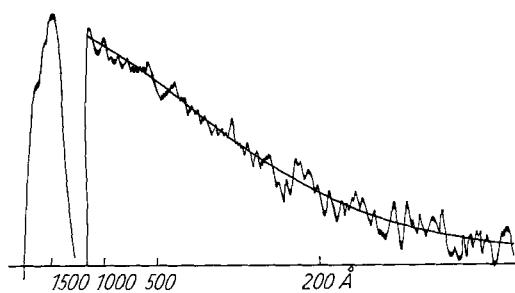


Belichtungszeit um mindestens eine Größenordnung meist untragbar. Diese Schwierigkeiten lassen sich vermindern, wenn man mehrere gleichartige Photometerkurven übereinander zeichnet⁶⁸⁾ (Abb. 40).



[A 16 39]

Abb. 39. Photometer-Kurve der Aufnahme Abb. 38

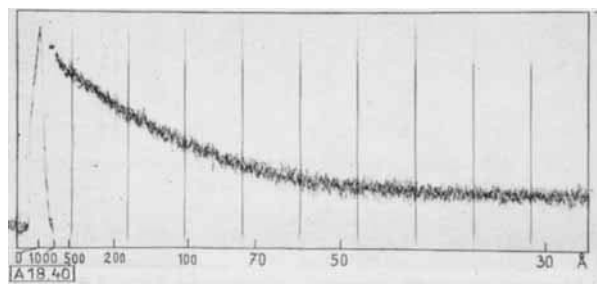


Abb. 40. Gemittelte Photometerkurve, durch Überzeichnen von fünf gleichartigen Kurven erhalten; nach⁶⁸⁾

β) Impulszählung⁶⁹⁾

Bei den Impulszählverfahren wird der Zähler durch den Streubereich hindurchbewegt. Wegen der kleinen Impulsdichte ist eine Direktanzeige in der Regel nicht möglich, so daß man an jeder Stelle so lange zählen muß, bis eine genügend hohe Impulszahl erreicht ist. Nach bekannten statistischen Prinzipien ist der mittlere Fehler $1/\sqrt{N}$ (N = Zahl der gemessenen Impulse). Für N =

⁶⁸⁾ O. Kratky, L. Kahovec u. H. Werner, Z. Elektrochem. 63, 64 [1959].

⁶⁹⁾ Zusammenfassungen: E. Fünfer u. H. Neuert, Zählrohre und Szintillationszähler, Verlag G. Braun, Karlsruhe 1959; W. Parrish u. T. R. Kohler, Rev. sci. Instruments 27, 795 [1956].

10000 macht man also immer noch einen mittleren statistischen Fehler von 1 %.

b) Absolutmessung

Die Schwierigkeit der Absolutmessung, also der Bestimmung der gestreuten Intensität relativ zur Primärintensität, besteht im Größenunterschied der beiden Effekte. Während die Expositions-dauer bei photographischer Registrierung in der Regel viele Stunden beträgt, liegt die Zeichnungsdauer des Primärstrahls meist weit unter einer Sekunde. Um die mit der Messung einer so kurzen Belichtungszeit verbundenen Fehler zu vermeiden, haben wir den Primärstrahl durch gleichmäßige Bewegung des Films während der Exposition zu einem Band auseinandergezogen⁷⁰⁾. Damit wird einerseits die Belichtungszeit ausreichend verlängert, andererseits sind dann die Fehlerquellen ausgeschaltet, die sich durch Photometrieren des sehr steilen Schwärzungsverlaufes quer zum Primärstrahl ergeben.

Bei der absoluten Intensitätsmessung durch Impulszählung tritt die Schwierigkeit auf, daß sich der ungeschwächte Primärstrahl wegen der hohen Impulsdichte nicht zählen läßt. Zur Primärstrahl-Schwächung kann eine rotierende Scheibe dienen, welche im gleichen Zentralabstand mehrere sehr kleine, quer über den Primärstrahl laufende Löcher trägt⁷⁰⁾. Lochgröße (10^{-2} bis 10^{-3} mm²) und Tourenzahl (4000 bis 6000 Umdrehungen/min) müssen so abgestimmt sein, daß in der Zeit, in der das Loch den Primärstrahl überquert, im Durchschnitt weniger als ein Impuls durchtritt. Obwohl durch den ganzen Primärstrahl unter mittleren Versuchsbedingungen 10^7 bis 10^8 Imp/sec treten, gelingt es auf diese Weise, die Impulse sozusagen einzeln herauszufangen.

Man kann natürlich auch mit diesem Absolutverfahren die Streuung eines Standardpräparates eichen und dann die Präparatstreuung mit der Streuung des Standards vergleichen. Sehr gut hat sich für diesen Zweck ein Goldsol in Mandelöl bewährt, mit dem wir vor 8 Jahren die erste Absolutmessung vorgenommen haben und das seither vollkommen unverändert geblieben ist.

Ein kürzlich von D. Heikens, P. H. Hermans und A. Weidinger³⁸⁾ vorgeschlagener Weg ist die Verwendung eines Metallsols genau bekannter Konzentration, von dem man ohne Kenntnis der Teilchengröße die Streukraft ausrechnen kann. Durch eine Vergleichsmessung läßt sich dann nicht nur die absolute Streukraft eines beliebigen anderen Präparates, sondern auch dessen absolute Streuintensität bestimmen. Alle Verfahren mit Eichpräparaten haben allerdings den Nachteil, daß auf die verschiedenen Absorptionen von Eichpräparat und zu messender Substanz korrigiert werden muß, was beim Rotatorverfahren sowie der Methode des gleichmäßig verschobenen Films wegfällt.

Eingegangen am 7. Dezember 1959 [A 18]

⁷⁰⁾ O. Kratky u. Z. Skala, unveröffentlicht.

Zur Biochemie der Hämagglutination

Von Prof. Dr. E. KLENK*)

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln

Die Hämagglutination ist eine überaus spezifische Reaktion, die sich als eine Art Antigen-Antikörperreaktion auffassen läßt. Es wurde gezeigt, daß die Rezeptorgruppe des Agglutinogens der Erythrocyten als einen wesentlichen Bestandteil Acetyl-neuraminsäure enthält. Die Blutgruppenfaktoren M und N sind neuraminsäure-haltige Mucoide, für deren Spezifität diese Säure entscheidend ist.

Die Hämagglutination läßt sich als Sonderfall einer Antigen-Antikörper-Reaktion auffassen. Das Antigen sitzt auf der Oberfläche der Erythrocyten. Es ist in der Regel eine hochmolekulare Substanz, die durch besondere Gruppierung ausgezeichnet ist, welche die Haftstelle für den Antikörper darstellt. Die Haftstellen des Antigens seien hier als Rezeptorgruppen bezeichnet. Die Antikörper werden allgemein Hämagglutinine genannt. Sie sind immer polyvalent, d. h. ihre ebenfalls hochmolekulare Substanz enthält zwei oder mehr Reaktionsorte, die mit der Rezeptorgruppe des Antigens, hier des Agglutinogens reagieren. Man kann sich schematisch vorstellen, daß die Rezeptoren aus der Oberfläche des Erythrocyten herausragen, und die Antikörper bzw. die Hämagglutinine Höhlungen besitzen,

in welche die Rezeptoren genau passen. Zur Agglutination kommt es dann, wenn zwei Reaktionsorte ein und desselben Agglutininmoleküls mit den Rezeptorgruppen von zwei Erythrocyten reagieren (vgl. Abb. 1). Wir kennen zahlreiche Hämagglutinations-Hemmstoffe. Es sind wasserlösliche Agglutinogene, welche die spezifische Rezeptorgruppe besitzen, so daß sie sich mit dem zugehörigen Agglutinin umsetzen können. Derart abgesättigtes Agglutinin vermag Erythrocyten nicht mehr zu agglutinieren (vgl. Abb. 1, III und IV).

Von besonderer Bedeutung sind diejenigen Hämagglutinationen, an welchen verschiedene Blutgruppensysteme beteiligt sind. Aber auch die Erscheinung der Virus-hämagglutination kann hier eingeordnet werden. Damit ist im wesentlichen bereits das ganze Gebiet umrissen, mit dem wir es zu tun haben. Was die chemische Seite des Problems

*) Vorgetr. auf der Tagung der Ges. für physiolog. Chemie, 23. bis 26. Sept. 1959 in Berlin.

betrifft, so befaßte man sich bis jetzt fast ausschließlich mit der Aufklärung der Natur der Agglutinogene, im besonderen der Blutgruppensubstanzen. Seit den grundlegenden Untersuchungen von *Freudenberg* sind in den

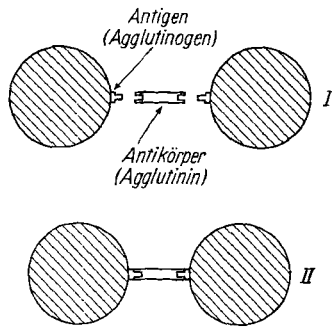
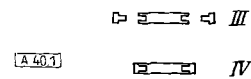


Abb. 1
Schematische Darstellung der Hämagglutination (I und II) und der Reaktion des Hämagglutinationshemmstoffes mit dem Agglutinin (III und IV)



letzten Jahren von *Morgan* und seiner Schule ebenso von *Kabat* und Mitarbeitern große Fortschritte gemacht worden. Über sie hat vor kurzem *Morgan*¹⁾ zusammenfassend berichtet.

Agglutinogene der Erythrocyten

Alle hochgereinigten, blutgruppenaktiven Substanzen wurden aus schleimigen Sekreten gewonnen. Im Gegensatz dazu wollen wir uns hier beschränken auf die Agglutinogene, die auf der Oberfläche der Erythrocyten selbst vorhanden sind, und die sich mehr oder minder rein aus Erythrocytenstroma isolieren lassen. Leider sind unsere Kenntnisse hier noch sehr dürftig und lückenhaft. Die einzigen konkreten Ergebnisse ließen sich bis jetzt wohl auf dem Gebiet der Virushämagglutination erzielen. Dieses Phänomen haben 1941 *Hirst*²⁾ und unabhängig von ihm *McClelland* und *Hare*³⁾ entdeckt. Sie fanden, daß Influenzavirus und andere Myxoviren Erythrocyten agglutinieren. Die Viren enthalten als Teilkomponente ein Agglutinin, das jene befähigt, mit den Zellen in Kontakt zu treten und sich dort festzuheften. Sie besitzen aber als weitere Teilkomponente auch ein Enzym, das sie befähigt, sich von den Zellen wieder abzulösen. Dies geschieht in der Weise, daß das Enzym die Receptorgruppe zerstört bzw. abspaltet. Ein solches Enzym hat *Burnet*⁴⁾ auch in der Kulturflüssigkeit von Cholera-vibrien gefunden. Es ist das *receptor destroying enzyme*. Werden Erythrocyten damit behandelt, so verlieren sie ihre Fähigkeit zu agglutinieren.

In schleimigen Sekreten finden sich neben blutgruppenaktiven Substanzen auch Substanzen, welche die Virushämagglutination stark hemmen. Von *Tamm* und *Horsfall*⁵⁾ wurde ein Harnmucin isoliert, das eine besonders starke Hemmwirkung besitzt. Diese Hemmstoffe besitzen also eine reaktionsfähige Gruppe, die der Receptorgruppe der eigentlichen Agglutinogene sehr ähnlich ist. Das Harnmucin verliert seine biologische Aktivität bei der Einwirkung von Influenzavirus oder *receptor destroying enzyme*. Die zu Grunde liegende enzymatische Reaktion ist von *Gottschalk*⁶⁾ näher studiert worden. Wir haben⁷⁾ dann erstmals

die vom Influenzavirus aus dem Harnmucin abgespaltene Substanz in kristallisierter Form isoliert und als N-Acetylneuraminsäure (o-Sialinsäure nach der Nomenklatur von *Blix*) identifiziert. Die biologisch aktive Gruppe des Mucins enthält also offensichtlich als wesentlichen Bestandteil N-Acetylneuraminsäure und dasselbe kann auch für die Receptorgruppe des Agglutinogens der Erythrocyten angenommen werden. In der Tat konnte aus den Eiweißrückständen von Erythrocytenstroma Neuraminsäure in Form ihrer Methoxyl-Verbindung gewonnen werden⁸⁾ und durch Bebrüten mit *receptor destroying enzyme* ließ sich daraus auch N-Acetylneuraminsäure als Spaltprodukt erhalten⁹⁾.

Wir stellten uns nun die Aufgabe, das neuraminsäurehaltige Agglutinin der Erythrocyten zu isolieren. Zu diesem Zweck benützten wir das bewährte Phenol-Verfahren, das schon *Morgan* bei der Isolierung der Blutgruppensubstanzen gute Dienste leistete. Ein glücklicher Zufall wollte es, daß wir¹⁰⁾ als Ausgangsmaterial zunächst einmal das Stroma von Rindererythrocyten verwendeten, wo dieses Verfahren ohne größere Schwierigkeiten und mit verhältnismäßig guter Ausbeute zu einer rein weißen, wasserlöslichen, neuraminsäure-reichen Substanz führte, welche die Eigenschaft eines typischen Mucoids besaß. Ohne Erfolg blieben dagegen erste Versuche, aus menschlichen Erythrocyten mit demselben Verfahren die entsprechende Substanz darzustellen. Sie gelangen erst, als wir nicht mehr Sammelblut, sondern Blut von bestimmter Blutgruppenzugehörigkeit verwendeten. Am besten sind die Ergebnisse mit Blut der Blutgruppenzugehörigkeit O. Aus dem Stroma anderer Blutgruppenzugehörigkeit lassen sich zwar Substanzen dieser Art ebenfalls gewinnen, aber die Ausbeute ist geringer und die Reinigung macht auch größere Schwierigkeiten.

	Herkunft	biol. Aktivität	Stickstoff %	Gesamtzucker %	Hexosamin %	Neuraminsäure %	einfache Zucker (ber. als Galactose) %
1	Rind	VH*	4,9	60	20	17	40
2	Rind +	VH neg.	3,9	65	18	15	47
3	Mensch O	VH,M,N**	7,5	20	5,8	14	15
4	Mensch O++	VH neg.	6,3	33	10,2	24	23

Tabelle 1. Chemische Zusammensetzung der Mucoide aus Erythrocyten verschiedener Herkunft

+ Aus Rindererythrocyten mit Papain abgespalten. — ++ Aus 3 behandelt mit Papain. — * Virushämagglutination-hemmend. — ** M und N blutgruppenspezifisch.

Die Zusammensetzung der erhaltenen Substanzen (1 u.3) zeigt Tabelle 1. Als Spaltprodukte sind vorhanden: Galactose, Hexosamin, Neuraminsäure und Aminosäuren. Im menschlichen Mucoide kommen außer Galactose in kleineren Mengen noch zwei andere Zucker vor, wahrscheinlich Mannose und Fucose. Das Mucoide aus menschlichem Stroma enthält die Neuraminsäure in Form der Acetyl-, das aus Rinderstroma in Form der Glycolyl-Verbindung. Das Rindermucoide besteht zu 80% aus Kohlenhydrat; dementsprechend ist der N-Gehalt außergewöhnlich niedrig. Der Kohlenhydrat-Gehalt des menschlichen Mucoids ist nur knapp halb so groß, der N-Gehalt dementsprechend höher.

Unsere beiden Mucoide zeigen im Virushämagglutinationstest eine stark ausgeprägte Hemmwirkung. Mengen von 10^{-2} bis 10^{-3} γ pro AD*) führen zu einer vollständigen

* E. Klenk u. W. Stoffel, ebenda 303, 78 [1956].

9) E. Klenk u. H. Lempfrid, ebenda 307, 278 [1957].

10) E. Klenk u. G. Uhlenbruck, ebenda 311, 227 [1958]; 312, 144 [1958].

*) Eine Agglutinationsdosis (AD) entspricht der Virusmenge, die den Agglutinations-Endtiter bewirkt.

1) W. T. J. Morgan, *Naturwissenschaften* 46, 181 [1959].

2) G. K. Hirst, *Science* [Washington] 49, 22 [1941].

3) L. McClelland u. R. Hare, *Canad. J. publ. Health* 32, 530 [1941].

4) F. M. Burnet, F. J. McCrea u. J. D. Stone, *Brit. J. exptl. Pathol.* 24, 228 [1946]; F. M. Burnet u. J. D. Stone, *Austr. J. exptl. Biol. med. Sci.* 25, 227 [1947].

5) I. Tamm u. F. L. Horsfall, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 108 [1950].

6) A. Gottschalk u. P. E. Lind, *Nature* [London] 164, 232 [1949]; A. Gottschalk, ebenda 167, 845 [1951]; 174, 652 [1954]; *Yale J. biol. Med.* 26, 352 [1954]; *Biochemic. J.* 67, 298 [1955].

7) E. Klenk, H. Faillard u. H. Lempfrid, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 301, 235 [1955].

Hemmung. *Receptor destroying enzyme* spaltet von beiden Mucoiden die Neuraminsäure leicht und nahezu vollständig ab, wobei in dem einen Fall als Spaltprodukt die Glycolyl- im anderen die Acetyl-Verbindung entsteht. Das verbleibende nunmehr neuraminsäure-freie Mucoïd besitzt keine Hemmwirkung mehr. Da bei diesem Spaltungsansatz außer dem Neuraminsäure-Derivat keine anderen niedrig-molekularen Spaltprodukte auftreten, dürfte damit der Beweis erbracht sein, daß die Neuraminsäure ein Bestandteil der Receptorgruppe des Agglutinogens, und daß sie für das Zustandekommen der vorliegenden Antigen-Antikörper-Reaktion von wesentlicher Bedeutung ist.

Es ist allerdings nicht von der Hand zu weisen, daß zusätzlich auch gewisse Gruppierungen im Peptid-Anteil des Mucoids an dem Zustandekommen dieser Bindung beteiligt sein könnten. Dafür spricht die Beobachtung, daß Erythrocyten mancher Tiere bei der Behandlung mit proteolytischen Enzymen ihre Fähigkeit mit Influenzavirus zu agglutinieren ebenfalls verlieren. *Springer*¹¹⁾ hat vor kurzem festgestellt, daß dabei eine nicht dialysierbare, neuraminsäure-haltige Substanz sich von den Erythrocyten ablöst. Wir haben die aus Rindererythrocyten mit Papain in Freiheit gesetzte Substanz isoliert und erhielten ein Mucoïd, das seiner chemischen Zusammensetzung nach (vgl. Tabelle 1) mit unserem agglutinationshemmenden Mucoïd (I) fast übereinstimmt, aber biologisch inaktiv ist. Läßt man entsprechend auf unseren Hemmstoff, also auf das biologisch aktive Mucoïd Papain einwirken, so geht unter Abspaltung eines Teils der Aminosäuren die biologische Wirksamkeit verloren, obgleich der Kohlenhydratanteil des Moleküls unverändert bleibt. Bei dem Mucoïd aus menschlichem Stroma kann durch Papain-Behandlung (Tabelle 1; Substanz 4) der Kohlenhydrat-Gehalt merkbar erhöht werden. Aber auch hier geht bei der Behandlung die biologische Wirksamkeit verloren.

Unser aus menschlichen Erythrocyten mit Phenol gewonnenes Mucoïd besitzt nun neben seiner Aktivität gegen Influenzaviren, auch noch ausgesprochen blutgruppenspezifische Eigenschaften. Vor kurzem hat *Hohorst*¹²⁾ festgestellt, daß bei der Verteilung von menschlichem Stroma in Phenol-Wasser die wäßrige Phase M- und N-Aktivität besitzt. Später wurde dann von *Springer*¹³⁾ und von finnischen Forschern¹⁴⁾ gezeigt, daß Erythrocyten bei der Behandlung mit Influenzaviren oder mit *receptor destroying enzyme* ihre M- und N-Aktivität verlieren. Spaltet man nun aus unserem menschlichen Mucoïd die N-Acetylneuraminsäure mit *receptor destroying enzyme* ab, so verschwindet in der Tat die M- und N-Aktivität. Man darf also daraus schließen, daß die Blutgruppenspezifität M und N neuraminsäure-haltige Mucoide sind, und daß für die M- und N-Spezifität die N-Acetyl-neuraminsäure verantwortlich ist. Dies liegt ganz auf der Linie dessen, was wir bisher über die Blutgruppensubstanzen wissen. Nach dem neuesten Stand wird die A-Spezifität in erster Linie durch das Vorhandensein von N-Acetyl-galactosamin in der Receptorgruppe des Mucoids bestimmt, ganz entsprechend die B-Spezifität durch Galactose, die O- bzw. H-Spezifität durch Fucose und wir können nun ergänzen: die M- und N-Spezifität durch N-Acetyl-neuraminsäure¹⁵⁾.

Erythrocyten, von welchen die Neuraminsäure durch Influenzavirus oder durch *receptor destroying enzyme* abgespalten wird, verlieren wie gesagt ihr Agglutinationsvermögen gegen Myxoviren. Sie werden aber jetzt leicht agglutiniert durch Blutserum. Diese Erscheinung ist schon lange unter dem Namen Pan-agglutination bekannt. Das zugehörige Agglutinin ist ein normaler Bestandteil des Blutserums. Die auf der Oberfläche der Erythrocyten in Erscheinung tretende neue Haftgruppe wird als T-Receptor bezeichnet. Unser mit *receptor destroying enzyme* vorbehandeltes menschliches Mucoïd hemmt in der Tat die Pan-agglutination. Die ursprüngliche Substanz enthält also den T-Receptor in latenter Form, welcher durch Abspaltung der N-Acetyl-neuraminsäure in Freiheit gesetzt und wirksam wird.

Ausblick

Was die chemische Natur der Blutgruppensubstanzen des bekannten A-B-O-Systems betrifft, so seien nur die in der Erythrocytenoberfläche vorhandenen Substanzen betrachtet. Die allgemeine Meinung geht wohl dahin, daß die blutgruppenspezifischen Mucoide der Sekrete mit den entsprechenden Stoffen der Erythrocyten identisch sind. Die bisher vorliegenden experimentellen Befunde können allerdings kaum als Stütze für die Richtigkeit dieser Meinung dienen. Alle bisher aus Erythrocyten gewonnenen Stoffe mit A-B-O-Aktivität sind wasserunlöslich und haben die Löslichkeitseigenschaften von Lipoiden.

Im Zusammenhang mit einer ganz andersartigen Problemstellung haben wir seinerzeit, gemeinsam mit *Lauenstein*¹⁶⁾ aus menschlichen Erythrocyten eine neuartige Gruppe von Glykolipoiden gewonnen, deren Kohlenhydratkomponente etwa die Hälfte des Gesamtmoleküls ausmacht. Die Bausteinanalyse ergab das Vorhandensein von Galactose, Glucose und erheblichen Mengen Galactosamin neben Sphingosin und höheren Fettsäuren. Sie sind später auch von *Yamakawa*¹⁷⁾ dargestellt worden, der erkannte, daß ihnen eine ausgesprochen blutgruppenspezifische Wirkung zukommt. Als wir nun vor kurzem unser altes, weitgehend gereinigtes Präparat daraufhin prüften, zeigte es sich in der Tat eindeutig als blutgruppenaktiv, und zwar besaß es, da aus Sammelblut gewonnen, A- und B-Aktivität. Ein dann aus A-Erythrocyten dargestelltes Rohprodukt zeigte nur A-Aktivität, ebenso ein entsprechendes Präparat aus B-Erythrocyten nur B-Aktivität und aus A-B-Erythrocyten A- und B-Aktivität. Die Befunde von *Yamakawa* können so als bestätigt gelten. Allerdings stehen eingehendere Untersuchungen noch aus. Die Vermutung, daß die Aktivität auf geringe Verunreinigungen mit Mucoiden zurückzuführen ist, mag vielleicht zutreffen. Andererseits wäre aber die geringere Aktivität der Lipoidpräparate gegenüber den Mucoiden auch sehr wohl durch die verschiedene Wasserlöslichkeit zu erklären. Die Lipoidmoleküle zeigen in Wasser ohne Zweifel starke Aggregation und es könnte sehr wohl sein, daß ein großer Teil der aktiven Gruppen des Lipoids deshalb nicht reagieren kann. Jedenfalls liegen die Verhältnisse ganz anders, wenn diese Lipide in die Oberfläche der Erythrocyten eingebaut sind. Ihre Blutgruppenaktivität wäre auch keineswegs überraschend, in Anbetracht der Ähnlichkeit der Kohlenhydrat-Komponente mit den blutgruppenaktiven Mucoiden.

Eingegangen am 4. November 1959 [A 40]

¹¹⁾ G. F. Springer u. M. I. Rapaport, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 103 [1957].

¹²⁾ H. J. Hohorst, Z. Hyg. Infektionskrankh. 139, 561 [1954].

¹³⁾ G. F. Springer u. N. J. Ansell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 182 [1958].

¹⁴⁾ O. Mäkelä u. K. Cantell, Ann. Med. exp. Biol. fenn. 36, 366 [1958].

¹⁵⁾ Vgl. a. T. Baranowski, E. Lisowska, A. Morawiecki, E. Romanowska u. K. Stróżka, Arch. Immunol. Terapii Dośw. 7, 15 [1959], sowie Naturwissenschaften 47, 66 [1960].

¹⁶⁾ F. Klenk u. K. Lauenstein, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 288 220 [1951]; 291, 249 [1952].

¹⁷⁾ T. Yamakawa u. S. Suzuki, J. Biochem. [Japan] 39, 220 [1952]; T. Yamakawa u. T. Iida, Jap. J. exp. Med. 23, 327 [1953]; T. Yamakawa, R. Ohta, J. Ichikawa u. J. Osaki, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 152, 1288 [1958].