

Nachdruck verboten.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Liège
(Direktor: Prof. Dr. André Gratia).]

Das Ultrazentrifugieren der Immunkörper und der normalen bakteriziden Stoffe.

Von **A. Gratia** und **L. Goreczky**.

Mit 3 Abbildungen im Text.

(Eingegangen bei der Schriftleitung am 19. Februar 1938.)

Gratia und Mitarbeiter haben zahlreiche Versuche mit der Ultrazentrifuge von Henri-Huguenard ausgeführt. So stellte Gratia beim Zentrifugieren des Bakteriophagen durch $\frac{1}{4}$ Stunde bei einer Drehzahl von 80000 fest, daß die Bouillon, welche ursprünglich bei einer Verdünnung von 10^{-7} 92 Phagteilchen enthielt, nach dem Zentrifugieren nur mehr 3 Phagteilchen aufwies, während gleichzeitig im Sediment 620 Teilchen zu finden waren. Diese Ergebnisse zeigen schon für sich, daß die Ultrazentrifuge in der Bakteriologie bzw. Serologie ein sehr wertvolles Hilfsmittel darstellt. In weiteren Untersuchungen stellte er fest, daß zwischen der Sedimentierungsgeschwindigkeit und der Qualität des Lösungsmittels ein gewisser Zusammenhang besteht. Zur Durchführung dieser Versuche war der Apparat sehr geeignet, jedoch besaß er in seiner ursprünglichen Ausführung gewisse Nachteile. Es zeigte sich, daß ohne Ausschaltung dieser Nachteile die weitere Durchführung der Versuche fast ausgeschlossen war. Daher war Gratia bestrebt, die Nachteile des Apparates auszuschalten. Nach längeren Versuchen gelang es endlich, die im folgenden besprochene Lösung zu finden, mit deren Hilfe wir den Apparat auf dem Gebiete der biologischen Forschung in viel weitergehendem Maßstabe verwenden können.

Bevor wir diese Abänderung besprechen — über die Gratia bereits kurz berichtet hat — ist es notwendig zum besseren Verständnis eine kurze Beschreibung der Zentrifuge zu geben.

Der Apparat wird mit komprimierter Luft getrieben, die ein Ingersoll-Randscher Kompressor erzeugt. Den Kompressor treibt ein Brown-Boveri-Motor mit automatischer Ausschaltung. Die Drehzahl pro Minute läßt sich durch geeignete Regelung des Druckes zwischen 10000 und 120000 regulieren. Der Apparat selbst besteht aus einem konischen Rotor, der frei auf einem trichterförmigem Gestell ruht. In der Wand dieses Gestelles befinden sich in der Mitte 6—8 Oeffnungen, durch welche die komprimierte Luft eindringt, um den oben erwähnten Rotor zu treiben. Auf der Außenfläche des Rotors sind fingernageleindruckartige Vertiefungen, welche segelartig die mit großem Drucke eindringende Luft auffangen und dadurch den Rotor in Drehung versetzen. Es läuft daher der Rotor während der Drehung auf einem Luftpolster.

Der Rotor besteht aus Stahl und hat einen Deckel mit Schraubengewinde. In seinem Inneren ist ein trichterartiger Raum, in welchen man diesen entsprechenden Kupfergefäß einbringt. Der Voluminhalt des Kupfergefäßes beträgt 25 ccm. Der Nachteil des Apparates besteht in diesem Gefäß bzw. in dessen Form. Die zu zentrifugierende Flüssigkeit befindet sich im Ruhezustand am Grunde des Gefäßes. Sobald aber die Drehung beginnt, nimmt sie der Zentrifugalkraft entsprechend eine gegen den Rand des Gefäßes ringförmig sich ziehende Gestalt an. Die Sedimentation erfolgt dann schichtenweise, und so bilden sich Schichten mit verschiedener Konzentration; vom Zentrum gegen die Peripherie hinaus finden wir immer höhere Konzentrationen. Beim Abstellen ist die Flüssigkeit bestrebt, sich selbst überlassen, ihren ursprünglichen Platz einzunehmen, wodurch Wirbelbewegungen entstehen, welche die Schichten verschiedener Konzentration miteinander vermischen. Besonders gut läßt sich diese Erscheinung zeigen, wenn z. B. in physiologischer NaCl-Lösung suspendierte rote Blutkörperchen oder Bakterien zentrifugiert werden. Im Verlaufe der Drehung des Apparates sammeln sich die suspendierten Teilchen an der Peripherie; beim Abstellen werden sie aber wieder zusammengemischt, wodurch der Erfolg des Zentrifugierens zunichte gemacht wird.

Zum Glück erfolgt dies in der Mehrzahl der Fälle nicht, da das Lösungsmittel irgendein kleberiges Material enthält, welches bei der Sedimentation die Teilchen aneinander und an die Wand des Gefäßes klebt, wie wir das sehr gut bei den Bakteriophagen und im Falle des Tabakmosaikvirus sehen.

Es gibt aber viele Substanzen, bei welchen man in natürlichem Zustande durch Zentrifugieren keine Sedimentierung erreichen kann, und zwar wegen der oben erwähnten Durchmischung. Daher suchte Gratia eine solche Lösung, mit deren Hilfe er diese Uebelstände beseitigen könnte. Wir können hier nicht auf alle Versuche eingehen, sondern wollen nur die zu unseren Versuchen gebrauchte Lösung schildern.

Das Wesen der Abänderung besteht darin, daß wir an Stelle des Kupfergefäßes diesem in Form entsprechenden Duraluminiumblock anbrachten, welcher mehrere kleine Höhlungen zur Aufnahme kleiner Röhren hatte. Es

gibt zwei Typen solcher Duraluminiumblöcke. Der eine enthält 12 Stück 7 mm breite und 15 mm lange Aushöhlungen, der andere aber 18 Stück 4 mm breite und 15 mm lange. In diese kommen nun die Röhren, welche den Höhlungen entsprechend gegen die Peripherie divergieren und etwas herunter gebogen sind. Eine weitere Schwierigkeit bildete die Auswahl der kleineren Röhren, weil, wie die Versuche zeigten, Glas für diesen Zweck nicht geeignet ist, weil es infolge des hohen Druckes zerbricht. Auch Gummiröhren erwiesen sich als ungeeignet, weil diese die Zentrifugalkraft auf den Grund des Gefäßes drückte.

Daher verwendeten wir dreiviertelharte Ebonit- und azetierte Zelluloseröhren, die bis zu einem gewissen Grade dem Drucke nachgeben, aber doch nicht so weich sind, daß sie auf Grund des Gefäßes gepreßt werden. Auf diese Weise wurden die beim Abstellen auftretenden Wirbelbewegungen und die dadurch entstehende Vermischung der Schichten ausgeschaltet. Weitere Schwierigkeiten verursachte die Konservierung der einzelnen durch Sedimentation entstandenen Schichten. Beim Abpipettieren hätten sich wohl bei der Trennung der Schichten Schwierigkeiten ergeben einestheils durch Mischung, andernteils durch die schwierige technische Ausführung. Daher verfahren wir bei unseren Versuchen so, daß wir nach beendetem Zentrifugieren die kleinen Röhren aus ihren Behältern heraushoben und in Kohlensäureschnee brachten, wo sie schnell durchfroren. Dann zerstückelten wir die Röhren in drei gleiche Teile und trennten auf diese Weise die Schichten voneinander. Die zerteilten Röhren brachten wir dann getrennt den einzelnen Schichten entsprechend in Eprouvetten und brachten die gefrorene Flüssigkeit im 37°igen Thermostaten zum Schmelzen, um dann mit der so gewonnenen Flüssigkeit unsere Versuche auszuführen. Bei der Zentrifugierung mußten wir aber auch darauf achten, die Verdunstung der Flüssigkeit zu vermeiden. Zu diesem Zwecke brachten wir auf die Oberfläche der Flüssigkeit einen Tropfen neutrales Paraffinöl, welches sich dort ausbreitete und die Verdunstung verhinderte. Selbstverständlich kontrollierten wir in jedem Fall, ob das Durchfrieren selbst nicht die Wirksamkeit des Serums beeinflusse, konnten uns aber in jedem Falle vom Gegenteil überzeugen.

Im ersten Teile unserer Versuche untersuchten wir, wie sich Antikörper gegen rote Hammelblutkörperchen enthaltendes Kaninchenimmenserum bei der Ultrazentrifugierung verhält.

Zu diesem Zwecke wurden Kaninchen mit Hammelblut immunisiert, dann von den Kaninchen Blut genommen und das Serum bei 56° inaktiviert.

Dann wurde zentrifugiert, und zwar durch 1 Stunde bei 80000 bis 85000 Umdrehungen pro Minute in Hinblick darauf, daß die dementsprechende Gravitationskraft ungefähr 170000 g ausmacht ($r: 2,5$). Nach beendigter Zentrifugierung durchfrieren wir die Röhrchen in der oben geschilderten Weise und zerschneiden sie dann in 3 gleiche Teile, einen oberen, mittleren und unteren Teil. Dann bestimmten wir den Antikörpergehalt der einzelnen Teile durch Titration. Bei der Bestimmung des Hämolysins verfahren wir so, daß wir von den Serumverdünnungen 0,5 ccm nahmen, zu denen wir 0,5 ccm gewaschene 5proz. homologe Blutkörperchensuspension und 1 ccm Komplement in Verdünnung 1:20 gaben. Das Ganze wurde auf 2,5 ccm aufgefüllt und für 1 Stunde in den 37gradigen Thermostaten gebracht.

Dann wurden die Ergebnisse abgelesen, welche auf der Tabelle I dargestellt sind.

Tabelle I.
Hämolysine.

| Serum | Titer |
|----------------------------------|--------|
| Vor dem Zentrifugieren | 1:1000 |
| Nach dem Zentrifugieren: | |
| Obere Schicht | 1:600 |
| Mittlere Schicht | 1:900 |
| Untere Schicht | 1:2000 |

Wie das oben dargestellte Ergebnis zeigt, sedimentieren sich die Hämolysine im Verlaufe des Zentrifugierens ganz beträchtlich, der Titer des im unteren Teile befindlichen Serums ist im Verhältnis zum Originalserum auf das Zweifache gestiegen, während der Antikörpergehalt der oberen Schichten abnahm.

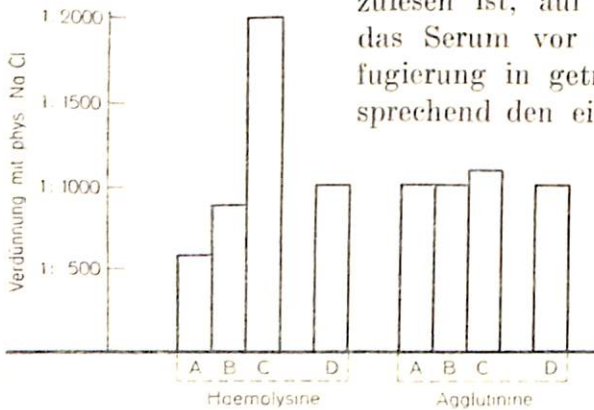
Bei der Titration der Agglutinine verfahren wir so, daß wir 0,5 ccm von reihenweisen Verdünnungen des Serums nahmen, zu welchen 1 Tropfen auf die Hälfte verdünnter gewaschener roter Blutkörperchen gegeben wurde.

Die in Tabelle II dargestellten Ergebnisse zeigen den Agglutiningehalt in den einzelnen Partien des Serums.

Tabelle II.
Agglutinine.

| Serum | Titer |
|----------------------------------|--------|
| Vor dem Zentrifugieren | 1:1000 |
| Nach dem Zentrifugieren: | |
| Obere Schicht | 1:900 |
| Mittlere Schicht | 1:1000 |
| Untere Schicht | 1:1100 |

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Agglutinine im Gegensatz zu den Hämolytinen keine deutliche Sedimentationsbereitschaft zeigen, wenn wir sie unter gleichen Bedingungen wie die Hämolytine zentrifugieren. Auf dem unten stehenden schematischen Bild wird das verschiedene Verhalten der beiden Immunstoffe deutlich dargestellt, wobei der Titer auf der Ordinate ab-



zulesen ist, auf der Abszisse hingegen das Serum vor und nach der Zentrifugierung in getrennten Kolonnen entsprechend den einzelnen Abschnitten.

Auch das Komplement versuchten wir zu zentrifugieren. Auch hierbei zerschnitten wir die Röhren in 3 Teile, einer unteren, mittleren und oberen Schicht entsprechend. Die Titration wurde so vorgenommen, daß wir das Komplement enthaltende Serum im Verhältnis 1:20 verdünnten, dann in schrittweise ansteigender Dosis in Röhren pipettier-

Abb. 1.

- In allen Abbildungen bedeutet
 A: Obere Schicht des zentrifugierten Serums;
 B: Mittlere Schicht des zentrifugierten Serums;
 C: Untere Schicht des zentrifugierten Serums;
 D: Kontrollserum.

ten, mit phys. NaCl-Lösung auf 1,5 ccm ergänzten und 0,5 ccm 5proz. gewaschene Hammelblutkörperchensuspension und 0,5 ccm entsprechend verdünntes Hämolysin hinzufügten.

Die Röhren brachten wir für 1 Stunde in den Thermostaten und lasen nachher den Titer ab.

Tabelle III.
 Komplement.

| Serum | Menge zur Totallyse |
|------------------------------|---------------------|
| Vor dem Zentrifugieren . . . | 0,20 |
| Nach dem Zentrifugieren: | |
| Obere Schicht | 0,35 |
| Mittlere Schicht | 0,30 |
| Untere Schicht | 0,75 |

Wie aus der Tabelle hervorgeht, erfolgte im unteren Teil der Röhren nach anfänglicher Sedimentierung — im Vergleiche zur

mittleren Schicht — eine hochgradige Komplementdestruktion. Diese Veränderungen zeigt sehr deutlich die folgende Abb. 2.

Es ist nun die Frage, ob diese Destruktion auf die durch den Druck verursachte Inaktivierung zurückzuführen ist, oder aber auf die Abtrennung einzelner Teile des Komplementes. Im folgenden gingen wir auf die Zentrifugierung einzelner bakterizider Stoffe über. Das Kaninchenserum, welches wir zu unseren Versuchen verwendeten, enthält, wie bekannt, drei verschiedene bakterizide Stoffe, welche man nach ihrem Verhalten gegenüber Temperaturen (Thermolabilität), sowie auf Grund verschiedener anderer physikalischer und chemischer Eigenschaften voneinander trennen kann. Von diesen ist das von Petterson als α -Lysin bezeichnete Alexin am wenigsten thermostabil,

denn es geht schon bei 56° durch eine halbe Stunde angewendet zugrunde. Seine Wirkung erstreckt sich besonders auf die gramnegativen Bakterien. Der andere, von Petterson als β -Lysin bezeichnete bakterizide Stoff wirkt hauptsächlich auf die grampositiven Bakterien und geht bei 65° zugrunde. Diesen bakteriziden Stoff, der durch seine Wirkung auf Anthraxbazillen bekannt wurde, nennt man

auch anthrakoziden Stoff. Die dritte bakterizide Substanz des Serums ist das Flemmingsche Lysozym, welches gegen Wärme am resistantesten ist und erst bei 70° zugrunde geht. Es übt seine Wirkung besonders auf saprophytäre Bakterien aus, so z. B. auf den Megatheriumbazillus. Aber diese Unterschiede zeigen sich, wie wir das bereits oben erwähnten, nicht nur im verschiedenen Verhalten gegenüber Wärme, sondern auch ihr physikalisches und chemisches Verhalten weicht voneinander ab. So fand Goreczky bei der Prüfung der α -, bzw. β -Lysine vom Standpunkt der Adsorption aus, daß die Wirkung der β -Lysine in mit Watte oder Filterpapier behandelten Sera aufhört, während die α -Lysine weiter wirksam bleiben. Diesen bakteriziden Substanzen entsprechend wählten wir zu unseren Versuchen solche Bakterien, welche zur Bestimmung der Wirkungsstoffe im Serum den oben erwähnten Voraussetzungen entsprachen. So verwendeten wir

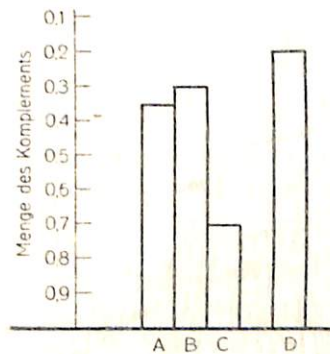


Abb. 2.

für die α -Lysine Typhus, für die β -Lysine Anthrax und für das Lysozym Megatheriumbazillus.

Bei unseren Versuchen zentrifugierten wir das normale Kaninchenserum auf die oben beschriebene Weise durch 1 Stunde bei 85000 Umdrehungen pro Minute. Die Serum enthaltenden Ebonitröhren brachten wir dann in Kohlen-säureschnee, zerstückelten sie dann nach dem Durchfrieren und stellten mit den 3 Fraktionen die bakteriziden Versuche an. Natürlich prüften wir in jedem Falle, ob das Durchfrieren selbst nicht die Wirksamkeit der Sera verändert. konnten aber immer das Gegenteil feststellen. Zu den bakteriziden Versuchen nahmen wir 0,3 ccm Serum resp. Serumverdünnung, zu denen wir 2 Tropfen Bakteriensuspension fügten. Das Ganze kam in den Thermostat und nach abgelaufener bestimmten Zeit, die wir je nach den einzelnen Bakterienarten verschieden wählten, je nachdem zur Wirkung eine bestimmte Einwirkungs-dauer notwendig war, entnahmen wir den Röhren eine Oese der Substanz und impften sie auf Platten, welche für 24 Stunden in den Thermostat kamen, wozu die entwickelten Kolonien gezählt wurden. Als Kontrolle dienten 0,3 ccm Bouillon, zu denen wir ebenfalls 2 Tropfen der betreffenden Bakteriensuspension gaben. Beim Verweilen des Serum-Bakteriengemisches im Thermostaten berücksichtigten wir die zur Serumwirkung auf die untersuchten Bakterien notwendige Zeit. So fanden wir in den Vorversuchen als Wirkungszeit für Typhusbazillen 45 Minuten, für Anthrax und Megatherium je 5 Minuten.

Wir wollen hier nicht alle Ergebnisse der Kolonienzählung wiedergeben, sondern berichten nur über einzelne, den einzelnen Bakterien bzw. den im Serum enthaltenden bakteriziden Stoffen entsprechende Versuche.

Tabelle IV.
Bakterizide Stoffe.

| Bakterien | Ein-wir-kungs-dauer | Ver-dün-nung des Serums | Zentrifugieren | | | | Kon-trolle |
|-------------|---------------------|-------------------------|----------------|-------|----------|--------|------------|
| | | | vor | nach | | | |
| | | | | obere | mittlere | untere | |
| Typhus | 45 Min. | 1/2 | 208 | 2486 | 1288 | 4447 | 5382 |
| Anthrax | 5 „ | 1/50 | 62 | 1730 | 708 | 1955 | 5886 |
| Megatherium | 5 „ | 1/50 | 15 | 630 | 43 | 12 | 6000 |

Wenn wir im Vergleiche zu den Kontrollen die Veränderung der Bakterienzahl beobachten und daraus auf die Wirkungsstärke des Serums schließen, so kommen wir, in Prozenten ausgedrückt, zu folgendem Schema.

Es ist interessant zu beobachten, daß entsprechend der Thermostabilität sich die Sedimentierung der einzelnen bakteriziden Sub-

stanzen verschieden verhält. So sedimentieren sich z. B. die Alexine am deutlichsten, was sich in der geringen Wirkung der oberen Schicht im Vergleich zur mittleren Schicht ausdrückt. Die β -Lysine zeigen in der oberen Schicht eine geringere Abnahme ihrer Wirkung, während die geringste Wirkungsabnahme bei dem Lysozym zu beobachten war. In der Mittelschicht hatten sich sämtliche bakteriziden Stoffe im Vergleiche zur Oberschicht angereichert. In der unteren Schicht gehen die bakteriziden Wirkungsstoffe entsprechend ihrer Wärmeresistenz zugrunde. Das α -Lysin oder Alexin verhält sich genau so, wie wir dies beim Komplement gesehen haben. Das β -Lysin, welches bereits über eine größere

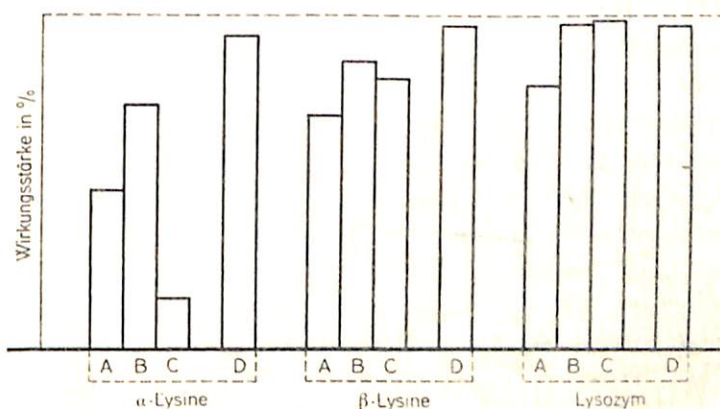


Abb. 3.

Thermostabilität verfügt als das α -Lysin, ist in der unteren Schicht wirksamer, bzw. hat es weniger von seiner Wirksamkeit verloren als das vorher genannte. Das Lysozym hingegen, welches von den 3 Stoffen am unempfindlichsten gegen Erwärmung ist, ging im Sediment nicht zugrunde, weil seine Wirksamkeit ebenso deutlich ist, ja vielleicht noch stärker als die im nicht zentrifugierten Serum.

Zusammenfassung.

Die Verff. berichten über ihre mit der Henri-Huguenardschen Ultrazentrifuge durchgeführten Versuche. Die Zentrifuge wurde in der von Gratia modifizierte Form verwendet. Im Verlaufe ihrer Untersuchungen prüften sie das Sedimentierungsvermögen sowohl der normalen bakteriziden Stoffe als auch das der während der Immunisation gebildeten Antikörper. Dabei wurde gefunden,

daß die Immunhämolysine beim Zentrifugieren mit 85000 Umdrehungen pro Minute deutliche Sedimentierung zeigen. Demgegenüber weisen die Agglutinine beim Zentrifugieren unter ähnlichen Verhältnissen keine deutliche Sedimentation auf. Daraus wird geschlossen, daß zwischen den beiden Stoffen ein Unterschied bezüglich ihrer Molekulargröße besteht. Bei Untersuchung der bakteriziden Stoffe wurde gefunden, daß die einzelnen bakteriziden Substanzen entsprechend ihrer verschiedenen Thermostabilität sich beim Zentrifugieren verschieden verhalten. So sind die Alexine nach dem Zentrifugieren im Sediment nicht in größerer Menge nachweisbar, sondern nehmen im Gegenteil ab, was wahrscheinlich auf eine Schädigung dieser Stoffe durch den Druck oder auf das Abreißen einzelner Teilchen zurückzuführen ist. Dasselbe wurde auch beim Zentrifugieren des Komplementes beobachtet. Der anthrakozide Stoff resp. das β -Lysin ging nach anfänglicher Sedimentierung, wie dies der Reichtum der Mittelschicht an bakterizider Substanz gegenüber der Oberschicht zeigt, ebenfalls im Sediment zugrunde. Das Flemmingsche Lysozym, welches gegen Erwärmung am meisten resistent ist, zeigt zwar keine deutliche Sedimentierung, doch konnte im Sediment ein Zugrundegehen dieses bakteriziden Stoffes nicht beobachtet werden.

Literatur.

- Gratia, Compt. rend. Soc. Biol., T. 117, p. 1288.
 — Bull. Soc. de Chim., T. 18, p. 208.
 — Compt. rend. Soc. Biol., T. 125, p. 371.
 — Ibid., T. 125, p. 1057.
 — Ibid.
 — und Goreczky, Ibid., T. 126, p. 900.
 — und Manil, Ibid., T. 126, p. 903.
 — und Goreczky, Ibid., T. 126, p. 1252.
 Goreczky, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 80, S. 336.
 Petterson, Die Serum- β -Lysine. Jena, Gustav Fischer, 1934.

Nachdruck verboten.

[Aus der Medizinischen Universitätsklinik Palermo
(Direktor: Prof. M. Ascoli).]

Weitere Untersuchungen über die Spezifität der Tumorantigene.

Von **G. D'Alessandro** und **E. Saladino**.

(Eingegangen bei der Schriftleitung am 23. Februar 1938.)

Die Frage der tumorspezifischen Antigene bietet immer noch viel Interessantes. Zwar haben die Untersuchungen von Wittebsky (1) einerseits, von Hirszfeld (2) andererseits zu wichtigen und in gewissem Sinne endgültigen Ergebnissen geführt, die in der Annahme eines spezifischen Haptens der menschlichen Geschwülste gipfeln, doch ist damit nicht das letzte Wort zu diesem vielumstrittenen Problem gesprochen, das entschieden noch zahlreiche ergänzende Untersuchungen erfordert [vgl. Rondoni (3), Bericht auf dem Kongreß in Brüssel].

Ungeklärt ist vor allem die Frage, weshalb die Geschwülste der Laboratoriumstiere keine tumorspezifischen Antigeneigenschaften besitzen. Wenngleich man auch aus diesen negativen Ergebnissen, wie Sachs (4) erst kürzlich mit Recht betont hat, keine endgültigen Schlüsse ziehen kann, so müssen die Resultate doch überraschen. Dazu kommt, daß es außerordentlich schwer ist, die oben erwähnte spezifische Antigenstruktur der menschlichen Tumoren nachzuweisen, so daß die letzten Schlußfolgerungen nicht selten gewissen Zweifeln Raum geben.

Es sei aber darauf hingewiesen, daß durch die Verwendung des Adsorptionsverfahrens der Antikörper nach D'Alessandro und Sofia die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen sehr viel klarer und eindeutiger geworden sind, wie Arbeiten aus unserer Klinik zeigen (D'Alessandro und Gaglio (6)). So führten Versuche mit einem Uterus-Karzinom-Antiserum zu außerordentlich überzeugenden Resultaten.