

# Untersuchungen über die Aktivierung von Serum-Proteasen durch Antigen-Antikörper-Reaktionen

*Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien*

E. Kaiser

Das Vorkommen von proteolytischen Fermenten im Blute (Serumprotease, Plasmin, Fibrinolytin) ist bereits seit langer Zeit bekannt (8). Seit den Untersuchungen von Delezene und Pazersky (9) über die Aktivierung der Serumprotease durch Chloroformbehandlung, haben eine Reihe von Autoren auf verschiedene andere Aktivierungsmöglichkeiten aufmerksam gemacht. So gelingt eine Aktivierung der Serumprotease durch Kaolin, Stärke, Agar, Pepton und verschiedene andere Mucopolysaccharide (vgl. 47). Weitere Aktivatoren, die von besonderem Interesse sind, finden sich im Gewebe und im Blute selbst (vgl. 1). Die kräftigsten Aktivatoren sind neben Chloroform, Streptokinase und Staphylokinase, die aus Kulturen von Streptokokken bzw. Staphylokokken isoliert wurden. Zusammenfassende Darstellungen über das Serum-Protease-System und seine Bedeutung finden sich bei Macfarlane und Biggs (31), Permin (33) und Astrup (1).

Im Jahre 1915 haben Jobling und Mitarbeiter (22, 23) sowie Bronfenbrenner (3—5) unabhängig voneinander über die Aktivierung der Serumprotease durch Antigen-Antikörper-Reaktionen berichtet. Ungar und Mitarbeiter (41—47) haben diese Versuche wieder aufgenommen und konnten neuerlich den Beweis erbringen, daß antikörperhaltiges Serum vom Meerschweinchen durch Zusatz von Antigen eine Steigerung der proteolytischen Aktivität erfährt. In jüngster Zeit hat Geiger (15, 16) diese Versuche beim Kaninchen mit gewissen Einschränkungen bestätigt. Im Gegensatz dazu haben Jemski und Mitarbeiter (21) keine eindeutige Aktivierung durch Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen können.

In diesem Zusammenhang muß auf die Untersuchungen von Seelich und Stockinger (38, 39) hingewiesen werden, die gezeigt haben, daß bei Verwendung eines Gewebsbreies von Hühnerembryonen als Antigen, das Serum der damit behandelten Meerschweinchen imstande ist, die Zellen einer Fibroblastenkultur vom Huhn aufzulösen, während das Serum unbehandelter Meerschweinchen diese Wirkung nicht besitzt. In Fortsetzung dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß sich diese Immunzytolyse durch Heparin und Dextransulfat aufheben läßt.

Im Anschluß an diese Befunde, die, wie noch später auszuführen sein wird, auch für das anaphylaktische Geschehen von Bedeutung sind, erschien uns eine

Reihe weiterer Versuche auf diesem Gebiet von Interesse. Wir haben unser Augenmerk in erster Linie auf die Aktivierbarkeit des Blut-Protease-Systems durch Antigenzusatz bei sensibilisierten Versuchstieren gerichtet und das genannte System sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bei Anwesenheit von Heparin näher untersucht. Weiters wurden einige Versuche mit dem Arthus-Phänomen durchgeführt.

## Methodik

1. *Immunisierung der Kaninchen.* Zur Immunisierung erhielten die verwendeten Kaninchen zweimal wöchentlich steigende Dosen von Rinderplasma Fraktion V (Armour) in 0,15 m NaCl. Die ersten Injektionen erfolgten intravenös, die restlichen Injektionen wurden intraperitoneal durchgeführt. Die Menge des injizierten Antigens bewegte sich zwischen 10 und 100 mg Fraktion V.

2. *Ermittlung des Titers.* Die Bestimmung der Antikörperbildung wurde mit einem einfachen Präzipitationstest durchgeführt. 0,5 ml Serumverdünnung 1 : 20 wurden mit 0,5 ml einer Antigenverdünnungsreihe überschichtet, wobei die entstandene Trübung an der Berührungsfläche (18 Stunden; 20°) als positive Reaktion gewertet wurde.

3. *Auslösung des Arthus-Phänomens.* Die Kaninchen bekamen in Abständen von 6 Tagen Injektionen von anfänglich 4 bis 5 ml Pferdeserum in die Haut. Nach der 3. Injektion wurden 0,5 bis 1,0 ml injiziert. Die Auswertung der Reaktion geschah rein makroskopisch.

4. *Ermittlung des Komplement-Index.* Nach dem Verfahren von Hoene und Sabel (20) wurde zuerst eine sogenannte „Normalkurve“ für die Bestimmung der Komplementaktivität aufgestellt, auf die die weiteren Bestimmungen bezogen wurden.

5. *Bestimmung der Serumprotease* (vgl. 10). Die Isolierung der Proteasefraktion erfolgte in der üblichen Weise durch Verdünnen des Serums mit Wasser und anschließender Einstellung des pH-Wertes mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,2. Die entstandene Euglobulinfällung wurde abzentrifugiert und in einem der Serummenge entsprechenden Teil Puffer (0,1 m Phosphat, pH 7,4 mit 0,15 m NaCl) gelöst.

Die Proteolysebestimmung wurde in folgender Weise durchgeführt: die in Puffer gelöste Euglobulinfällung wurde mit Casein als Substrat versetzt und 2 Stunden bei 37° inkubiert und anschließend nach Trichloressigsäurefällung das säurelösliche Tyrosin mit dem Folinschen Reagens bestimmt. Durch sofortige Enteiweißung eines zweiten Ansatzes wurde ein entsprechender Leerwert erhalten. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte in gamma Tyrosin/Stunde.

Teilweise wurde die Aktivierung mit Streptokinase (Varidase, Lederle) durchgeführt (5000 U/ml).

Die Antigenaktivierung der Sera wurde in folgender Weise durchgeführt: Serum wurde mit verschiedenen Mengen Antigen (in den meisten Fällen 2 mg Antigen/ml Serum; die optimale Menge mußte bei jedem Serum in einem Vorversuch bestimmt werden) versetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wurde die Isolierung der Protease durchgeführt. Bei den mit Pferdeserum immunisierten Kaninchen wurde identisch verfahren, wobei wiederum die optimale Antigenmenge in einem Vorversuch bestimmt werden mußte.

Zur Prüfung des Heparineinflusses auf die Proteaseaktivierung wurden zu oben erwähntem Ansatz verschiedene Mengen Heparin zugesetzt und anschließend identisch verfahren.

6. *Komplementinaktivierung.* Zur Komplementinaktivierung wurden die Sera 30 Minuten bei 56° inkubiert. Die Inaktivierung von C'3 wurde mit Zymosan (5 mg/ml Serum; 30 Min./37°) durchgeführt.

## Ergebnisse

Wie die Tabelle 1 zeigt besitzen die unbehandelten Sera nur eine geringe proteolytische Aktivität, was für Kaninchenblut charakteristisch ist. Die proteolytische Aktivität läßt sich aber durch geeignete Antigenzusätze zu antikörperhaltigem Serum signifikant steigern. Der Effekt ist bis zu einem gewissen Grade vom Titer des Serums abhängig. Das Serum des einen verwendeten Kaninchens zeigte nur einen Titer von 1 : 7500 als Ausdruck einer schlechten Antikörper-

Kaninchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Titer	0	0	0	7500	1 000 000	750 000	1 000 000
<i>Unbehandeltes Serum</i>							
proteolytische Aktivität ohne Streptokinase	3,8	5,0	4,1	4,5	5,0	5,9	7,0
proteolytische Aktivität mit Streptokinase	8,0	11,1	9,5	8,7	13,0	15,0	16,7
proteolytische Aktivität nach Antigenzusatz (0,2 mg/ml)	4,3	5,3	5,3	4,6	7,4	11,4	12,1
proteolytische Aktivität nach Heparinzusatz							
200 $\gamma$ /ml	—	5,0	—	—	—	—	6,5
250 $\gamma$ /ml	—	—	4,9	4,5	4,8	5,2	—
proteolytische Aktivität nach Antigenzusatz (0,2 mg/ml) bei Anwesenheit von Heparin (250 $\gamma$ /ml)	—	—	—	4,2	5,4	7,4	7,7
<i>Komplementfreies Serum</i>							
proteolytische Aktivität ohne Streptokinase	3,4	4,6	4,2	4,0	5,0	5,4	6,9
proteolytische Aktivität mit Streptokinase	6,7	10,8	8,3	7,5	10,2	12,8	15,8
proteolytische Aktivität nach Antigenzusatz (0,2 mg/ml)	—	—	—	—	5,2	5,7	7,4
<i>C'3-freies Serum</i>							
proteolytische Aktivität ohne Streptokinase	4,1	3,7	4,7	4,3	4,7	6,4	7,1
proteolytische Aktivität mit Streptokinase	7,3	8,3	8,2	7,8	10,3	13,8	13,1
proteolytische Aktivität nach Antigenzusatz (0,2 mg/ml)	—	3,8	—	—	5,4	5,9	7,4

Tab. 1: Aktivierung der Serumprotease durch Streptokinase und durch Zusätze von Antigen (unbehandeltes Serum, komplementfreies Serum und C'3-freies Serum).

bildung. In diesem Fall war praktisch keine Aktivierung durch den Antigenzusatz zu erzielen (Kan. Nr. 4). Bei Kaninchen Nr. 5 war trotz des hohen Titers nur eine geringgradige Aktivierung durch Antigenzusatz möglich. Es erübrigt sich zu erwähnen, daß die Sera nicht immunisierter Kaninchen durch Antigenzusatz keine Zunahme der proteolytischen Aktivität zeigten. Die Tabelle 1 zeigt weiter, daß die proteolytische Aktivität durch Streptokinase aktiviert werden kann. Diese Aktivierungsversuche ergaben durchwegs eine stärkere Aktivierung als der Antigenzusatz. Heparin hat in den von uns geprüften Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die proteolytische Aktivität des Serums. Die Aktivierung durch Antigenzusatz läßt sich jedoch durch geeignete Konzentrationen von Heparin hemmen. Die Tabelle 1 zeigt schließlich, daß das Komplementsystem für die proteolytische Aktivität des Serums belanglos ist. Eine Aktivierung von komplementfreiem bzw. C'3-freiem Serum durch Antigenzusatz ist hingegen nicht möglich. Die Wirkung der Streptokinase ist nur zu einem geringen Grade von der Anwesenheit eines intakten Komplementsystems abhängig. Komplementfreies bzw. C'3-freies Serum läßt sich ohne weiteres durch Streptokinase aktivieren, wenn auch die Wirkung im Vergleich zu den Kontrollen schwächer ist.

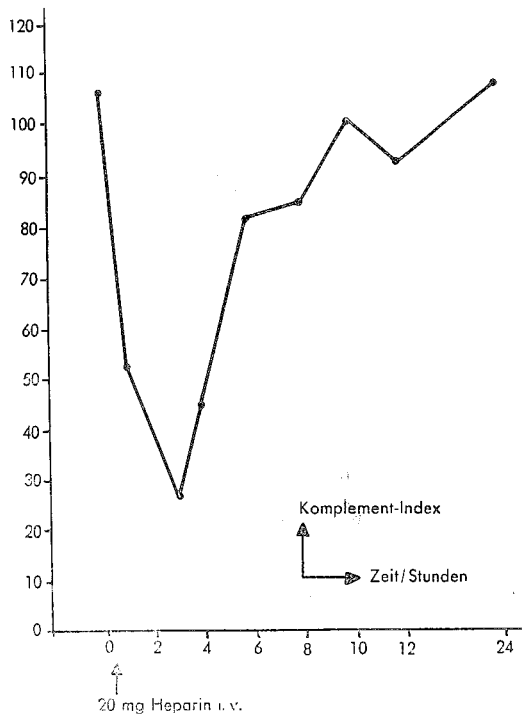


Abb. 1: Beeinflussung des Komplementtiters des Kaninchens durch Heparinisierung (Mittelwerte aus Versuchen an 10 Kaninchen).

Die folgende Abbildung 1 zeigt die Wirkung der Heparinisierung auf die Komplementaktivität. Nach Gaben von Heparin (20 mg i.v.) kommt es zu einem signifikanten Abfall der Komplementaktivität. Da im Kaninchenserum die C'2-Komponente in der niedrigsten Konzentration vorhanden ist, wurde durch die oben erwähnte Methode praktisch der C'2-Titer bestimmt.

Anschließend an diese Versuche haben wir den mit Fraktion V (Rinderplasma) immunisierten Kaninchen Heparin injiziert um festzustellen, in welcher Weise sich die proteolytische Aktivität und die Aktivierbarkeit der Serumprotease durch Streptokinase bzw. durch Antigenzusatz in vitro ändern. Zu diesem Zweck wurden vor der Heparinisierung und so oft als möglich nach der Heparininjektion Blutentnahmen durchgeführt und die proteolytische Aktivität mit und ohne Zusatz von Aktivatoren (Streptokinase bzw. Antigen) in vitro bestimmt. In der folgenden Abbildung 2 sind die Ergebnisse eines derartigen Versuches graphisch zusammengefaßt. Wie die erwähnte Abbildung zeigt, ändert sich die proteolytische Aktivität des Serums nach Injektion von 20 mg Heparin i.v. nur kaum; die zu entnehmenden Schwankungen entsprechen durchaus der physiologischen Schwankungsbreite. Die Aktivierung der Serumprotease durch Streptokinase ist nach der Heparinisierung nur wenig verändert, Antigenzusätze sind jedoch während der Heparinwirkung und während der Senkung des Komplementtiters praktisch ohne Effekt, d. h. es erfolgt trotz des hohen Titer des Kaninchenserums (1 : 1 000 000) keine Steigerung der proteolytischen Aktivität des Serums. Nach Abklingen der Heparinwirkung erreicht der Komplementtiter

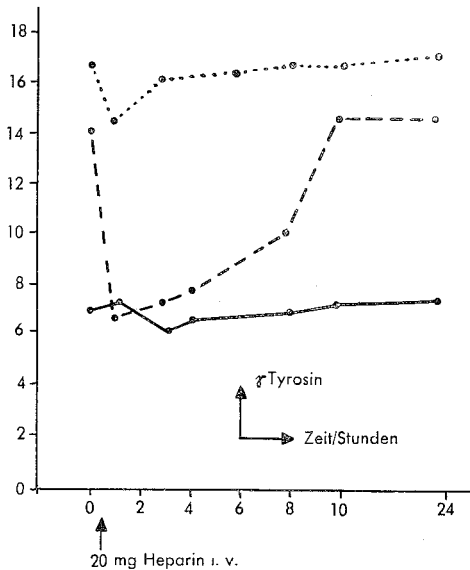


Abb. 2: Beeinflussung der proteolytischen Aktivität des Serums und der Aktivierung der Serumprotease durch Antigenzusatz bzw. durch Streptokinase, durch Heparinisierung des Versuchstieres (Kaninchen).

etwa den Ausgangswert (vgl. Abb. 1), und die Serumprotease läßt sich wieder durch Antigenzusatz aktivieren.

Die erwähnten Versuche haben gezeigt, daß es in vivo durch Heparinisierung gelingt den Komplementtiter zu senken und die Aktivierbarkeit von Serumproteasen durch Antigenzusätze zu verhindern. Wir haben nun im Anschluß an diese Befunde noch einige Versuche über die Beeinflussung des Arthus-Phänomens

Kaninchen Nr.	1. Inj.	2. Inj.	3. Inj.	4. Inj.	5. Inj.	6. Inj.	7. Inj.	8. Inj.
1	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N ∅	Ö + N +	Hep. Ö ∅ N ∅	
2	∅	∅	∅	Ö + N ++	Hep. Ö +/— N +/—	Hep. Ö +/— N ∅	Ö ++ N ++	
3	∅	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N ∅	Ö + N +	
4	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
5	∅	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N ∅	Ö + N +	Hep. Ö ∅ N ∅
6	∅	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N +/—	Ö + N +	Ö + N ++
7	∅	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N ∅	Ö + N +	Ö + N +
8	∅	∅	∅	∅	Ö + N +/—	Hep. Ö ∅ N ∅	Ö + N ++	Ö + N +
9	∅	∅	∅	∅	∅	∅	Ö +/— N ∅	Ö +/— N ∅
10	∅	∅	∅	∅	Ö + N +	Hep. Ö +/— N ∅	Hep. Ö ∅ N ∅	Ö + N +

Tab. 2: Zusammenstellung der Versuche mit dem Arthus-Phänomen.

Zeichenerklärung: ∅ keine Reaktion, Ö Ödem, N Nekrose, Hep. i.v. Injektion von 20 mg Heparin 2 Stunden vor der Injektion des Pferdeserums.

durch Heparin durchgeführt. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei insgesamt 8 von 10 Kaninchen ließ sich das Arthus-Phänomen durch Pferdeserum in eindeutiger Weise auslösen. Wir haben nach jener Injektion, nach der die erste positive Reaktion auftrat, 2 Stunden vor der nächsten Injektion 20 mg Heparin i.v. gegeben und anschließend das Pferdeserum in die Haut gespritzt. In allen auf diese Weise behandelten Kaninchen war eine deutliche Abschwächung der Reaktion festzustellen. Das initiale Ödem war nicht in allen Fällen zu unterdrücken; Nekrosen traten jedoch nach Behandlung mit Heparin nicht auf. Die nächste Injektion, vor der auf eine Gabe von Heparin verzichtet wurde, gab wiederum ein normales Arthus-Phänomen mit allen Charakteristika der Reaktion (initiales Ödem, Hämorrhagie, Nekrose).

Schließlich haben wir noch bei einer Reihe von Versuchstieren, die mit Pferdeserum immunisiert waren nach Heparinisierung die proteolytische Aktivität des Serums bzw. die Aktivierbarkeit durch Streptokinase und Antigenzusatz (Pferdeserum) geprüft. Die folgenden Abbildungen 3 und 4 zeigen die Ergebnisse von zwei typischen Versuchen (Kaninchen mit hohem Antikörpergehalt im Blut — Kaninchen mit niedrigem Antikörpergehalt im Blut). Im Prinzip stimmen diese Versuche mit den oben geschilderten überein. Nach Heparinisierung ist eine deutliche Abnahme der Aktivierbarkeit durch Antigenzusatz zu erkennen, die sich nach 24 Stunden normalisiert hat. Die Streptokinaseaktivierung nimmt nach der Heparinisierung nur geringgradig ab. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich eine wesentlich stärkere Aktivierung durch Streptokinase als durch den Antigenzusatz.

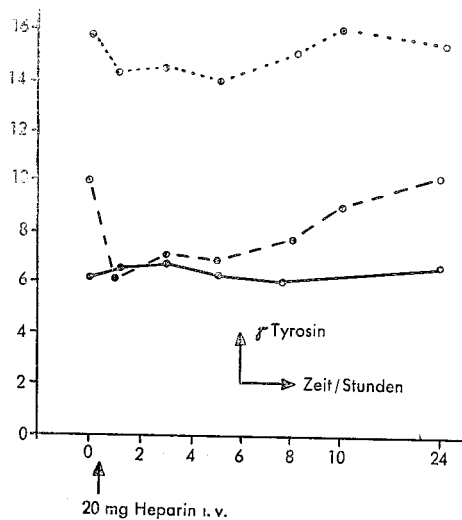


Abb. 3: Proteolytische Aktivität und Aktivierung der Serumprotease durch Antigenzusatz bzw. Streptokinase nach Heparinisierung eines Kaninchens mit hohem Antikörpergehalt im Blut.

Bei dem Kaninchen mit dem niedrigen Antikörpergehalt konnte keine Antigenaktivierung festgestellt werden. Die Streptokinaseaktivierung nahm bei diesem Versuchstier nach Heparinisierung etwas ab.

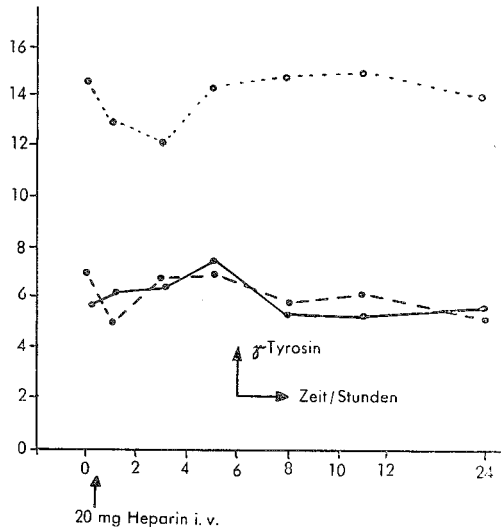


Abb. 4: Proteolytische Aktivität und Aktivierung der Serumprotease durch Antigenzusatz bzw. Streptokinase nach Heparinisierung eines Kaninchens mit niedrigerem Antikörpergehalt im Blut.

## Diskussion

Unsere Versuche haben gezeigt, daß für die Aktivierung der Serumprotease das Komplementsystem nicht unbedingt notwendig ist. Die geringgradige Abnahme der proteolytischen Aktivität des Serums nach totaler Komplementaktivierung führen wir weniger auf einen Komplementmangel, als vielmehr auf eine gewisse Inaktivierung der Serumprotease durch die halbstündige Behandlung des Serums bei  $56^{\circ}$  zurück. Sowohl bei heparinisierten als bei nicht heparinisierten Tieren zeigte die Aktivität der im Blut vorhandenen Proteasen nur geringe Variationen, die als Ausdruck einer physiologischen Schwankung gedeutet werden können. In vitro war Heparin in den von uns geprüften Konzentrationen ohne Einfluß auf die proteolytische Aktivität des Serums. Die Aktivierung der Serumprotease durch Streptokinase ist von der Komplementaktivität des Serums ziemlich unabhängig. Es ergab sich wohl bei allen Versuchen mit komplementfreiem Serum eine Senkung der Aktivierung durch Streptokinase, die jedoch bei statistischer Auswertung als nicht signifikant erschien. Im Gegensatz dazu ist für die Aktivierung der Serumprotease sensibilisierter Kaninchen (Fraktion V aus Rinderplasma bzw. Pferdeserum) durch Antigenzusatz das Komplement-



system unbedingt notwendig. Sera bei denen das Komplementsystem völlig ausgeschaltet war, ließen sich durch Antigenzusatz nicht aktivieren. C'3-freies Serum läßt sich ebenfalls durch den Zusatz von Antigen nicht aktivieren. Ebenso verhält sich das Serum sensibilisierter, heparinisierter Kaninchen.

Unsere Versuche zeigen somit, daß scheinbar ein wesentlicher Unterschied zwischen der Aktivierung der Serumprotease durch Streptokinase bzw. durch Antigenzusatz besteht. Während die Streptokinasewirkung weitgehend komplementunabhängig zu sein scheint, wie dies auch R a t n o f f (34) und U n g a r und M i s t (47) annehmen, ist dies für die Aktivierung durch Antigenzusatz nicht der Fall. Welche Mechanismen hier im einzelnen eine Rolle spielen ist bisher nicht völlig geklärt.

Die Versuche am sensibilisierten, heparinisierten Kaninchen haben, wie bereits erwähnt, eine deutliche Senkung der Komplementaktivität ergeben, was im übrigen bereits seit längerer Zeit bekannt ist (6, 12, 14, 25, 26, 27, 40). Hand in Hand mit der Komplementinaktivierung verschwindet die Möglichkeit einer Aktivierung der Serumprotease durch den Antigenzusatz. Wie die Abbildung 1 zeigt erreicht der Komplementtiter 24 Stunden nach unserer Heparindosierung wieder etwa seinen Ausgangswert. Nach dieser Zeit läßt sich die Serumprotease durch Antigenzusatz wieder anstandslos aktivieren.

Weiter war es auffallend, daß mit Streptokinase stets eine stärkere Aktivierung möglich war, als durch Antigenzusatz. Es scheint also nicht möglich zu sein, die gesamte vorhandene inaktive Protease durch Antigenzusatz zu aktivieren. Man könnte annehmen, daß die Streptokinase selbst eine gewisse proteolytische Wirkung besitzt, die sich unter Umständen zur Proteasewirkung des Serums addieren könnte. Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß bei Verwendung von Casein als Substrat kein säurelösliches Tyrosin gebildet wird. Die Anwesenheit von inaktiven Proteasen im Substrat läßt sich bei Verwendung von Casein a priori ausschließen und ist nur für das Substrat Fibrinogen gegeben, von dem bekannt ist, daß es stets gewisse Mengen von Profibrinolysin gebunden enthält. Im übrigen war das von uns verwendete Casein, in erster Linie um die Leerwerte so gering wie möglich zu halten, mehrfach umgefällt und schließlich erhitzt worden. Die Entscheidung der Frage ob es sich bei der Aktivierung der Serumprotease durch Streptokinase bzw. durch Antigenzusatz zu einem sensibilisierten Serum um verschiedene Proteasevorstufen handelt, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Wir neigen eher zu der Auffassung, daß identische Proteasevorläufer im Serum aktiviert werden. Die schwächere Aktivierbarkeit muß wohl in erster Linie darauf zurückgeführt werden, daß es wesentlich schwieriger ist eine Aktivierung durch Antigenzusatz zu bekommen, als durch Streptokinase. Die Streptokinasewirkung ist nämlich wesentlich weniger von der Konzentration abhängig als dies beim Antigenzusatz der Fall ist.

Die erwähnten Befunde besitzen insbesondere nach den letzten Untersuchungen von U n g a r (41—47) als Modelle für das anaphylaktische Geschehen eine gewisse Bedeutung. Zur Erklärung des Mechanismus des anaphylaktischen Reaktionsablaufes sind eine Reihe von Theorien aufgestellt worden. F r i e d b e r g e r (13) beobachtete 1909, daß Serum sensibilisierter Tiere durch Zusatz von Antigen toxische Wirkungen bekommt. Dieser Effekt wird von dem genannten Autor auf die Bildung eines Anaphylatoxins zurückgeführt, womit er die Beziehungen zum anaphylaktischen Schock aufzeigen wollte. Wird ein derartiges Serum einem normalen Tier injiziert, so kommt es zur Ausbildung von anaphylaktischen Erscheinungen. Aber noch wesentlich weniger spezifische Behandlung des Serums (Schütteln mit Kaolin, Agar, Stärke) führt ebenfalls zur Ausbildung dieses Anaphylatoxins (2). Ursprünglich wurde die Wirkung so gedeutet, daß die toxischen Substanzen aus dem Antigen auf enzymatischem Wege gebildet werden. Andere Autoren nahmen im Gegensatz dazu an, daß durch Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. durch andere Effektoren eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Serum-Protease und Serum-Protease-Inhibitor eintritt, wodurch eine Aktivierung der Serumprotease erfolgt, die Serum- und Gewebs-Eiweißkörper angreift (vgl. 7). Im Gegensatz zu dieser „*humoralen Theorie*“ führten Versuche von D a l e (7) zur Aufstellung der sogenannten „*zellulären Theorie*“. D a l e (7) hat erstmalig auf die Rolle des Histamins bei anaphylaktischen Erscheinungen aufmerksam gemacht, wobei die Histaminfreisetzung in der Weise erklärt wird, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Zellschädigung führt, wobei Histamin gebildet wird. Die D a l e schen Versuche gelingen aber auch, wenn isolierte, völlig blutfrei gewaschene Meerschweinchengewebe verwendet werden, wodurch scheinbar erwiesen war, daß Serum bei dieser Reaktion belanglos ist. Weiter war durch dieses Experiment auch die Annahme eines enzymatischen Prozesses recht unwahrscheinlich geworden. Die Befunde von J o b l i n g (22, 23) und B r o n f e n b r e n n e r (3—5) auf die bereits eingangs hingewiesen wurde, gewannen erst wieder an Interesse, als R o c h a e S i l v a (35—37) zeigen konnte, daß Injektionen von Trypsin ebenfalls zur Freisetzung von Histamin und zur Ausbildung anaphylaktischer Erscheinungen führen. R o c h a e S i l v a (35—37) konnte weiter zeigen, daß sowohl im anaphylaktischen Schock als auch beim Peptonschock eine Aktivierung der Plasma-Protease stattfindet. Diese „*proteolytische Theorie*“ der Anaphylaxie hat in letzter Zeit vor allem durch die Untersuchungen von U n g a r (41—47) weitere Bestätigung erfahren. Der letztgenannte Autor hat den Einfluß von Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. von anaphylaktoid wirksamen Substanzen auf Protease-Aktivierungen untersucht und konnte zeigen, daß diese sowohl durch Antigen-Antikörper-Reaktionen als auch durch anaphylaktoid wirksame Substanzen gefördert werden kann. Nach U n g a r (41—47) verläuft beim anaphylaktischen Geschehen der folgende Reaktionsmechanismus ab: die Antigen-

Antikörper-Reaktion wirkt über eine Zyto- bzw. Serokinase auf einen Proaktivator, der in einen aktiven Aktivator umgewandelt wird, der aller Wahrscheinlichkeit nach eine Aminopeptidase ist. Der Aktivator (Aminopeptidase?) wandelt die inaktive Protease in eine aktive Form um, die ihrerseits wieder im Gleichgewicht mit einem Protease-Inhibitor steht. Die Protease entfaltet schließlich ihre Wirkung auf verschiedene Proteine, wobei Peptide und Histamin freigesetzt werden, die zur Ausbildung der Gewebsreaktion führen. Die folgende Abbildung 5 stellt ein Schema dar, das in etwas modifizierter Weise einer Arbeit von U n g a r (43, 44) entnommen ist, und die Verhältnisse in übersichtlicher Weise charakterisiert.

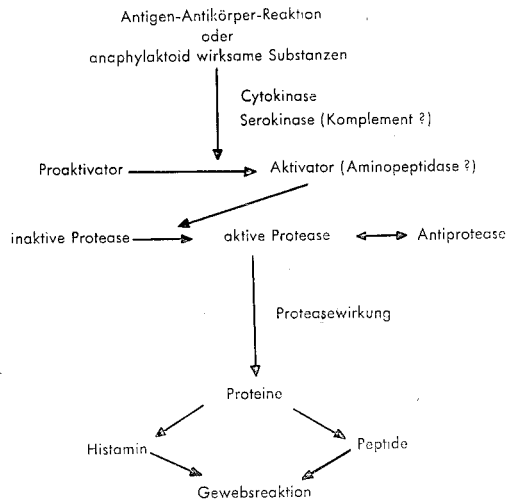


Abb. 5: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes beim anaphylaktischen Geschehen nach U n g a r (23).

Unsere eigenen Versuche mit Heparin haben gezeigt, daß die Proteaseaktivierung, im speziellen Fall der Serum-Protease, durch Antigenzusatz zum Serum sensibilisierter Versuchstiere, durch Heparin gehemmt werden kann. Wenn sich auch nach Angaben von U n g a r (45) die Serokinase und Zytokinase voneinander unterscheiden, so dürften unsere Versuche doch als Modelle für anaphylaktische Prozesse gelten, die bekanntlich auch durch geeignete Heparinkonzentrationen gehemmt werden können (11, 32, 17, 28, 18, 30, 29, 48). Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die bereits zitierten Befunde von S e e l i c h und S t o c k i n g e r (35, 36), die in der Gewebekultur eine Hemmung der zytotoxischen Wirkung spezifischer Antisera durch Heparin nachweisen konnten. Unsere eigenen Versuche mit dem Arthus-Phänomen (lokalisierte anaphylaktische Reaktion) haben ergeben, daß sich diese anaphylaktische Reaktion ebenfalls durch Heparin hemmen läßt. Derartige Untersuchungen wurden bereits

1948 von Gregoire (18) durchgeführt, der die hemmende Wirkung des Heparins in erster Linie durch die Antikoagulanswirkung erklärt hat. Auf Grund unserer eigenen Untersuchungen glauben wir uns zu dem Schluß berechtigt, daß neben der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Heparins, deren Bedeutung bei der Abschwächung des Arthus-Phänomens außer Zweifel steht, noch zusätzlich eine Hemmung der Aktivierung von Proteasen im Gewebe durch Heparin eintritt. Wir nehmen an, daß die Reaktion des Antigens mit dem Antikörper im Gewebe bei Gegenwart von Heparin nicht zur Aktivierung von Gewebsproteasen führt und daß dies ein Grund für das Ausbleiben der positiven Arthus-Reaktion ist. Im übrigen muß hier nochmals darauf hingewiesen werden, daß sich die Reaktion nicht immer vollständig unterdrücken ließ (vgl. 18). Vor allem beobachteten wir bei einer Reihe von Versuchen das Auftreten des initialen Ödems, das als sicheres Zeichen eines anaphylaktischen Geschehens gewertet werden muß, wenn auch diese Reaktion im Vergleich mit dem nicht heparinisierten Tier immer wesentlich abgeschwächt war. Die normalerweise folgenden Hämorrhagien und Nekrosen konnten jedoch in allen Versuchen durch Heparinisierung verhindert werden.

Wir glauben aus diesen Versuchen den Schluß ziehen zu können, daß für die Auslösung des Arthus-Phänomens und für anaphylaktische Prozesse im allgemeinen die Antigen-Antikörper-Reaktion als auslösendes Moment für die Aktivierung von Gewebsproteasen von Bedeutung ist. Diese Proteaseaktivierung bewirkt ihrerseits wiederum eine Freisetzung von Histamin. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, daß im Gewebe Histamin sicher auch noch auf eine andere Art und Weise gebildet werden kann. Wie diese Histaminfreisetzung im einzelnen verläuft, ist nicht geklärt, ja man weiß nicht einmal genau, wie das Histamin im Organismus gebunden ist. Es wäre dementsprechend verfrüht, ein abschließendes Urteil über die genauen einzelnen Abläufe beim anaphylaktischen Geschehen zu geben. Als gesichert kann nur gelten, daß proteolytische Prozesse im Zusammenhang mit dem Komplementsystem (vgl. 38, 39) des Organismus eine Rolle bei der anaphylaktischen Reaktion spielen, eine Reaktion, die durch weitere nicht näher bekannte Reaktionsabläufe unterstützt wird.

Was uns in diesem Zusammenhang als besonders wichtig erscheint, ist die Tatsache, daß Heparin neben seiner antikoagulierenden Wirkung, noch eine Reihe anderer Wirkungen besitzt, die bisher viel zu wenig beachtet wurden (vgl. 19, 24).

### Zusammenfassung

Es wurde an Hand von Versuchen in vivo und in vitro gezeigt, daß Zusätze von Antigen zum Serum sensibilisierter Kaninchen zu einer Aktivierung der Serumprotease führen, wodurch verschiedene ältere Untersuchungen, insbeson-

dere aber die Befunde von U n g a r zumindest teilweise bestätigt wurden. Für die erwähnte Antigenaktivierung der Serumprotease ist das Komplementsystem von ausschlaggebender Bedeutung; komplementfreies oder C'3-freies Serum läßt sich durch Antigenzusatz nicht aktivieren. Die Antigenaktivierung läßt sich durch Heparin aufheben.

Die mutmaßliche Bedeutung der Versuche als Modell für das anaphylaktische Geschehen wird diskutiert und an Hand von Versuchen mit dem Arthus-Phänomen (lokalisierte anaphylaktische Reaktion) erläutert.

### Summary

It has been demonstrated by in vivo and in vitro experiments that addition of antigen to the serum of sensitized rabbits activates proteases of this serum. Several old experiments in this respect and the results of U n g a r could at least partly be confirmed. The activation of the protease system of blood depends chiefly on the complement system. Serum free of complement or serum lacking C'3 cannot be activated by the addition of antigen. The activating effect of antigen is inhibited by heparin.

The possible significance of the experiments as models for anaphylactic reactions is discussed and illustrated by some experiments with the Arthus phenomenon (localized anaphylactic reaction).

### Résumé

Des expériences in vivo et in vitro ont démontré que l'addition d'antigène au sérum de lapins sensibilisés active les protéases de ce sérum. Des expériences plus anciennes ainsi que les résultats de Ungar ont pu être confirmés. L'activation du système protéase dépend en grande partie du complément. Un sérum sans complément ou sans C'3 ne peut pas être activé par l'addition d'antigène. L'Héparine inhibe l'action de l'antigène.

La valeur hypothétique de ces expériences comme modèle de réactions anaphylactiques est discutée et illustrée par quelques démonstrations du phénomène d'Arthus (réaction anaphylactique localisée).

### Littérature

- (1) A s t r u p, T.: Fibrinolysis in the organism. *Blood* 11: 781 (1956).
- (2) B o r d e t, J.: Gélose et anaphylatoxine. *Compt. rend. soc. biol.* 74: 877 (1913).
- (3) B r o n f e n b r e n n e r, J.: The mechanism of the Abderhalden reaction. *Studies on immunity I. J. exptl. Med.* 21: 221 (1915).

- (4) Bronfenbrenner, J.: The nature of anaphylatoxin. Studies on immunity II. J. exptl. Med. 21: 480 (1915).
- (5) Bronfenbrenner, J.: Mechanism of desensitization. Ann. Allergy 2: 472 (1944).
- (6) Büsing, K. H. und Beller, F. K.: Der Einfluß von Antikoagulantien auf die Systeme der Blutgerinnung und Komplementfunktion. Z. Immunitätsforsch. 112: 202 (1955).
- (7) Dale, H. H.: Anaphylaxis. Bull. Johns Hopk. Hosp. 31: 310 (1920).
- (8) Dastre, A.: Fibrinolyse dans le sang. Arch. physiol. 25: 661 (1893).
- (9) Delezenne, C. et Pozerski, E.: Action protéolytique du sérum sanguin préalablement traité par le chloroforme. Compt. rend. soc. biol. 55: 690 (1903).
- (10) Downie, G. R. and Clifton, E. E.: A method for assay of serum proteolytic activity. Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med. 71: 138 (1949).
- (11) Doxiades, L. und Lemke, H.: Beeinflussung des anaphylaktischen Shocks beim Meerschweinchen durch Heparin. Klin. Wschr. 16: 1061 (1937).
- (12) Ecker, E. E. and Gross, P.: Anticomplementary power of heparin. J. infect. Dis. 44: 250 (1929).
- (13) Friedberger, E.: Weitere Mitteilung über Anaphylaxie. Z. Immunitätsforsch. 3: 692 (1909).
- (14) Fuchs, H. J. und Hartmann, E.: Über proteolytische Fermente im Serum. X. Die Bedeutung des Komplements bei der Blutgerinnung. Z. Immunitätsforsch. 58: 1 (1928).
- (15) Geiger, W. B.: Protease activation in immune reactions. J. Immunol. 68: 11 (1952).
- (16) Geiger, W. B.: Involvement of a complementlike factor in the activation of blood protease. J. Immunol. 69: 597 (1952).
- (17) Gentle, H. and Holmgren, H.: Investigation of a possible inhibitor action of heparin upon certain experimental allergic dermatoses. Acta dermativenerologica 31: 322 (1951).
- (18) Gregoire, C.: Influence de l'héparine sur les réactions d'anaphylaxie locale cutanée (phénomène d'Arthus). Arch. int. pharmacodyn. 72: 76 (1946).
- (19) Halse, T.: Heparin und Heparinoide, Dicumarol. Hirzel, Stuttgart, 1950.
- (20) Hoene, R. und Sabel, G.: Das Verhalten der hämolytischen Komplementfunktion im Hinblick auf die Plasmaeiweißkörperbildung bei der menschlichen Tuberkulose. Z. inn. Med. 7: 389 (1952).
- (21) Jemski, J. W., Flick, J. A. and Stinebring, W. R.: Studies on the activation of serum protease by an antigen-antibody system. J. exper. Med. 97: 439 (1953).
- (22) Jobling, J. W. and Petersen, W. F.: Serotoxin. Studies on ferment action XIV. J. exptl. Med. 19: 480 (1914).
- (23) Jobling, J. W., Eggstein, A. A. and Petersen, W. F.: Serum proteases and the mechanism of the Abderhalden reaction. J. exptl. Med. 21: 239 (1915).
- (24) Jorpes, E.: Heparin in the treatment of thrombosis. London, 1946.
- (25) Kaiser, E.: Über die antikomplementäre Wirkung eines Trischwefelsäureesters der Hyaluronsäure. Z. Immunitätsforsch. 109: 202 (1952).
- (26) Kaulla, K. N. v. und Husemann, E.: Über Beziehungen der Molekülgröße und -gestalt zur physiologischen Wirkung. Experientia 2: 223 (1946).
- (27) Klein, P.: Über den Angriffspunkt einiger Komplementgifte aus der Klasse der Antikoagulantien. Klin. Wschr. 34: 333 (1956).
- (28) Kosaka, S.: Nonspecific alteration of the local inflammatory reaction I. and II. Okayama Igakkai Zassi 52: 2808 (1940); 53: 21 (1941) (ref. in Chem. Abstr. 37: 2058/59 [1943]).
- (29) Kyes, O. and Strauser, E. R.: Heparin inhibition of anaphylactic shock. J. Immunol. 12: 419 (1926).
- (30) Lecomte, J. and Hugues, J.: Inhibitory action of heparin on the Arthus phenomenon. Int. Arch. Allergy 5: 367 (1954).
- (31) Macfarlane, R. G. and Biggs, R.: Fibrinolysis. Its mechanism and significance. Blood 3: 1167 (1948).

- (32) Marx, R., Bayerle, H. und Skibbe, I.: Über ein Komplement und Prothrombin mit besonderer Berücksichtigung der Antithrombotika 3,3'-methylen-di-(4-oxycumarin) und Heparin. *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.* **206**: 334 (1949).
- (33) Permin, P. M.: Fibrinolytische Enzymer. Thesis. Univ. of Copenhagen. 1949.
- (34) Ratnoff, O. D.: Proteolytic enzyme in human plasma. III. Some factors controlling the rate of fibrinolysis. *J. exptl. Med.* **88**: 401 (1948).
- (35) Rocha e Silva, M.: Activation by polysaccharides of a histamine liberator (anaphylatoxin) in blood plasma. In "The mechanism of inflammation". Acta Inc. Montreal S. 237 (1953).
- (36) Rocha e Silva, M.: Histamine. Its role in anaphylaxis and allergy. Thomas, Springfield (1955).
- (37) Rocha e Silva, M.: Histamine release by naturally occurring substances. In „Histamine“ J. A. Churchill, London S. 124 (1956).
- (38) Seelich, F. und Stockinger, L.: Über die Hemmung der zytotoxischen Wirkung spezifischer Antisera durch Heparin. *Naturwiss.* **41**: 376 (1954).
- (39) Seelich, F. und Stockinger, L.: Die zytotoxische Wirkung spezifischer Antisera auf Gewebekulturen. *Z. Immunitätsforsch.* **113**: 271 (1956).
- (40) Seidenstücker, H.: Über die Komplement- und Prothrombinwirkung in ihrer Abhängigkeit von Heparin und Vitamin K. *Z. Immunitätsforsch.* **106**: 492 (1949).
- (41) Ungar, G.: Release of proteolytic enzymes in anaphylactic and peptone shock in vitro. *Lancet I*: 708 (1947).
- (42) Ungar, G.: Inflammation and its control. *Lancet II*: 742 (1952).
- (43) Ungar, G.: Biochemical mechanism of the allergic reaction. *Int. Arch. Allergy* **4**: 258 (1953).
- (44) Ungar, G.: Mechanism of histamine release. In "Histamine" J. A. Churchill, London, S. 431 (1956).
- (45) Ungar, G. and Damgaard, E.: Tissue reactions to anaphylactic and anaphylactoid stimuli; proteolysis and release of histamine and heparin. *J. exptl. Med.* **101**: 1 (1955).
- (46) Ungar, G., Damgaard, E. and Hummel, F. P.: Activation of profibrinolysin by antigen-antibody reaction and by anaphylactoid agents; its relation to complement. *J. exptl. Med.* **98**: 291 (1953).
- (47) Ungar, G. and Mist, S. H.: Observations on the release of serum fibrinolysin by specific antigen, peptone and certain polysaccharides. *J. exptl. Med.* **90**: 39 (1949).
- (48) Williams, O. B. and Carr, F. R. v. d.: The effect of heparin on anaphylactic shock in guinea pigs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.* **24**: 798 (1927).