestimmungen nicht, da die Eigenfarbe des Serums dabei berücksichtigt wird*.

3. Standard-Versuchsordnung zum vergleichenden Nachweis der hämolytischen Aktivität von Serumfiltraten

Frisches Mischserum von gesunden Spendern, von Schweinen oder von Meerschweinchen wurde in zwei Portionen geteilt, von denen die eine bei 4 °C, die andere bei 37 °C über 24 Stdn. inkubiert wurde. Danach wurden beide Ansätze mit dem 7-fachen Volumen Methanol enteiweißt und das klare Filtrat auf dem Wasserbad auf das ursprüngliche Ausgangsvolumen eingengt. Die Filtrate sind dann nicht mehr klar, sondern milchig trüb. Es erwies sich nicht als notwendig, das Einengen in N₂-Atmosphäre vorzunehmen, doch wurde peinlich darauf geachtet, daß die Filtrate auf dem Wasserbad nicht austrockneten. Mit wenigen Tropfen 0,1-n. HCl wurde dann pH 7 eingestellt (Glaselektrode) und mit physiologischer NaCl-Lösung geometrische Verdünnungsreihen angesetzt. Jede Verdünnungsstufe — bei uns immer 1,0 ml — erhielt schließlich 0,1 ml einer 5-proz. frischen Suspension gewaschener Humanerythrocyten zugesetzt und wurde 6 Stdn. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Etwa stündlich wurden die Suspensionen von Hand aufgeschüttelt. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde der Hämolysegrad in den verschiedenen Röhrchen abgelesen. Dabei wurden von der beginnenden Hämolyse (+) bis zur kompletten Hämolyse +++ vier Grade unterschieden.

* Herrn Prof. Dr. SPIELMANN sind wir für Hilfe bei den Adsorptionsversuchen zu Dank verpflichtet.

²⁴ H. SCHUBOTHE u. F. PO-TUN-FOK, Brit. J. haemat., im Druck.

4. Modifizierte Anordnung zum Nachweis der hämolytischen Aktivität von Serumfiltraten

Da die beschriebene Standard-Versuchsordnung gestattet, nur relativ grobe Unterschiede der lytischen Aktivität von Serumfiltraten zu erkennen und nur dann zuverlässige Werte ergibt, wenn peinlich saubere, ohne Netzmittel gereinigte, Röhrchen verwendet werden, sahen wir uns gezwungen, nach einer gut reproduzierbaren objektiven Nachweismethode zu suchen.

Diese fand sich in der von SCHUBOTHE und PO-TUN FOK kürzlich beschriebenen Anordnung zur Prüfung der mechanischen Resistenz von Erythrocyten²⁴.

Erythrocyten-Sediment aus frischem Heparinblut wurde mit dem auf lytische Aktivität zu prüfenden Serumfiltrat versetzt und eine Stde. bei 37 °C inkubiert. Ansätze mit physiologischer NaCl-Lösung wurden in gleicher Weise behandelt und dienten als Kontrolle. Danach wurden die verschiedenen Proben gemeinsam mit geschliffenen Quarzkugeln 1—2 Stdn. rotiert*.

Die bei dieser mechanischen Belastung auftretende Hämolyse gibt — in Prozenten des gesamten Erythrocytenhämoglobins ausgedrückt — ein Maß für die mechanische Resistenz der Zellen.

In cytolytischen Ansätzen ist der Hämolysegrad stets größer als in den entsprechenden Kontrollansätzen. Die Steigerung wurde von uns als Maß der lytischen Aktivität bewertet und in %-Werten im Vergleich zum Kontrollansatz ausgedrückt. Bezüglich methodischer Einzelheiten sei auf die Originalarbeit²⁴ verwiesen.

5. Komplementbindung durch Antigene und Antikörper

Bei der Auswahl verschiedener C'-fixierender Antigen-Antikörpersysteme hat uns Prof. H. E. SCHULTZE von den Behringwerken in Marburg freundschaftlich beraten und die erforderlichen Mengen großzügig zur Verfügung gestellt. Wir möchten ihm und Herrn SCHWICK dafür herzlich danken. Die Relation Antigen zu Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen wurden so gewählt, daß gute Komplementfixierung aber kaum oder keine Präzipitation erfolgte.

a) Rinderalbumin-Antirinder Serum vom Kaninchen

	C'-fix. Ansatz	Kontroll-Ansatz
Meerschweinchenserum	1,0	1,0
5 mg-proz. Rinderalbumin	0,5	0,5
1 : 10 verd. Antirinder Serum	0,5	—
Physiol. NaCl-Lösung	—	0,5

b) Transferrin-Antitransferrin vom Kaninchen

Meerschweinchenserum	0,5	0,5
Transferrin (1 : 50)	0,5	0,5
1 : 5 verd. Antiserum	0,5	—
Physiol. NaCl-Lösung	—	0,5

* Das Gerät wird von der Firma A. Balzer, Basel, hergestellt. Die geschliffenen Quarzperlen sind durch die Edelstein-schleiferei Wintermantel Waldkirch/Breisgau zu beziehen.

Das gleiche System mit 1 : 600 verdünnter Transferrinlösung führt zur Präzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes und wurde ebenfalls untersucht.

c) *Humangammaglobulin-Antigammaglobulin vom Kaninchen*

Meerschweinchenserum	1,0	1,0
1 : 1000 verd. γ -Globulin	0,5	0,5
1 : 5 verd. Antiserum	0,5	—
Physiol. NaCl-Lösung	—	0,5

d) *Diphtherietoxoid-Antidiphtherieserum vom Rind*

Meerschweinchenserum	0,5	0,5
1 : 16 verd. Diphtherietoxoid	0,5	0,5
1 : 10 verd. Antiserum	0,5	—
Physiol. NaCl-Lösung	—	0,5

e) *Diphtherietoxoid-Antidiphtherieserum vom Pferd*

Meerschweinchenserum	0,5	0,5
1 : 4 verd. Diphtherietoxoid	0,5	0,5
1 : 20 verd. Antiserum	0,5	—
Physiol. NaCl-Lösung	—	0,5

6. Anreicherung der Phospholipide
(wird im Ergebnisteil besprochen).

7. Papierchromatographische
Trennung und Identifizierung
der Phospholipide aus Serum

Die Trennung erfolgte durch aufsteigende Papierchromatographie bei 4 °C nach HACK und FERRANS²⁵. Die schärfsten Trennungen wurden erhalten, wenn das Papier (Schleicher & Schüll 2043 a MGL) nach MARINETTI und STOTZ²⁶ mit Kieselsäure imprägniert wurde. In den Fällen, in denen Abschnitte von Chromatogrammen zum Nachweis lytischer Aktivität ausgeschnitten und eluiert wurden, haben wir auf die Imprägnierung verzichtet und die Papiere lediglich mehrere Male mit dem Lösungsmittel vorgewaschen.

Lösungsmittelsystem: Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser: 40 : 23 : 3.

Farbnachweise: Organisches Phosphat wurde nach HANES und ISHERWOOD²⁵ nachgewiesen; aminostickstoffhaltige und cholinhaltige Phospholipide mit 0,5-proz. Ninhydrinlösung bzw. mit Dipikrylamin⁸.

Die Prüfung auf ungesättigte Lipide erfolgte durch Anfärbung mit 1-proz. KMnO₄-Lösung²⁷.

Die Lysoverbindungen wurden mit Malachitgrün²⁸ oder mit einer 0,005-proz. wäßrigen Lösung von Rhodamin B⁸ nachgewiesen.

Nachweis der cytolytischen Aktivität: Einzelne Abschnitte des Chromatogramms wurden zwei Stdn. mit absol. Alkohol bei 37 °C extrahiert, der Alkohol bei 45 °C abgedampft und die Rückstände in physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Zu jeder Probe wur-

den definierte Mengen einer Standarderythrocyten-Suspension gegeben und die Lyse registriert.

Ergebnisse

Grundversuch zum Nachweis der
lytischen Aktivität in frischem
und gealtertem Serum

In Tab. 1 ist das Ergebnis eines typischen Grundversuchs wiedergegeben, der darin besteht, gleiche Mengen frischen Serums einmal bei 4 °C zum anderen bei 37 °C unter sterilen Bedingungen 24 Stdn. zu halten und anschließend in beiden Ansätzen sowohl die C'-Aktivität als auch den Cytolysingehalt zu bestimmen. Letzterer wurde — wie im Methodenteil beschrieben — nicht im Serum sondern im eiweißfreien Filtrat von Serum bestimmt.

	Gesamt-C'	C' ₁	C' ₂	C' ₃	C' ₄	Lytische Aktivität
4 °C	105	2000	150	200	1250	1 : 4
37 °C	24	400	75	20	80	1 : 16

Tab. 1. Verhalten von Komplement und lytischer Aktivität beim Altern von Humanserum.

Sinngemäß gleiche Resultate wurden erhalten, wenn an Stelle von menschlichem Serum Schweine- oder Meerschweinchenserum verwendet wurde. Dieser Grundversuch zeigt, daß in frischem C'-haltigen Serum, welches bei 37 °C altert, tatsächlich ein cytolysierendes Prinzip vermehrt gebildet wird.

Cytolysinbildung in R-Seren

In einer weiteren Versuchsreihe wurde anschließend festgestellt, ob die Cytolysinbildung im bei 37 °C inkubierten Serum ausbleibt, wenn zuvor in diesem Serum die C'-Aktivität durch verschiedene Maßnahmen ausgeschaltet wurde.

Abb. 1 faßt eine größere Zahl derartiger mit Schweineserum ausgeführter Versuche zusammen und gibt zugleich einen Überblick, auf welche Weise die C'-Ausschaltung vorgenommen wurde. Die Säulendiagramme stellen paarweise angeordnet die cytolytische Aktivität der jeweiligen 4 °C- und 37 °C-Ansätze dar. Das erste Säulenpaar zeigt das in dem Grundversuch (Tab. 1) bereits beschriebene

²⁵ M. H. HACK u. V. J. FERRANS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **315**, 157 [1959].

²⁶ G. V. MARINETTI u. E. STOTZ, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **21**, 168 [1956].

²⁷ G. V. ROUSER, G. V. MARINETTI, R. F. WITTER, J. F. BERRY u. E. STOTZ, J. biol. Chemistry **223**, 485 [1956].

²⁸ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. G. RICHER, Biochem. Z. **331**, 155 [1959].

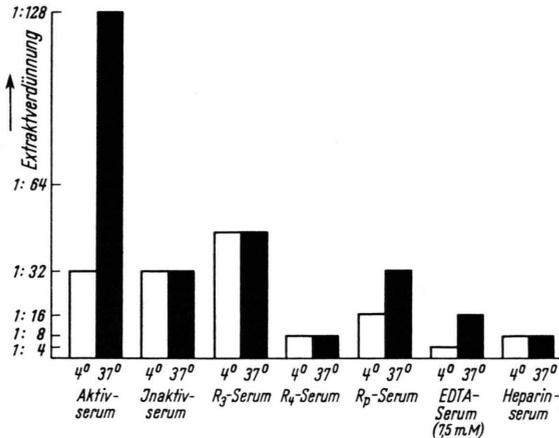


Abb. 1. Cytolytische Aktivität von Extrakten aus verschiedenartig vorbehandelten Seren. Erklärung im Text.

Verhalten von aktivem Serum bei 4° bzw. 37 °C. Das eiweißfreie Filtrat aus 37 °C-Serum war in diesem Fall noch in Verdünnung 1 : 28 imstande Erythrocyten aufzulösen, während das Filtrat aus dem gleichen bei 4 °C gehaltenem Serum nur bis zur Verdünnung 1 : 32 wirksam war. Dieser im aktiven Serum bzw. Filtrat vorhandene Unterschied verringert sich oder verschwindet vollkommen, wenn sog. R-Seren bei 4° bzw. 37° inkubiert werden, oder wenn durch den Zusatz von EDTA oder Heparin die C'-Aktivität zuvor ausgeschaltet wurde.

Am besten reproduzierbar und am deutlichsten ist die Verminderung des Cytolysinanstiegs in sog. R₄- und EDTA-Seren. Weniger signifikant und nicht in allen Versuchen reproduzierbar ist sie in mit Zymosan behandeltem R₃-Serum. Hier, ebenso wie in Seren, die durch Erhitzen auf 56 °C inaktiviert worden waren (R_{1,2}-Seren), fanden wir, daß der Unterschied der lytischen Aktivität nach 4° und 37 °C Inkubation zwar aufgehoben ist, daß jedoch die Grundaktivität meist höher liegt als bei aktivem 4 °C-Serum. Dies ist so erklärbar, daß bei der Behandlung von Serum mit Zymosan — auch wenn sie bei einer Temperatur von 15 °C erfolgt — stets etwas Komplement aktiviert wird und vermehrt Lysolecithin entsteht. Für die 56 °C-Behandlung von Serum gilt dasselbe insofern, als auch hier eine kurzdauernde Aktivierungsperiode durchlaufen wird, die u. U. schon zur Vermehrung von cytolytischer Aktivität führt.

Durch Hitzeinaktivierung, Behandeln mit Zymosan, Ammoniak, den Zusatz von EDTA oder von Heparin kann man zwar die C'-Aktivität in z. T. recht spezifischer Weise inhibieren, jedoch ist nicht auszuschließen, daß durch die gleiche Maßnahme auch Serumenzyme, die nichts mit dem C'-System zu tun haben, ebenfalls geschädigt oder eliminiert werden. Das Ausbleiben der Cytolysinbildung bei

den in Abb. 1 gezeigten Versuchen braucht somit nicht notwendigerweise auf der Ausschaltung von C' zu beruhen.

Die weitaus schonendere und spezifischere Eliminierung von C'-Komponenten gelingt durch Adsorption an antikörperbeladene Zellen in der Kälte. Wie im methodischen Teil beschrieben, gelang es mit sensibilisierten Hammelerythrocyten bei 0 °C den größeren Teil der C'-Komponenten 1, 2 und 4 aus frischem Humansen zu entfernen. Derartig vorbereitetes R_{1,4,2}-Serum ist, wie Abb. 2 zeigt, nur noch in beschränkter Weise zur Cytolysinbildung befähigt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß jede Art C'-Ausschaltung die Cytolysinbildung hindert.

Cytolysinbildung bei Antigen-Antikörperreaktionen

Nach der Arbeitshypothese sollten Antigen-Antikörper-Komplexe in C'-haltigem Serum zum raschen Zusammentritt der C'-Faktoren und damit zur beschleunigten Entstehung von cytolysierendem Wirkstoff führen. Dies trifft bei den untersuchten Beispielen zu.

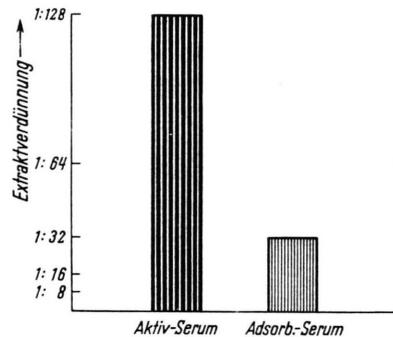


Abb. 2. Cytolytische Aktivität von Extrakten aus normalen und adsorbierten Seren. Erklärung im Text.

Tab. 2 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuches mit dem System Rinderalbumin/Antrinder-serum.

Ein ähnliches Resultat wurde mit dem System: γ -Globulin/Antigammaglobulin erhalten. Auch hier fielen die einzelnen C'-Komponenten stark ab und der Cytolysintiter stieg auf das Doppelte an.

Das System Transferrin/Antitransferrin haben wir einmal „nicht-präzipitierend“ untersucht (Transferrin 1 : 50 verdünnt), zum andern in einem Antigen/Antikörperverhältnis, bei dem optimale Präzipitation erfolgte (Transferrin 1 : 600 verdünnt).

Mit beiden Modifikationen erhielten wir einen Abfall von C' und einen Anstieg des Cytolysintiters

	Komplementaktivität					Cytolytische Aktivität	
	Gesamt-C'	C' ₁	C' ₂	C' ₃	C' ₄	Standard-anordnung	Modifizierte Anordnung
Kontrollansatz	370	1400	380	600	1000	1 : 8	0
Ansatz mit Antigen + Antikörper	70	300	200	250	140	1 : 16	68%

Tab. 2. Verhalten von Komplement und lytischer Aktivität im Meerschweinchenserum nach Zugabe von Rinderalbumin und Rinderantiserum.

im Serumfiltrat. Ein aufschlußreiches Ergebnis lieferten Versuche mit Antisera verschiedener Tierespezies gegen Diphtherietoxoid. Herrn Prof. SCHULTZE danken wir für den Hinweis, daß Pferdeantitoxine häufig massiv präzipitieren, ohne in nennenswerter Weise Komplement zu fixieren, während Rinderantitoxin kaum präzipitiert, aber dennoch C' fixiert. Dieses unterschiedliche Verhalten sollte besonders geeignet sein, die Arbeitshypothese zu prüfen. Wie Tab. 3 zeigt, stellte sich tatsächlich heraus, daß das C'-fixierende System: Di-Toxoid/Rinderantiserum zum Anstieg des Cytolysintiters führt, während beim nicht-fixierenden System der Anstieg ausbleibt.

	Kontrolle	Rinderantiserum	Pferdeantiserum
Gesamt-C'	150	135	150
C' ₁	850	300	600
C' ₂	450	270	420
C' ₃	600	360	450
C' ₄	810	270	300
Lysolecithin-Aktivität	0	30	0

Tab. 3. Vergleich der C'-Fixierung und Lysolecithinbildung durch Diphtherietoxoid und verschiedene Antisera.

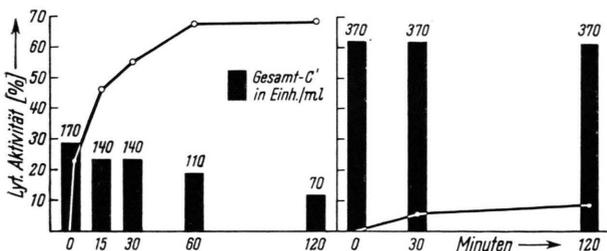


Abb. 3. C'-Titer (Säulen) und Cytolysinaktivität (ausgezogene Linien) während einer Antigen/Antikörperreaktion. Rechte Bildseite: Kontrollversuch ohne Antikörper. Erklärung im Text.

Über den zeitlichen Zusammenhang zwischen C'-Fixierung und Cytolysinentstehung orientiert schließlich Abb. 3. Aus ihr geht hervor, daß bereits

in der ersten Min. nach Zugabe von Antigen und Antikörper der Gesamt-C'-Titer auf etwa die Hälfte abfällt und gleichzeitig Cytolysin vermehrt wird. In den Kontrollansätzen bleibt über die gesamte Versuchsdauer der C'-Titer und die Cytolysin-Aktivität praktisch unverändert.

Die Ergebnisse der Versuche mit Immunsystemen beweisen den direkten Zusammenhang zwischen C'-Fixierung und Cytolysinentstehung.

Charakterisierung des Cytolysins

Um das cytolysierende Prinzip anzureichern und zu charakterisieren, gingen wir zunächst von unbehandelten Serumfiltraten aus. Es gelang jedoch nicht, eine befriedigende Auftrennung durch Elektrophorese oder Chromatographie zu erreichen.

Dagegen ließ sich das cytolysierende Prinzip aus dem getrockneten Filtratrückstand mit absolutem Alkohol oder Chloroform extrahieren. Die weitere Fraktionierung gelang nach der von VAN BEERS und Mitarbb.²⁹ kürzlich beschriebenen Methode, welche darauf beruht, die in Petroläther aufgenommenen Lipidextrakte in einem Gummifingerling gegen Petroläther (Sdp. 40–60°) zu dialysieren. Über 80% der lytischen Aktivität erwies sich als nicht dialysierbar. Da die Fettsäuren, Cholesterin und Neutralfette nach außen wandern, während allein die im apolaren Lösungsmittel mizellenbildenden Phospholipide im Innendialysat verbleiben, war damit der Phospholipidcharakter des Komplement-Cytolysins erwiesen.

Durch Papierchromatographie wurden die Phospholipide weiter getrennt. Das Schema eines typischen Chromatogramms ist in Abb. 4 wiedergegeben.

Die Chromatogramme aus menschlichem, Ratten- und Meerschweinchenserum zeigten stets vier phosphorhaltige Banden, von denen die zweitunterste bei Anfärbung mit Malachitgrün sich weiß verfärbte (Lysoverbindung). Diese Zone, ebenso wie die zwei

²⁹ G. J. VAN BEERS, H. DE JONGH u. J. BOLDINGH, *Essential Fatty Acids* 43, Sinclair 1958.

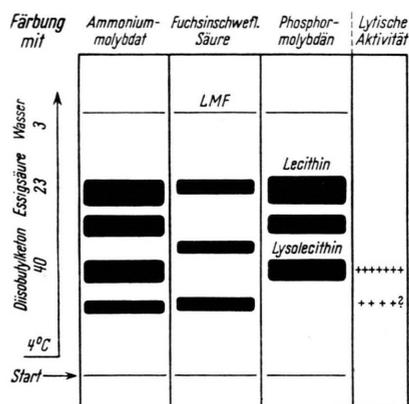


Abb. 4. Schema der papierchromatographischen Trennung und Charakterisierung von Phospholipiden aus Serum.

darüberliegenden, ergab auch eine positive Reaktion mit Phosphormolybdänsäure, enthält also Cholin.

Durch Vergleichschromatographie mit Testsubstanzen und aus den Angaben der Literatur^{25, 30, 31} wurde die oberste Bande als Lecithin, die mittlere als Sphingomyelin und die unterste, die sich färbereichs bereits als Lysoverbindung charakterisierte, als Lysolecithin identifiziert*.

Cytolytische Aktivität konnte lediglich dieser untersten Bande zugeordnet werden. Daraus ergab sich, daß das Komplement-Cytolysin mit großer Wahrscheinlichkeit mit Lysolecithin identisch ist.

Diskussion

Die Lysolecithin-Hypothese der C'-Wirkung ist nicht neu. Sie wurde erstmals von FRIEDENTHAL³² als Diskussionsbemerkung geäußert und seither wiederholt im Schrifttum erwähnt. Ernsthaft wird sie neuerdings von ISLIKER¹⁸ diskutiert.

Die einzigen Experimente, die geeignet sind, die Hypothese zu unterbauen, sind unserer Meinung nach die von BERGENHEM und FAHRÆUS^{19, 20}, welche die vermehrte Lysolecithin-Entstehung im alternden Serum beobachteten. Die Autoren vermuteten schon damals eine „sehr intime Beziehung“ zwischen der spontanen Lysolecithin-Bildung im Serum und dessen Komplementfunktion, glaubten aber, daß es sich dabei um zwei verschiedene Vorgänge handele, die sich unter Umständen in ihrer Wirkung summieren könnten (s. l. c.¹⁹, S. 236).

³⁰ G. V. MARINETTI, M. ALBRECHT, T. FORD u. E. STOTZ, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **36**, 4 [1959].

³¹ E. GJONE, J. F. BERRY u. D. A. TURNER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **34**, 288 [1959].

* Durch Vermittlung von Herrn Prof. O. WESTPHAL erhielten

Bei der großen biologischen Bedeutung, die dem C'-System für immunologische wie auch für nicht-immunologische Vorgänge im Organismus zukommt, ist erstaunlich, daß diese wichtigen früheren Beobachtungen in Vergessenheit gerieten. Unsere Experimente, die die Arbeiten von BERGENHEM und FAHRÆUS erweitern, haben gezeigt, daß die Lysolecithin-Bildung direkt mit der Aktivität des C'-Systems gekoppelt ist. Wir glauben hieraus den Schluß ziehen zu dürfen, daß die „cytolytische“ Wirkung von Serumkomplement auf der Bildung von Lysolecithin beruht.

Diese Schlußfolgerung bedarf allerdings noch zahlreicher weiterer Untersuchungen und einiger zusätzlicher Überlegungen, die sich vor allem mit der quantitativen Seite des Problems auseinandersetzen. Kann die im Serum bei Alterung bzw. bei reiner Immunreaktion entstehende Lysolecithin-Menge tatsächlich für die biologischen Wirkungen von C' verantwortlich gemacht werden?

Zunächst ist zu klären, wieviel Lysolecithin in einem ml Serum entsteht. Mit Serienverdünnungen reinen Lysolecithins, im Vergleich zu Verdünnungen aus Serumfiltraten, zeigte sich, daß beim Altern von 1 ml frischem Humanserum 2–3 γ Lysolecithin entstehen. In frischem Meerschweinchenserum (bzw. in dessen entweißtem Serumfiltrat) fand sich ca. 0,5 γ Lysolecithin/ml. Nach Zusatz eines Antigen-Antikörperkomplexes vermehrte sich diese Menge auf 3,7 γ /ml, d. h. es erfolgte ein Zuwachs von 3,2 γ /ml.

Weiter errechneten wir – ähnlich wie HAUROWITZ und YENSON³³ dies für die Oleat- und Saponin-Hämolyse getan haben – die Zahl der Lysolecithin-Moleküle, die zur Auflösung eines einzelnen Erythrocyten erforderlich sind. Die Resultate stimmen größenordnungsmäßig überein. Nimmt man für Lysolecithin ein Mol.-Gew. von 650 an, so kommt man zu dem Ergebnis, daß zur Lyse eines einzelnen Humanerythrocyten $3,85 \cdot 10^{10}$ Moleküle notwendig sind. HAUROWITZ und YENSON berechneten, daß zur Zerstörung eines Hammelerythrocyten $2,9 \cdot 10^{10}$ Moleküle Oleat und $1,9 \cdot 10^{10}$ Moleküle Saponin vorhanden sein müssen. Hieraus ergibt sich, daß mit dem aus 1 ml Serum freiwerdenden Lysolecithin ca. 10^5 Erythrocyten aufgelöst werden können.

wir reine Lyso-Lipoide, die von Dr. R. HIRT (Wander-Forschungsinstitut Bern) synthetisiert waren.

³² H. FRIEDENTHAL, *Berliner klin. therap. Wschr.* **12**, 342 [1904].

³³ F. HAUROWITZ u. M. YENSON, *J. Immunology* **47**, 309 [1943].

Derartige Überlegungen sind unserer Meinung nach jedoch nur von begrenztem Wert. Sie werden den biologischen Tatsachen insofern nicht gerecht, als die Hämolyse bzw. Cytolyse nicht durch frei gelöstes Lysolecithin hervorgerufen wird, sondern durch solches, welches am Orte der C'-Aktivierung, also an der Zelloberfläche, entsteht. Die Zahl der unter diesen Bedingungen für die Lyse einer Zelle erforderlichen Moleküle ist vermutlich viel kleiner. Zudem ist nicht ausgeschlossen, daß aktiviertes C'-Enzym auch Phospholipide der Zellstrukturen in Lysoverbindungen umwandelt. Wir sind zur Zeit dabei, dies zu prüfen.

Fragt man sich schließlich, inwieweit unsere Ergebnisse mit den heutigen Vorstellungen über die Wirkung von Serumkomplement in Einklang zu bringen sind, so muß gesagt werden, daß unser methodisches Vorgehen zu stark von den allgemein in der C'-Forschung üblichen Methoden abweicht, um mit ihnen ohne weiteres in Beziehung gesetzt zu werden.

Uns kam es allein darauf an, das Endprodukt der gesamten, z. T. noch unbekanntem Reaktionskette zu fassen, während die Mehrzahl der neueren Arbeiten sich mit der Analyse von Teilreaktionen oder der Charakterisierung von Einzelfaktoren beschäftigt. Es muß abgewartet werden, wann und inwieweit

sich die verschiedenen Arbeitsrichtungen zu einem Gesamtbild ergänzen.

Unsere Befunde beleuchten jedoch eine Reihe von Problemen, die bisher kaum experimentell angegangen werden konnten, von einer neuen Seite. Im Vordergrund stehen dabei die Fragen welche Bedeutung dem Komplementsystem unter normalen und unter pathophysiologischen Bedingungen im Organismus zukommt.

So haben wir Anhaltspunkte dafür, daß C', welches ständig neu gebildet und folglich auch ständig verbraucht werden muß, an den Mauserungsvorgängen von Blutzellen und der Elimination von pathologisch veränderten Zellen mitbeteiligt ist³⁹.

Ferner erscheint es möglich, die wichtige von FRIEDBERGER³⁴ und neuerdings wieder von OSLER³⁵ betonte Rolle von C' bei allergischen und anaphylaktischen Reaktionen und bei der „Anaphylatoxin-Entstehung“ experimentell zu prüfen.

Schließlich sollte es möglich sein zu untersuchen, ob nicht die Inaktivierung lipoidhaltiger bakterieller Endotoxine durch frisches Serum ebenfalls eine Funktion des C'-Systems ist³⁶⁻³⁸.

Fräulein CHARLOTTE VOGT danken wir für gewissenhafte Mitarbeit. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

³⁴ E. FRIEDBERGER u. J. WEISSFEILER, Das Anaphylatoxin. Handbuch der biol. Arbeitsmeth. **13**, 1191 [1933].

³⁵ A. G. OSLER, H. G. RANDALL, B. M. HILL u. Z. OVARY, J. exp. Medicine **110**, 311 [1959]; Int. Symposium, Henry Ford Hospital Little, Brown and Company, Boston Toronto 1959.

³⁶ F. HEGEMANN, Z. Immunforsch. **111**, 202, 213 [1954]; **112**, 340 [1955]; **113**, 201, 386 [1956].

³⁷ M. LANDY, R. C. SKARNES, F. S. ROSEN, R. I. TRAPANI u. M. SHEAR, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **96**, 744 [1957]; R. C.

SKARNES, F. S. ROSEN, M. J. SHEAR u. M. LANDY, J. exp. Medicine **108**, 685 [1958]; F. S. ROSEN, R. C. SKARNES, M. LANDY u. M. J. SHEAR, J. exp. Medicine **108**, 701 [1958].

³⁸ O. WESTPHAL, D. HAMMER, O. LÜDERITZ, A. NOWOTNY, E. EICHENBERGER u. F. GOEBEL, Z. Naturforsch. **13b**, 572 [1958]; O. LÜDERITZ, D. HAMMER, F. GOEBEL, K. SIEVERS u. O. WESTPHAL, Z. Naturforsch. **13b**, 566 [1958].

³⁹ H. FISCHER, W. FRITZSCHE u. H. ARGENTON, Klin. Wschr. **36**, 411 [1958].