

Über die Dissoziation von Antigen-Antikörper-Komplexen *in vivo**

B. HEYMER, TH. B. SMITH und O. HAVERKAMP

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 6. April 1966

Über das Verhalten i.v. injizierter Antigen-Antikörper-(Ag-Ak-)Komplexe liegen in bezug auf Toxicität, Antigenität und Metabolismus für das Tierexperiment zahlreiche Untersuchungen vor. Meist wurden bei diesen Versuchen Komplexe verwendet, in denen auch das Antigen im wesentlichen aus Protein bestand, die Antikörperkomponente von einer anderen Species als der mit dem Komplex behandelten Tierart stammte und der Komplex durch Antigenüberschuß in Lösung gebracht wurde. 1964 fanden BACKHAUSZ u. Mitarb., daß mit Hilfe von bestimmten Ag-Ak-Komplexen (z. B. D-Anti-D-Komplexe) bei Kaninchen spezifische Anti-Immunglobulin-Seren (z. B. Anti-Anti-D-Ak) erzeugt werden konnten. Die Entstehung solcher Anti-Immunglobulin-Antikörper nach Injektion eines Ag-Ak-Komplexes könnte einmal sich abspielen nach einer Spaltung des Komplexes in seine Bestandteile (Antigen und Antikörper) oder aber auch bei Weiterbestehen des Komplexes, wobei dann nur sein Antikörper-Anteil als Antigen wirksam wäre.

Die Möglichkeit einer Trennung von Ag-Ak-Komplexen *in vitro* ist bekannt (STERNBERGER u. PRESSMAN, 1950; KLEINSCHMIDT u. BOYER, 1952; TURNER u. BOYER, 1952; TOZER u. Mitarb., 1962). Weniger bekannt ist dagegen, ob es auch *in vivo* zu einer Dissoziation, also etwa nach Injektion eines Ag-Ak-Komplexes kommen kann. Der Frage einer *in vivo*-Dissoziation von intravenös injizierten Ag-Ak-Komplexen sollte deshalb in der vorliegenden Untersuchung nachgegangen werden. Eine solche Dissoziation könnte eigentlich nur dadurch festgestellt werden, daß man die Bildung von neuen, spezifischen Antikörpern gegen die Antigen-Komponente des Komplexes nachweist.

Über partielle Dissoziation von unlöslichen Ag-Ak-Komplexen nach i.v. Injektion in sensibilisierte und nicht sensibilisierte Kaninchen berichteten WALTER u. ZIPPER, 1959 und 1960. In ihren Untersuchungen verwendeten sie Suspensionen von Komplexen aus Rinder- γ -Globulin und den homologen, in Kaninchen erzeugten Antikörpern, bei denen entweder der Antikörper oder das Antigen des Komplexes mit Jod¹³¹ markiert worden war. Auch WEIGLE berichtete 1958 über Untersuchungen mit radioaktiv markierten Immunpräcipitaten nach i.v. Injektion in Kaninchen; er glaubte zumindestens nicht ausschließen zu können, daß die im Serum gemessenen Aktivitäten z.T. von aus den Komplexen frei gewordenen Antigenen oder Antikörpern herrührten.

Um eine Antikörper-Bildung gegen die Antikörper des Komplexes oder gegen den ganzen Komplex zu vermeiden, mußte man aber den Versuch in einem Tier der gleichen Species ablaufen lassen, da hier im allgemeinen keine nennenswerte Antikörperbildung gegen specieseigene Immunglobuline zu erwarten ist. Zu diesem Zwecke wurden aus β -hämolysischen Streptokokken verschiedener Gruppen (LANCEFIELD) Antigene hergestellt und mit diesen Kaninchen immunisiert. Eines der so gewonnenen Antiseren (gegen Streptokokken der Lancefield-Gruppe C) diente als Ak-Spender zur Präparation von Ag-Ak-Komplexen und zwar

* Mit dankenswerter Förderung der Fritz Thyssen-Stiftung.

1. eines Agglutinates aus inaktivierten C-Streptokokken (deren Antigenstruktur weitgehend bekannt ist, KRAUSE u. McCARTY, 1962) und dem homologen Ak und 2. eines Präcipitates aus C-Streptokokken-Polysaccharidextrakt und demselben homologen Ak. Diese beiden Immunkomplexe wurden nun in nicht sensibilisierte Kaninchen i. v. injiziert und die Seren der Kaninchen nach einigen Wochen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen C-Streptokokken untersucht (vor Beginn der Immunisierung waren Antikörper nicht nachweisbar). Weiterhin wurden die Seren geprüft auf Ak gegen die beiden Komplexe und gegen Kaninchen-Immun(bzw. - γ -)Globulin.

Material und Methoden

I. Herstellung der Antigene und Antiseren

Aus β -hämolytischen Streptokokken der Gruppen A, C und G (Stämme: J17A4, T12/126, C95/60B, C74 und D166B des Rockefeller Institutes, New York) wurden Antigensuspensionen hergestellt und mit diesen bei Kaninchen gruppenspezifische Antiseren erzeugt (s. SMITH, 1965). Die Agglutinationstiter (KABAT u. MAYER, 1964) dieser Seren lagen zwischen 1:640 und 1:10240; meist betrug der Titer 1:5120. Sowohl im Präcipitintest (SWIFT, WILSON u. LANCEFIELD, 1943) als auch in der Anwendung des direkten Immunofluoreszenz-Verfahrens (COONS u. KAPLAN, 1950; MOODY, ELLIS u. UPDIKE, 1958) zeigten die Seren eine brauchbare Spezifität bei Austestung mit Streptokokken der Gruppen A, C und G.

Herstellung der Ag-Ak-Komplexe. 46 ml eines Anti-C74-Serums (6,8 g-% Gesamteiweiß, 1,5 g-% γ -Globulin, Ak-Titer von 1:1280 gegen β -hämolytische Streptokokken der Gruppe C) wurden für die Präparation der Ag-Ak-Komplexe verwandt.

Durch Agglutination gewonnener Ag-Ak-Komplex. In 480 ml tryptic soy broth (DIFCO) wurden Streptokokken des Stammes C74 18 Std inkubiert, die gesamte Brühe zentrifugiert, das Sediment zweimal in steriler physiol. NaCl gewaschen, in 18 ml physiol. NaCl suspendiert und anschließend $1\frac{1}{2}$ Std im Wasserbad bei 56° C inaktiviert. Um sicher zu gehen, daß alle Ag-Determinanten der inaktivierten C74-Streptokokken (C74 Agg) durch Ak des C74-Antiseraums abgesättigt waren, wurde die Bildung des Komplexes C74 Agg-C74 Ak bei starkem Antikörperüberschuß vorgenommen. In einem Vorversuch waren im Überstand einer mit 1 ml Ag-Suspension und 0,5 ml C74-Antiserum ($4\frac{1}{2}$ Std Wasserbad von 56° C, danach für 12 Std in den Kühlschrank bei 0—4° C) durchgeführten Agglutinationsprobe noch reichlich agglutinierende Antikörper vorhanden gewesen, was für eine erfolgte Absättigung der Ag-Determinanten sprach. Entsprechend diesem Verhältnis wurden zur Herstellung des Ag-Ak-Komplexes 30 ml Ag-Suspension mit 15 ml Antiserum gemischt, unter gelegentlichem Aufschütteln für 12 Std ins 37° C Wasserbad und dann für weitere 12 Std in den Kühlschrank (+4° C) gestellt. Das Sediment wurde abzentrifugiert dreimal in kalter, steriler physiol. NaCl gewaschen und in 24 ml physiol. NaCl suspendiert.

Durch Präcipitation gewonnener Ag-Ak-Komplex. Ein zweiter Ag-Ak-Komplex wurde aus einem C74 Streptokokken-Polysaccharidextrakt (Extraktgewinnung aus 1350 ml einer 18 Std inkubierten Todd-Hewitt Brühe (DIFCO) nach der Autoclav-Methode von RANTZ und RANDALL (1955) für den Präcipitintest) und dem homologen Ak des C74-Antiseraums gebildet. Die Absättigung der Ag-Determinanten wurde hier dadurch erreicht, daß einer Serumprobe eine bestimmte Menge Ag zugefügt, die Präcipitation abgewartet und das Sediment abzentrifugiert wurde. Das Supernat wurde nun solange jeweils mit der gleichen Ag-Menge versetzt und das entstehende Präcipitat abzentrifugiert bis keine Präcipitation mehr auftrat. Entsprechend dem Danysz-Phänomen (DANYSZ, 1902; SCHMIDT, 1928) wurde auch die letzte Ag-Menge mit den zuvor zugesetzten Präcipitinogen-Fraktionen addiert und hieraus das Verhältnis Ag-Suspension: Antiserum von 0,44:0,5 errechnet. Demgemäß wurden nun 13,2 ml Ag-Aufschwemmung mit 15 ml Antiserum gemischt, geschüttelt, $1\frac{1}{2}$ Std bei Zimmertemperatur und danach 14 Std im Kühlschrank (+4° C) belassen. Nach Abzentrifugieren des Präcipitates waren im Supernat keine Ak mehr nachweisbar. Der entstandene Komplex wurde zweimal in kalter, steriler physiol. NaCl gewaschen und dann in 14 ml physiol. NaCl suspendiert.

II. Injektion der Ag-Ak-Komplexe in Kaninchen

Je zwei Hauskaninchen (eigene Zucht, $\frac{1}{2}$ Jahr alt, 3—3,5 kg schwer, beiderlei Geschlechts) erhielten an aufeinanderfolgenden Tagen einer Woche i.v. Injektionen der beiden Komplex-Suspensionen (Agglutinations-Komplex: C74 Agg-C74 Ak; Präcipitations-Komplex: C74 Präc-C74 Ak) nach folgendem Schema:

1. C74 Agg-C74 Ak: 1. Woche $3 \times 0,5$ ml Kaninchen 1233 und 1234
 2. Woche $3 \times 1,0$ ml
 3. Woche $3 \times 1,0$ ml
 4. Woche $3 \times 1,0$ ml
2. C74 Präc-C74 Ak: 1. Woche $3 \times 0,5$ ml Kaninchen 1235 und 1236
 2. Woche $3 \times 1,0$ ml
 3. Woche $3 \times 0,5$ ml
 4. Woche $3 \times 1,0$ ml

5 Tage nach der letzten Injektion wurden alle 4 Tiere durch Herzpunktion entblutet, das Serum abzentrifugiert und nach Passage durch einen Seitz-Mikrofilter steril bei $0-4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

III. Austestung der Seren 1233/34 und 1235/36 auf Ak gegen:

- A. Streptokokkenantigene (SAg),
- B. Komplexe (K),
- C. Kaninchen-Immunglobuline (Ig).

Hierzu wurden folgende Methoden verwandt:

1. *Präcipitations-Proben.* a) Capillar-Test nach LANCEFIELD. Als Präcipitinogen diente ein Polysaccharidextrakt aus den Zellwänden von Streptokokken der Gruppe C (Stamm C74) wie er mit der 1943 von SWIFT, WILSON u. LANCEFIELD angegebenen Methode gewonnen werden kann.

b) Mikropräcipitationstest nach OUCHTERLONY (Ausführung wie bei HAVERKAMP u. Mitarb., 1963). Für SAg wurde der bereits unter a) erwähnte C74-Streptokokkenextrakt benutzt, welcher unverdünnt in das Zentralloch der Agarplatte eingefüllt wurde; in sechs kreisförmig um dieses herum angeordnete Löcher kamen, bei 12 Uhr beginnend Serumverdünnungen von 0,1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80. Bei Ig wurde in das Zentralloch Kaninchen-Normalserum bzw. 2% Kaninchen- γ -Globulin gegeben.

c) Immunelektrophorese (methodische Einzelheiten s. HITZIG, 1961, oder HAVERKAMP, 1962). Angewandt wurde die Mikromethode nach SCHEIDEGGER bei SAg mit einer Rinne (C74-Präcipitinogen wie bei a) u. b) und zwei Stanzlöchern (Kaninchenserum 1233—36) und bei Ig mit zwei Rinnen (a.: Antiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin vom Schaf, b.: Kaninchen-serum 1233—36) und drei Stanzlöchern (Kaninchen-Normalserum).

2. *Agglutinations-Proben.* Zur Durchführung kam der Agglutinationstest wie er mit Bakterien üblich ist (KABAT u. MAYER, 1964). Als Antigen wurde bei SAg eine Aufschwemmung von inaktivierten ($\frac{1}{2}$ Std Wasserbad von 56°C) C74-Streptokokken in physiol. NaCl mit etwa 1×10^9 Bakterien/ml verwendet und Serumverdünnungen von 1:20 bis 1:10240 hergestellt. Die Proben wurden unter gelegentlichem Aufschütteln $4\frac{1}{2}$ Std ins 56°C Wasserbad und anschließend 12 Std in den Kühlschrank bei $0-4^{\circ}\text{C}$ gestellt und erst danach abgelesen. Bei K wurde die viermal verdünnte Suspension des Komplexes C74 Agg-C74 Ak (s. I) benutzt.

3. *Immunofluorescenz* (COONS u. KAPLAN, 1950; MOODY, ELLIS u. UPDIKE, 1958). Anwendung fand das direkte Immunofluorescenz-Verfahren in der Ausführung und mit den Kontrollen wie sie von SMITH 1965 im einzelnen beschrieben wurden. Als weitere, dort nicht angegebene Kontrolle wurde der Immunofluorescenz-Hemmungstest durchgeführt. Bei SAg dienten sowohl aktive wie inaktivierte C74-Streptokokken in Suspensionen wie unter 2. angegeben als Antigen. Bei K wurden die verdünnten C74 Agg-C74 Ak Komplex-Suspensionen, wie ebenfalls bereits unter 2. beschrieben, verwendet. Es wurde jeweils das Gesamtserum und zwar mit 0,05 mg Fluorescein-Isothiocyanat/mg Eiweiß (MARSHALL u. Mitarb., 1958) konjugiert, gegen PBS (0,01 mol Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2) dialysiert und Serumverdünnungen von 1:10, 1:50 und 1:100 geprüft.

Ergebnisse

A. Untersuchung der Seren 1233-36 auf Antikörper gegen Streptokokkenantigene

Wie aus Tabelle 1 und 2 zu entnehmen ist, fanden sich in den Seren der mit dem Präcipitat C74 Präc-C74 Ak immunisierten Kaninchen 1235 und 1236 mit keiner Methode Antikörper gegen C74-Streptokokken. Im Gegensatz dazu ließen sich bei den Kaninchen 1233 und 1234, welchen der Agglutinations-Komplex i. v. injiziert worden war, mit verschiedenen Methoden Ak gegen C74-Streptokokken nachweisen (Tabelle 1). In beiden Seren fand sich ein deutlich positiver Ausfall des Capillar-Tests nach LANCEFIELD und des Mikropräcipitationstests

Tabelle 1. Untersuchung der Seren der vier mit Komplexen immunisierten Kaninchen auf präcipitierende und agglutinierende Antikörper gegen den Antigenteil (C74-Streptokokken bzw. C74-Streptokokken-Polysaccharidextrakt) der injizierten Komplexe

Kaninchen bzw. Serum Nr.	Komplex i. v. injiziert	Präcipitationsreaktionen			Agglutinations- reaktion Bakterien- agglutinations- probe
		Capillartest nach LANCE- FIELD	Mikro-Präci- pitationstest nach OUCH- TERLONY	Immun- elektrophorese	
1233	Agglutinationskomplex C74 Agg—C74 Ak	+	+	+	* + bis 1:320
1234	Agglutinationskomplex C74 Agg—C74 Ak	+	+	+	+ bis 1:80
1235	Präcipitationskomplex C74 Präc—C74 Ak	---	---	---	---
1236	Präcipitationskomplex C74 Präc—C74 Ak	---	---	---	---

* Präcipitat im γ -Globulinbereich.

Tabelle 2. Untersuchung der Seren der vier mit Komplexen immunisierten Kaninchen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen A: C74-Streptokokken; B: Komplexe mit Hilfe des direkten Immunofluoreszenzverfahrens nach COONS und KAPLAN

Kaninchen bzw. Serum Nr.	Komplex i. v. injiziert	Direkte Immunofluoreszenz nach COONS und KAPLAN			
		A		B	
		mit aktiven C74-Strepto- kokken	mit inaktivier- ten C74 Strepto- kokken	mit dem Komplex C74 Agg— C74 Ak	mit dem Komplex C74 Präc— C74 Ak
1233	Agglutinationskomplex C74 Agg—C74 Ak	+ bis 1:50	+ bis 1:50	—	X*
1234	Agglutinationskomplex C74 Agg—C74 Ak	+ bis 1:50	+ bis 1:10	—	X
1235	Präcipitationskomplex C74 Präc—C74 Ak	---	---	X	---
1236	Präcipitationskomplex C74 Präc—C74 Ak	---	---	X	---

* X = diese Kreuzreaktion wurde nicht geprüft.

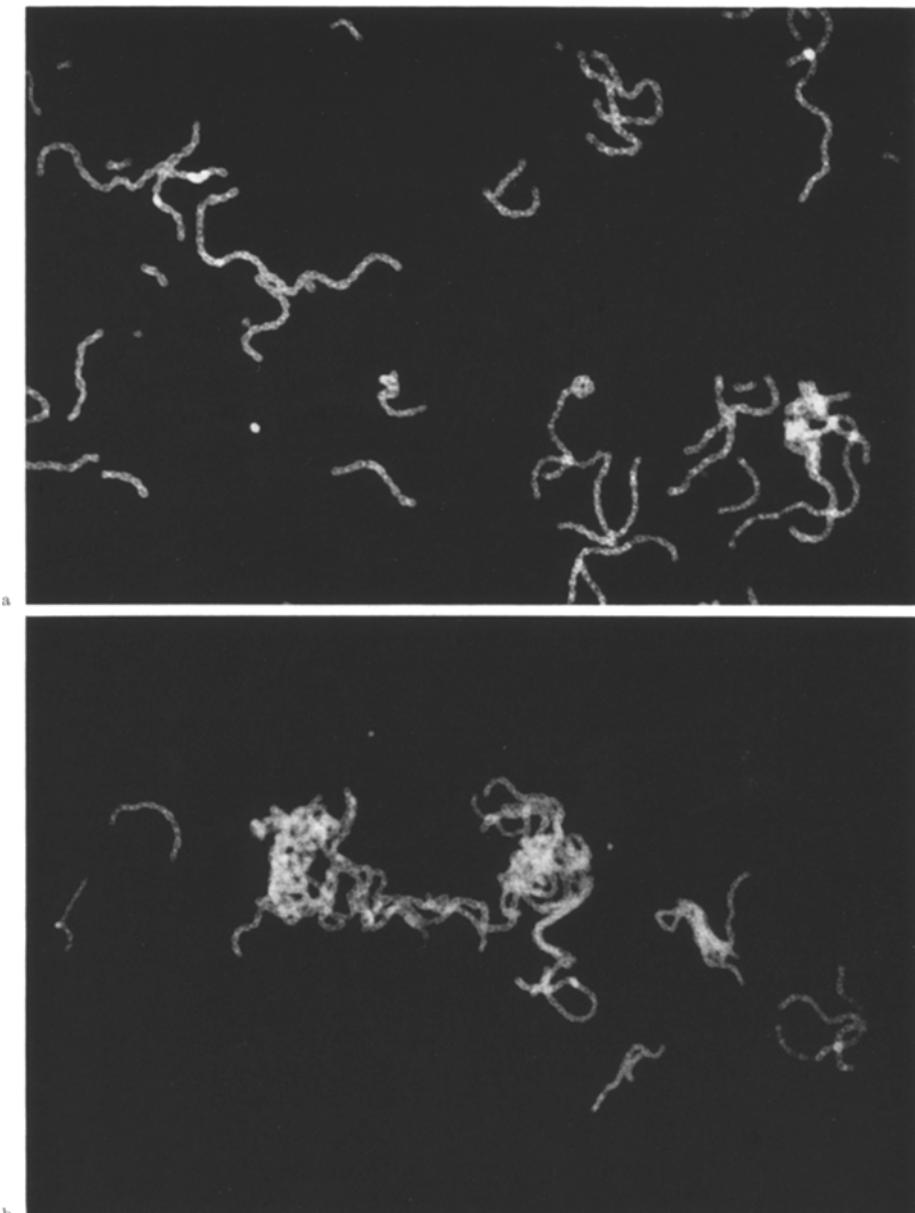


Abb. 1a u. b. Streptokokken der Gruppe C. Direkte Methode nach COONS und KAPLAN unter Verwendung von Fluorescein-Isothiocyanat. Vergr. 600 \times . a Im Präparat gelb-grüne (in der Wiedergabe weiße) Fluoreszenz der Streptokokken nach Inkubation mit dem gruppenspezifischen Antiserum eigener Herstellung (Vers.-Nr. 1223). b Im Präparat gelb-grüne (in der Wiedergabe weiße) Fluoreszenz der Streptokokken nach Inkubation mit dem konjugierten Serum eines mit dem Agglutinationskomplex C74 Agg-C74 Ak immunisierten Kaninchens (Vers. Nr. 1233).

nach OUCHTERLONY bei Serumverdünnungen von 0—1:20 (1233) bzw. 0—1:10 (1234). In der Immunelektrophorese zeigte sich jeweils ein schwaches Präcipitat im γ -Globulin-Bereich. Die Agglutinations-Probe war bis zu einer Serumver-

dünnung von 1:320 (1233) bzw. 1:80 (1234) positiv. Weiterhin fand sich eine spezifische Fluoreszenz der C74-Streptokokken nach Behandlung mit den Fluoresceinkonjugierten Seren 1233 bzw. 1234 bis zu einer Verdünnung von 1:50 (Tabelle 2, Abb. 1). Als Kontrollen wurden Ausstriche von aktiven und inaktivierte C74-Streptokokken 1. mit ungekoppeltem und danach mit gekoppeltem Serum 1233 bzw. 1234, 2. mit gekoppeltem Kaninchen-Normalserum und 3. mit gekoppelten Antiseren gegen Streptokokken der Gruppe A und G überschichtet. In keinem Falle kam es zu einer spezifischen Fluoreszenz.

*B. Untersuchung der Seren 1233—1236 auf Antikörper
gegen die beiden i. v. injizierten Komplexe*

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß sich mit Hilfe des direkten Immuno-fluoreszenz-Verfahrens nach CONNS u. KAPLAN in den Seren 1235 und 1236 keine Ak gegen das Präcipitat C74 Präc-C74 Ak nachweisen ließen. Aber auch die Prüfung der konjugierten Seren 1233 und 1234 gegen den Agglutinations-Komplex C74 Agg-C74 Ak ergab keine Fluoreszenz. Agglutinations-Proben der beiden letztgenannten Seren mit feindispersen Aufschwemmungen des vierfach verdünnten Agglutinates fielen ebenfalls negativ aus. Als wichtigster Befund ist hier festzuhalten, daß also die Seren der mit dem Agglutinat immunisierten Kaninchen 1233 und 1234 nicht mit dem Komplex C74 Agg-C74 Ak, wohl aber mit dem Antigenteil des Komplexes (inaktivierte C74-Streptokokken) reagierten.

*C. Untersuchung der Seren 1233—1236 auf Antikörper
gegen Kaninchen-Immunglobuline*

Weder im Mikropräcipitationstest nach OUCHTERLONY noch mit der Immun-elektrophorese konnten Ak gegen Kaninchen- γ -Globulin (als Antigen wurde Kaninchen-Normalserum bzw. 2% Kaninchen- γ -Globulin verwendet) nachgewiesen werden.

Diskussion

Die eingangs aufgeworfene Frage, ob es nach i. v. Injektion von in vitro gebildeten, unlöslichen Ag-Ak Komplexen zu einer Dissoziation der Komplexe in vivo (Kaninchen) kommen kann, scheint für das Agglutinat C74 Agg-C74 Ak zuzutreffen. Das mit verschiedenen Methoden in den Seren 1233 und 1234 nachgewiesene Vorhandensein von Antikörpern gegen C74-Streptokokken ist nur verständlich, wenn man ein Freiwerden der im Komplex durch Antikörper gebundenen Antigendeterminanten annimmt. Eine unvollständige Ak-Absättigung der antigenwirksamen Strukturen in der injizierten Agglutinatsuspension kann nicht Ursache der erfolgten Immunisierung sein, da die Seren 1233 und 1234 nicht mit dem Komplex reagierten. Andererseits könnten die mit 1:320 bzw. 1:80 relativ niedrigen Agglutinationstiter gegen eine sehr weitgehende Auftrennung der Komplexe sprechen. Wenn man von den Untersuchungen von WALTER und ZIPPER (1960) ausgeht, welche die Dissoziation der Ag-Ak-Komplexe im Kreislauf von Kaninchen feststellten und weiter die Beobachtungen BENACERRAFS u. Mitarb. (1959) zugrunde legt, die fanden, daß sogar lösliche Ag-Ak-Komplexe sehr bald, d.h. in Minuten bis Stunden aus dem Blutkreislauf der Versuchstiere eliminiert werden, so wäre eine Erklärung für die gefundenen niedrigen Antikörpertiter möglicherweise in dieser Richtung zu suchen. Es ließe sich hier auch

diskutieren, ob nicht nach dem Auftreten der ersten Antikörper gegen das aus dem Agglutinat abgespaltene Streptokokken-Antigen, eben diese Antikörper bei erneuter Injektion von Komplexen einer weiteren Dissoziation entgegenwirken bzw. die freiwerdenden Antigen-Determinanten besetzen und so unwirksam machen.

Die Frage der fehlenden Antikörper-Bildung gegen C74-Streptokokken bei den durch das Immunpräcipitat C74 Präc-C74 Ak sensibilisierten Kaninchen 1235 und 1236 wurde bereits erörtert. Ob die Antwort schon dadurch gegeben ist, daß das verwendete Präcipitinogen hier nur ein *in vitro* reagierendes Partial-Antigen bzw. Hapten darstellt, kann nicht sicher entschieden werden. Wahrscheinlich ist nur, daß von den drei Präparationsmethoden für Streptokokken-Polysaccharidextrakte (Säureextraktion nach LANCEFIELD, Formamidextraktion nach FULLER, Autoclavmethode nach RANTZ u. RANDALL) die hier angewandte Autoclavmethode am wenigsten eingreifend wirkt. Darüber hinaus wäre weiter zu vermuten, daß zwischen den beiden injizierten Komplexarten Unterschiede in den Antigen tragenden Anteilen und in der Antikörperbindung — nicht dem Antikörper: präcipitierende und agglutinierende Antikörper sind als identisch anzusehen (HEIDELBERGER, 1939) — bestehen, welche hier eine Rolle spielen könnten. So ist einerseits bekannt, daß für die Bildung eines Agglutinates wesentlich weniger Antikörper erforderlich sind als für die eines Präcipitates (ISLIKER, 1957), andererseits weiß man, daß jede Bakterienspecies wegen der Vielzahl ihrer antigenwirksamen Substanzen ein Antikörpergemisch im immunisierten Wirtstier hervorruft (SCHULTZE, 1962). Der für die Präcipitation verwendete C74-Streptokokken-Polysaccharidexakt, der u.a. auch das für die Streptokokken der Lancefield-Gruppe C spezifische N-acetylgalactosamin (KRAUSE, 1963) enthält, kann also im Gegensatz zu dem Agglutinat nur einen Bruchteil der vorhandenen Antikörperarten gebunden haben. Völlig ungeklärt ist die Frage, ob die Festigkeit der Antikörperbindung an das innerhalb der Bakterienwand lokalisierte Antigen (Ag-Ak-Komplex im weiteren Sinne) verglichen werden kann mit der Antikörperfixation in einem Immunpräcipitat (Ag-Ak-Komplex im engeren Sinne).

Die Prüfung der Seren 1233—1236 auf gegen die Komplexe gerichtete Antikörper wurde hauptsächlich als Kontrolle ausgeführt und fiel ebenso wie die Austestung der Seren auf Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin negativ aus. Der letztgenannte Befund ist insofern gut zu erklären als es sich bei dem Ak-Anteil der Komplexe ja um artspezifisches Eiweiß, Kaninchen-Immunglobulin handelt. Allerdings ist bekannt, daß, wenn auch nur unter besonderen Bedingungen, durch Kaninchen-Ak sensibilisierte Mikroorganismen nach Injektion in Kaninchen eine Isopräcipitinbildung (Anti-Antikörper) hervorrufen können (DUBISKI u. Mitarb., 1959). Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen an der Maus (KELUS u. MOOR-JANKOWSKI, 1961). Andererseits kam MILGROM, der sich viel mit der Frage der Anti-Antikörperbildung beim Kaninchen beschäftigte, in einer neueren Publikation (1964) zu dem Schluß, daß dieses Phänomen wenigstens teilweise durch das Vorhandensein von Kaninchen-Blutgruppen vorgetäuscht wird. Die Bildung eines Anti-Kaninchen-Immunglobulins in den Kaninchen 1233—1236 würde zudem nicht das Postulat einer Dissoziation der Komplexe zur Voraussetzung haben.

Zusammenfassung

Um eine evtl. Dissoziation von Ag-Ak-Komplexen *in vivo* (Kaninchen) nachzuweisen, wurden 1. Komplexe injiziert, deren Ak-Teil aus speciesgleichen Tieren (Kaninchen) stammte, 2. Komplexe verwendet, deren Antigenkomponente in ihrer antigenen Wirksamkeit weitgehend bekannt ist (C-Streptokokken) und 3. nur zwei verschiedene Arten von Komplexen (Agglutinat und Präcipitat) geprüft.

Bei Injektion des Präcipitates konnten weder gegen den Komplex, noch gegen den Ag-Teil des Komplexes, noch gegen die Antikörperkomponente des Komplexes präcipitierende oder agglutinierende Antikörper nachgewiesen werden. Dagegen gelang es bei Verwendung eines Agglutinates aus inaktivierten C-Streptokokken und dem homologen, artspezifischen Antikörper in den Kaninchen gegen den Ag-Teil des Komplexes wirksame Antikörper festzustellen, während das Serum gegen den Komplex selbst keine Antikörper enthielt. Es scheint somit auch *in vivo* eine Dissoziation von Ag-Ak-Komplexen unter bestimmten Umständen vorzukommen.

Dissociation of Antigen-Antibody-Complexes *in vivo*

Summary

In order to prove an eventual dissociation of antigen-antibody complexes *in vivo*, a complex with an antibody component from the same animal species (Rabbit) was injected into rabbits. The antigen employed (group C streptococci) was one whose antigenic composition is well known. The investigation was limited to two types of complexes (precipitates and agglutinates).

Antibodies against the complex, the antigen part, or the antibody part could not be detected in the serum of rabbits injected with the precipitates. On the other hand, antibodies against the antigen part were detected in the serum of rabbits injected with agglutinates composed of inactivated group C-streptococci and homologous antiserum. No antibodies against the antigen-antibody complex were detected, however. It therefore appears that dissociation of an antigen-antibody complex can occur *in vivo* under certain conditions.

Literatur

- BACKHAUSZ, R., G. BATORY, E. HORVATH u. E. CHOLNOKY: Immunelektrophoretische Untersuchungen an Antiglobulinseren. Allergie u. Asthma **10**, 282—292 (1964).
- BENACERRAF, B., M. SEBESTYEN, and N. S. COOPER: The clearance of antigen-antibody complexes from the blood by the reticulo-endothelial system. J. Immunol. **82**, 131—137 (1959).
- COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. **91**, 1—13 (1950).
- DANYSZ, J.: Ann. Inst. Pasteur **16**, 331 (1902). Zit. nach KABAT und MAYER. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1964.
- HAFFERKAMP, O.: Ein tierexperimenteller Beitrag zur Immunopathologie der Speicheldrüsen. Virchows Arch. path. Anat. **335**, 298—322 (1962).
- , H. SCHÄFER, M. HENRIQUEZ, G. FINGER, F. MARTINEZ u. M. YOSHIDA: Experimentelle Untersuchungen zur pathogenen Bedeutung von spezifischen Iso- und Auto-Antikörpern nach Verbrennung. Virchows Arch. path. Anat. **337**, 65—87 (1963).

- HITZIG, W. H.: Zur quantitativen Bestimmung spezifischer Proteinfaktionen. *Int. Arch. Allergy* **19**, 145—167 (1961).
- ISLIKER, H. C.: The chemical nature of antibodies. *Advanc. Protein Chem.* **12**, 387—463 (1957).
- KABAT, E. A., and M. M. MAYER: Experimental immunochemistry. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 114—116 (1964).
- KELUS, A., and J. K. MOOR-JANKOWSKI: An iso-antigen (γ -BA) of mouse- γ -globulin present in inbread strains. *Nature (Lond.)* **191**, 1405—1406 (1961).
- KLEINSCHMIDT, W. J., and P. D. BOYER: Interaction of protein antigens and antibodies. II. Dissociation studies with egg albumin-anti-egg albumin precipitates. *J. Immunol.* **69**, 257—264 (1952).
- KRAUSE, R. M.: Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls. *Bact. Rev.* **27**, 369—380 (1963).
- , and M. McCARTY: Studies on the chemical structure of the streptococcal cell walls. II. The composition of group C cell walls and chemical basis for serologic specificity of the carbohydrate moiety. *J. exp. Med.* **115**, 49—62 (1962).
- MARSHALL, J. D., W. C. EVELAND, and W. SMITH: Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **98**, 898—900 (1958).
- MILGROM, F.: Anti-antibody and rheumatoid factor. *Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Mexico*: 1963, p. 335—340 (1964).
- MOODY, M. D., E. C. ELLIS, and E. L. UPDIKE: Staining bacterial smears with fluorescent antibody. IV. Grouping streptococci with fluorescent antibody. *J. Bact.* **75**, 553—560 (1958).
- RANTZ, L. A., and E. RANDALL: Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanf. med. Bull.* **13**, 290—291 (1955).
- SCHMIDT, S.: Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Toxin und Antitoxin bei fraktionierter Sättigung (Diphtherie und Tetanus). *Z. Immun.-Forsch.* **59**, 82—129 (1928).
- SCHULTZE, H. E.: Immunologie und Immunochemie der Antigen-Antikörperreaktionen. *Zbl. Bakt.* **184**, 324—341 (1962).
- SMITH, TH. B.: Clinical application of immunofluorescence. I. Grouping β -hemolytic streptococci. *J. Bact.* **89**, 198—204 (1965).
- SWIFT, H. F., A. T. WILSON, and R. C. LANCEFIELD: Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. *J. exp. Med.* **78**, 127—133 (1943).
- STERNBERGER, L. A., and D. PRESSMAN: A general method for the specific purification of antiprotein antibodies. *J. Immunol.* **65**, 65—73 (1950).
- TOZER, B. T., K. A. CAMMACK, and H. SMITH: Release of antigen and antibody from their complexes by aqueous carbon dioxide. *Biochem. J.* **84**, 80—93 (1962).
- TURNER, E. W., and P. D. BOYER: Interaction of protein antigens and antibodies. IV. Dissociation studies with diphtheria toxoid-antitoxin precipitates. *J. Immunol.* **69**, 265—271 (1952).
- WALTER, H., and H. ZIPPER: The metabolism of some antigen-antibody complexes in the rabbit. *J. Immunol.* **82**, 12—18 (1959).
- — Dissociation of some injected antigen-antibody complexes in vivo. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **103**, 221—223 (1960).
- WEIGLE, W. O.: Elimination of antigen-antibody complexes from sera of rabbits. *J. Immunol.* **81**, 204—213 (1958).

Dr. B. HEYMER
 Th. B. SMITH, Oberst a. D.
 Prof. Dr. O. HAVERKAMP
 Pathologisches Institut
 53 Bonn 1, Postfach