

sicht der Vorgänge und Veränderungen eines Kalilagers, wobei die geologischen Verhältnisse im östlichen Süduhrzrevier zugrunde gelegt wurden und wobei für die primäre Ausbildung des Kalilagers einheitlich ein kieseritischer Halit-Carnallit angenommen worden ist. Es wird sich empfehlen, in sorgfältiger Kleinarbeit diesen Beziehungen weiter nachzuspüren.

#### Summary

The so-called "Pegmatitanhydrite" of the Germanic Permian formation owes its name to a peculiar graphic intergrowth of anhydrite with halite. As early as 1907 ZIMMERMANN recognized that this arrangement is the result of an extended pseudomorphic replacement. However ZIMMERMANN does not name a primitive mineral.

Later on similar pseudomorphs were found also in other anhydrite beds of the huge series of marine evap-

orites. The authors examined a numerous collection, representing all important beds. The results of goniometric measurements and morphological comparisons showed them in all cases to be pseudomorphs of porphyroblasts of gypsum.

The common distribution of shape relics of this kind is remarkable, especially considering the many different possibilities for their genesis and conservation. We are thus forced to suppose that calcium sulfate was precipitated as gypsum, even from saturated solutions of sodium chloride. The conversion of gypsum to anhydrite occurred only when the sediment was buried deeply by later rocks. The water set free by the different, and to a certain extent very thick, beds of anhydrite may have caused important changes upon the covering salt rocks. Especially rather sudden changes of chemical and mineralogical composition of the potassium salt bed (Kalilager), may thus be easily explained. As is known, such changes can lead to a complete lack of potassium (Ver- taubungen).

## Fortschritte in der Isolierung und Untersuchung der Blutproteine

Von R. STRÄSSLE, Basel<sup>1</sup>

#### Einleitung

Die von COHN und seiner Schule während der vergangenen Kriegsjahre ausgearbeiteten Verfahren zur Isolierung einer grossen Zahl von Blutproteinen<sup>2</sup> bildeten das Ergebnis jahrelanger Untersuchungen an einfacheren Systemen, nämlich an einzelnen Aminosäuren und Peptiden sowie an Gemischen dieser Stoffe<sup>3</sup>. Eine zusammenfassende Arbeit von COHN über Entdeckung, Eigenschaften sowie klinische Verwendbarkeit einzelner Blutproteine erschien im Jahre 1947 in dieser Zeitschrift<sup>4</sup>, und zwar befasste sich der Autor im wesentlichen mit den Plasmaproteinen, weniger mit den Blutkörperchen. Die intensive Entwicklung seit dieser Zeit hat auf dem gesamten Gebiet bedeutende Fortschritte gebracht, und die Cohnsche Schule ist auch weiterhin darin führend geblieben. Zwar erstrecken sich diese Fortschritte weniger auf die Isolierung neuer, noch unbekannter Blutproteine als vielmehr auf die Verbesserung der Methoden, so dass viele der damals nur schwierig oder unzugänglichen Komponenten heute in nativer Form für Forschung und klinische

Erprobung bereitstehen. Es ist vielleicht etwas verfrüht, die klinischen Ergebnisse, welche mit Hilfe der nach neueren Methoden isolierten Blutproteine erhalten wurden, bereits heute richtig abschätzen zu wollen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher im wesentlichen die methodischen Neuerungen, die von der Cohnschen Arbeitsgruppe auf dem Gebiete der Blutfractionierung entwickelt wurden, erwähnt werden. Diesen Ausführungen sind einige grundlegende, theoretische Erläuterungen vorangestellt.

#### Zur Theorie der Cohnschen Fraktionierung

Um aus einem Proteingemisch einzelne Proteine in reiner Form isolieren zu können, ist zunächst eine Auftrennung in Hauptfraktionen nötig, deren Unteraufteilung in vielen Fällen reine Komponenten liefert. Die präparative Auftrennung in Hauptfraktionen geschieht heute meist nach zwei Verfahren:

- Fraktionierte Aussalzung bei hoher Neutralsalzkonzentration.
- Fraktionierte Fällung bzw. Extraktion bei sehr niedrigen Salzkonzentrationen unter Zusatz wasserlöslicher, organischer Lösungsmittel und unter genauer Kontrolle von pH, Ionenstärke, Temperatur und Konzentration der Zusätze.

Die Aussalzmethode wurde auf empirischer Grundlage bereits im 18. und 19. Jahrhundert entwickelt, doch ist ihre Anwendbarkeit nicht auf Proteine be-

<sup>1</sup> Wissenschaftliche Laboratorien der Hoffmann La Roche & Co., AG., Basel.

<sup>2</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>3</sup> E. J. COHN und J. T. EDWARDS, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Amer. Chem. Soc. Monograph Series, Nr. 90 (Reinhold Publ. Corp., New York 1943).

<sup>4</sup> E. J. COHN, Exper. 3, 125 (1947).

schränkt. Auch ungeladene Moleküle lassen sich aussalzen, und der Effekt hängt in erster Linie von der Molekülgrösse, dann aber von Natur und Konzentration der zur Ausfällung verwendeten Neutralsalze ab. Bereits HOFMEISTER<sup>1</sup> erkannte gewisse Regelmässigkeiten zwischen Ionenart und löslichkeitsverminderner Wirkung, doch bleibt es das Verdienst von COHN<sup>2</sup>, durch Aufstellung seiner Aussalzgleichung die Methode auf eine sichere theoretische Grundlage gestellt zu haben. Das Verfahren besitzt jedoch den Nachteil, dass meist nur eine Variable, nämlich die Neutralsalzkonzentration, verändert wird, wodurch die Zahl der Trennmöglichkeiten bedeutend eingeschränkt wird. Zudem ist die Methode zur Trennung sehr ähnlicher Proteine wenig geeignet, da sie auf geringfügige strukturelle Unterschiede nicht in besonders empfindlicher Weise anspricht.

Im Gegensatz dazu ist der Arbeitsbereich in den besonders von COHN und seiner Schule entwickelten Methoden in das Gebiet sehr niedriger Neutralsalzkonzentrationen verlegt. Hier kommt der individuelle Ladungscharakter in einer für jedes Protein spezifischen Weise zur Geltung und wird nicht durch eine hohe Salzkonzentration maskiert, wie dies in der Aussalzmethode der Fall ist. Die Abhängigkeit der Löslichkeit vom Ladungszustand der Proteine wurde erst durch die Entwicklung der theoretischen Grundlagen verständlich. MELLANBY<sup>3</sup> sowie LEWIS und RANDALL<sup>4</sup> führten den Begriff der Ionenstärke ein:

$$\text{Ionenstärke } \Gamma/2 = 1/2 \sum c_i z_i^2$$

$c_i$  = Konzentration der verschiedenen Ionenarten in Gramm-Ion/1000 g Lösungsmittel;

$z_i$  = Valenz der entsprechenden Ionen.

Diese ist verschieden von der Molarität, wie aus Tabelle I hervorgeht:

Tabelle I

Vergleich von Molarität und Ionenstärke verschiedener Salze

Salz	Molarität	Ionenstärke
NaCl . . . . .	0,1	0,1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . .	0,1	3 × 0,1
MgSO <sub>4</sub> . . . .	0,1	4 × 0,1
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . . . .	0,1	6 × 0,1
Fe <sup>+3</sup> -Zitrat . . .	0,1	9 × 0,1
Mg <sub>3</sub> (BO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . .	0,1	15 × 0,1

Die Ionenstärke repräsentiert somit die Gesamtladung aller in Lösung anwesenden Anionen und Kationen, und ihre Berücksichtigung erlaubt die Erfassung des gesamten ionalen Ladungeffektes auf die Dissoziation

der sauren und basischen Gruppen im Proteinmolekül. DEBYE<sup>1</sup> hat in seiner Gleichung der interionischen Kräfte dem Begriff der Ionenstärke vertiefte theoretische Bedeutung gegeben, und schliesslich haben SCATCHARD und KIRKWOOD<sup>2</sup> die Gleichung von DEBYE-HÜCKEL auf dipolare Ionen erweitert und so die Wechselwirkungen zwischen Neutralsalzen, Aminosäuren, Peptiden und Proteinen theoretisch fundiert. Damit waren grundlegende neue Erkenntnisse gewonnen: Die Löslichkeit der Proteine hängt ausserordentlich stark von ihrem Ladungszustand ab, und zwar ist, genauer ausgedrückt, der Logarithmus der Löslichkeit vom Quadrat des Dipolmomentes bzw. von elektrischen Momenten höherer Ordnung abhängig. Das Moment wird aber in empfindlicher Weise durch kleinste pH-Änderungen in der Lösung verändert, woraus folgt, dass die Löslichkeit eines Proteins auf minimale pH-Schwankungen in stark vergrössertem Maßstabe anspricht. Daneben wird sie von der Art und Konzentration aller in Lösung anwesenden Ionen, dipolaren Ionen und Proteine sowie von der herrschenden Dielektrizitätskonstante beeinflusst. Es ist leicht, einzusehen, dass ein System mit fünf oder mehr Variablen eine viel grössere Zahl von Trennmöglichkeiten bietet als die Aussalzmethode, wobei allerdings die zweckmässige Wahl und genaue Kontrolle der verschiedenen Variablen von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer Fraktionierung sind. Das Grundprinzip solcher Fraktionierungen besteht in der Ausfällung eines Proteins in der Nähe seines isoelektrischen Punktes, wo es minimale Löslichkeit aufweist, die durch Alkoholzusatz in der Kälte (zwecks Vermeidung von Denaturierung) weiter herabgesetzt wird. Da die isoelektrischen Punkte der Begleitproteine in der Regel nicht mit demjenigen des auszufällenden Proteins zusammenfallen, die Löslichkeit in Abhängigkeit des pH beiderseits des isoelektrischen Punktes aber in exponentieller Weise ansteigt, ist eine Trennung leicht zu erzielen.

Neben diesen allgemeinen, elektrochemischen Prinzipien wird besonders in den neueren Verfahren von COHN von mehr spezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Blutkörperchen einerseits, Metallionen, Zuckern und Polysacchariden anderseits Gebrauch gemacht. Hierbei bilden sich entweder Metallkomplexe<sup>3</sup> oder schwerlösliche Metallsalze der Proteine, die in einem pH-Bereich ausfallen, in welchem die Natriumsalze der Proteine infolge starker Dissoziation erhöhte Löslichkeit aufweisen.

<sup>1</sup> P. DEBYE und E. HÜCKEL, Physik. Z. 24, 185, 334 (1923); 26, 22, 93 (1925).

<sup>2</sup> G. SCATCHARD und J. G. KIRKWOOD, Physik. Z. 33, 297 (1932).

<sup>3</sup> C. TANFORD und M. L. WAGNER, J. Amer. Chem. Soc. 75, 434 (1953). – E. J. COHN, D. M. SURGENOR, K. SCHMID, W. H. BATCHELOR und E. H. ALAMERY, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 175. – F. R. N. GURD, J. T. EDSELL *et al.*, Federation Proc. 11, 224 (1952). – *Blood Cells and Plasma Proteins*, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry, Related to Medicine and Public Health, Harvard University. No. 2. Ed.: J. I. TULLIS (Academic Press, Inc., New York).

<sup>1</sup> F. HOFMEISTER, Arch. Exper. Path. Pharm. 24, 247 (1887/88).

<sup>2</sup> E. J. COHN, Physiol. Rev. 5, 349 (1925).

<sup>3</sup> J. MELLANBY, J. Physiol. 33, 338 (1905).

<sup>4</sup> G. N. LEWIS und M. RANDALL, J. Amer. Chem. Soc. 43, 1112 (1921).

*Tabelle II*  
Methode 6 nach COHN

Fraktion	pH	T/2	%EtOH	t °C	Hauptkomponenten
I II + III	7,2 6,8	0,14 0,09	8 25	-3 -5	Fibrinogen $\gamma$ -Globulin, $\beta$ -Lipoprotein, Prothrombin, Isoagglutinine, Pro-fibrinolysin
IV-1 IV-4	5,2 5,8	0,09 0,09	18 40	-5 -5	$\alpha$ -Lipoprotein, Caeruloplasmin Serumesterase, eisenbindendes Globulin, $\alpha$ - und $\beta$ -Globuline
V VI	4,8 4,8	0,11 0,11	40 40	-5 -5	Albumin, 4% $\alpha$ - und 1% $\beta$ -Globuline Restlösung: Peptide u.a., saures Glykoprotein

#### Nachteile der früheren Cohnschen Fraktioniermethoden

Während der Kriegsjahre wurden von der Cohnschen Arbeitsgruppe insgesamt sechs Methoden zur Fraktionierung von Plasma und in der Folgezeit zahlreiche Methoden zur Unterfraktionierung bestimmter Hauptfraktionen entwickelt. Die weitaus bekannteste ist die sogenannte Methode 6<sup>1</sup>, mit Hilfe welcher in einem sechsstufigen Arbeitsgang die in Tabelle II aufgeführten Fraktionen erhalten wurden.

Die Dauer der Gesamtoperation ist erheblich und beträgt selbst bei schichtweisem Arbeiten mehrere Tage, während welcher Zeit die Mehrzahl der Proteine in Lösung verbleibt und so dem enzymatischen Einfluss in ganz besonderem Masse ausgesetzt ist. Zudem bildet die verwendete Alkoholkonzentration, die bis zu 40 Vol.-% beträgt, selbst bei -5°C eine nicht unerhebliche Gefahr für viele der labilen Komponenten. Der für die Fraktionierung verwendete pH-Bereich von 4,8 bis etwa 7,5 überschreitet zudem nach heutigen Ansichten die Stabilitätszone einer Anzahl von Proteinen. Doch glaubte man nach der damaligen Ansicht, salzartige Verbindungen zwischen positiv und negativ geladenen Proteinen nur dann ausschliessen zu können, wenn alle Proteine des Systems eine Überschussladung gleichen Vorzeichens aufweisen würden. Zu diesem Zwecke war es aber nötig, das pH während der Fraktionierung gelegentlich nach der sauren oder alkalischen Seite aller isoelektrischen Punkte der in der Lösung anwesenden Proteine zu verschieben.

#### Die neuen Cohnschen Verfahren

Die Notwendigkeit einer Verbesserung der bisherigen Fraktionierverfahren drängte sich auf, und zwar in erster Linie aus der Erkenntnis, dass etliche Komponenten mit Hilfe der bisherigen Methoden nicht in nativem Zustand erhalten wurden. Dies galt besonders von den Blutkörperchen, den Enzymen, aber auch

bereits von  $\gamma$ -Globulin. So gelang es KIRKWOOD<sup>1</sup>, menschliches Plasma mit Hilfe seiner Methode der Elektrophoresekonvektion aufzutrennen, wobei er nicht mehrere, sondern nur eine einheitliche  $\gamma$ -Globulinfraktion erhielt, woraus er schloss, dass die verschiedenen von COHN und Mitarbeitern isolierten  $\gamma$ -Globulinfraktionen zum Teil Artefakte der Fraktionierung sein könnten. Der Zustand der Enzyme war durch Bestimmung ihrer Aktivität, jener der Blutkörperchen durch ihre mikroskopische Struktur sowie durch ihre Stabilität und Funktionstüchtigkeit einwandfrei kontrollierbar. Auch hier waren die Ergebnisse zum Teil unbefriedigend und liessen ein Bedürfnis nach schonenderen und zugleich selektiveren Verfahren aufkommen. Grössere Selektivität wurde durch Verwendung zweiwertiger Metall- und Erdalkalimetallionen in vorzüglicher Weise erreicht. Zudem gelang es, die Verfahren dadurch schonender zu gestalten, dass eine Äthanolkonzentration von 19 Vol.-% nicht überschritten und die Wirkung der Blutenzyme auf ein Minimum eingeschränkt wurde, letzteres durch vorherige sorgfältige Abtrennung der Blutkörperchen sowie durch sofortiges Ausfällen sämtlicher Proteine des verbleibenden Plasmas. Der für die Fraktionierung erforderliche pH-Bereich konnte ebenfalls wesentlich eingeengt werden, weil im Gegensatz zu früheren Bestrebungen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen nicht vermieden, sondern vielmehr begünstigt und zur Trennung ausgenützt wurden. Solche salzartigen Bindungen zwischen Proteinen lassen sich nämlich durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante der Lösung (Glycinzusatz) leicht wieder aufspalten, da ja die Stärke der elektrostatischen Anziehung umgekehrt proportional zur Dielektrizitätskonstante ist. Um jedoch Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten schonend abtrennen zu können, dass ihr Zustand nach der Isolierung demjenigen *in vivo* nahe kam, mussten die bestehenden Methoden verbessert werden. Die neueren Methoden gründen sich in erster Linie auf selektive

<sup>1</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, Jr., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>1</sup> J. R. CANN, R. A. BROWN, S. J. SINGER, J. B. SHUMAKER, Jr., und J. G. KIRKWOOD, Science 114, 30 (1951).

*Adsorption oder auf Differentialzentrifugation unter Ausnützung der verschiedenen Dichte der Blutkörperchen.*

*Abtrennung der Blutkörperchen*

Auf Grund der Erkenntnis, dass Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten eine wichtige Quelle von Enzymen darstellen, die bei geringster Schädigung der Blutkörperchen frei werden und ihre Wirkung an den Bluteiweißstoffen als Substraten entfalten, war eine schonende Abtrennung vorgängig jeder weiteren Plasmafraktionierung unumgänglich. In ungerinnbar gemachtem Blut beobachtet man eine verschieden schnelle, jedoch spontan verlaufende Sedimentation der Erythrocyten (Blutsenkung). Durch Zusatz gewisser hochmolekularer Stoffe, besonders solcher mit fadenförmiger Struktur oder zumindest stark asymmetrischer Molekülgestalt, wie zum Beispiel Fibringen, Dextran usw., lässt sich die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten wesentlich erhöhen, während diejenige der Leukocyten kaum oder gar nicht beeinflusst wird. Dies hat seinen Grund in der von FAHRAEUS<sup>1</sup> beobachteten und von verschiedenen Forschern, so zum Beispiel von MINOR und BURNETT<sup>2</sup> sowie von BUCKLEY, POWELL und GIBSON<sup>3</sup>, praktisch verwerteten Rouleauxbildung der Erythrocyten, das heisst einer Bildung von Aggregaten, wodurch der Unterschied in der Sedimentationsgeschwindigkeit beider Klassen von Blutkörperchen vergrössert wird. Die sedimentierten Erythrocyten lassen sich sodann von beigemengten Leukocyten und Thrombocyten durch Waschen mit zellfreiem Plasma befreien, was mit Vorteil in der speziell zu diesem Zwecke konstruierten «long traverse path centrifuge»<sup>4</sup> geschieht. Hierbei wird ein mit etwa 100facher Erdschwere ( $100 \times g$ , anstatt der üblichen  $2000-3000 \times g$  in Normalzentrifugen) rotierendes Gefäß von einem axialen Zufluss her mit Blut oder einer Erythrocytensuspension, von der Peripherie her mit Waschflüssigkeit gespiesen. Die Erythrocyten werden nun durch die herrschende Zentrifugalbeschleunigung an die Peripherie gedrängt und durch die leicht turbulente Strömung gewaschen, während die Waschflüssigkeit mit geringerer Dichte durch einen axialen Ausfluss kontinuierlich abgezogen werden kann. Eine sehr einfache Apparatur dieser Art wurde kürzlich von CHAPLIN und VEALL<sup>5</sup> beschrieben.

In einer andern Methode zur Trennung von roten und weissen Blutkörperchen wird die verschiedene Dichte von Plasma<sup>6</sup> ( $D = 1,026$ ), Erythrocyten ( $D = 1,090$ ) und Leukocyten ( $D = 1,065$ ) ausgenutzt.

Durch Überschichten einer Serumalbuminlösung der Dichte 1,079 mit Blut und anschliessendem Zentrifugieren erreicht man, dass die Erythrocyten die Albuminschicht passieren und sedimentieren, während sich die Leukocyten an der Grenzschicht zwischen Plasma und Serumalbuminlösung ansammeln, wobei sie leider gerne zusammenklumpen und sich dann nur schwierig erneut dispergieren lassen.

Da die Thrombocyten mit der Dichte 1,030 noch weniger leicht sedimentieren als die Leukocyten, hat es nicht an Versuchen gefehlt, nach Entfernung der Erythrocyten die beiden Zellsorten durch verschieden intensives Zentrifugieren zu trennen<sup>1</sup>. MINOR und BURNETT<sup>2</sup> verwendeten Dextran zur Rouleauxbildung, dazu ein Netzmittel, um später eine bessere Dispergierbarkeit der Plättchen zu gewährleisten. Nach Abheben des Plasmas wurden daraus zunächst Leukocyten und Thrombocyten zusammen während 30 min bei 2000 U./min abzentrifugiert, worauf nach erneutem Suspensions des Sediments erst die Leukocyten und verbleibenden Erythrocyten während 7 min bei 800 U./min, schliesslich aus der überstehenden Lösung die Thrombocyten bei 2000 U./min während 30 min abzentrifugiert wurden. Da die Angabe der Tourenzahl einer Zentrifuge keine Auskunft über die herrschende Zentrifugalbeschleunigung gibt, ist es unerlässlich, die verwendeten Zentrifugalbeschleunigungen als Multiple der Erdbeschleunigung auszudrücken. DILLARD, BRECHER und CRONKITE<sup>3</sup> benützten Äthyldiamin-Tetraacetat (Sequestrene) als Antikoagulans und zentrifugierten bei 30facher Erdbeschleunigung ( $30 \times g$ ) während 50 min erst die Erythrocyten und die Hauptmenge der Leukocyten, dann bei  $300 \times g$  während 50 min die Thrombozyten ab. In einem der Cohnschen vollautomatischen Verfahren, in welchem die sogenannte «falling-film centrifuge»<sup>4</sup> verwendet wird, gelangen die Leukocyten bei  $100 \times g$ , die Thrombocyten bei  $400 \times g$  zur Abscheidung. Hierbei wird das von oben in die Zentrifuge einfließende Plasma an der Wand einer mit  $100 \times g$  rotierenden Trommel fein versprüht, während das nachfolgende Plasma in dünner Schicht über diesen Plasmanfilm gleitet, wobei infolge der geringen Schichtdicke die Leukocyten fortlaufend abzentrifugiert werden. Das verbleibende, plättchenreiche Plasma fliesst in die darunterliegende, unabhängig von der obigen mit  $400 \times g$  rotierende Trommel, in deren Oberteil die Thrombocyten auszentrifugiert werden, während dank einer eingebauten Trennwand das im untern Teil sich ansammelnde, zellfreie Plasma diskontinuierlich abgezogen werden kann.

<sup>1</sup> R. FAHRAEUS, Acta med. Scand. 55, 1 (1921).

<sup>2</sup> A. H. MINOR und L. BURNETT, Blood 3, 799 (1948).

<sup>3</sup> E. S. BUCKLEY, Jr., M. T. POWELL und J. G. GIBSON, Federation Proc. 8, 18 (1949).

<sup>4</sup> E. S. BUCKLEY, Jr., J. G. GIBSON, M. D. D'HONT und R. J. TINCH, Proc. 2nd Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston (USA).

<sup>5</sup> H. CHAPLIN und N. VEALL, Lancet 264, H. 1, 218 (1953).

<sup>6</sup> B. L. VALLEE, W. L. HUGHES, Jr., und J. G. GIBSON, Blood, Special Issue 1, 82 (1947).

<sup>1</sup> T. R. WAUGH und D. W. RUDDICK, Canad. Med. Assoc. J. 51, 11 (1944).

<sup>2</sup> A. H. MINOR und L. BURNETT, Blood 7, 693 (1952).

<sup>3</sup> G. H. L. DILLARD, G. BRECHER und E. P. CRONKITE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 78, 796 (1951).

<sup>4</sup> C. L. EMERSON, Jr., Proc. 2nd Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston, Mass. (USA.).

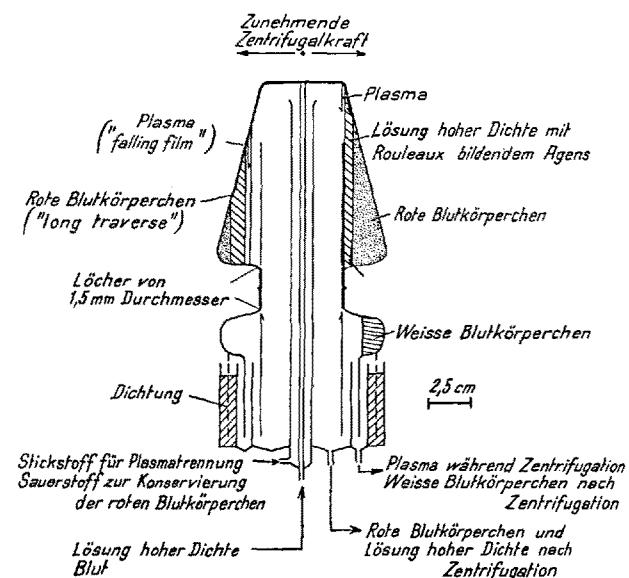
Neuesten Datums ist die ebenfalls von der Cohnschen Arbeitsgruppe entwickelte und in der Abbildung gezeigte, gekühlte Spezialzentrifuge<sup>1</sup>, in welcher verschiedene der bisher besprochenen Prinzipien kombiniert worden sind. Das Blut wird direkt aus der Vene des Spenders durch eine Kolonne eines Kationenaustauschers (Dowex-50, zu 0,003% seiner Kapazität mit Calciumionen beladen) geschickt, wobei die Calciumionen des Blutes sowie 90% der Thrombocyten adsorbiert werden. Letztere lassen sich am Ende der Operation mit Natriumchloridlösung unter Zusatz von Natriumacetat, Äthylendiamin-Tetraacetat oder Natriumcitrat wieder teilweise eluieren. Nun wird das Restblut als feiner Film in der aus unbenetzbarem Material bestehenden Zentrifuge versprüht und wandert alsdann über eine im oberen Teil des Rotors befindliche Schicht einer Laktoselösung solcher Dichte, dass bei der herrschenden Zentrifugalbeschleunigung von  $200 \times g$  nur die Erythrocyten diese Schicht zu durchdringen vermögen und im oberen Teil des Rotors in turbulenten Strömung festgehalten werden. Hier haben wir somit das Prinzip der «long traverse path centrifuge» verwirklicht. Das Plasma gleitet in laminarer Strömung über die wie eine Schneide wirkende Laktoseschicht, wobei das Prinzip der «falling-film centrifuge» verwirklicht ist, und fliesst in den unteren Teil des Rotors über, wo die Leukocyten nun nach dem «falling-film»-Prinzip abgetrennt werden. Das zellfreie Plasma sowie die verschiedenen Zellsorten können am Ende der Blutentnahme, die auch mit dem Ende der Operation zusammenfällt, am unteren Ende der Zentrifuge getrennt aufgefangen werden. Die weitere Verarbeitung des Plasmas wird im nachfolgenden beschrieben.

### Die Fraktionierung des Plasmas

Als neuere Methoden sollen hier die sogenannte Methode 10<sup>2</sup> sowie jenes vollautomatische Verfahren beschrieben werden, welches sich nach Abtrennung der Blutkörperchen mit Hilfe der in nebenstehender Abbildung gezeigten Zentrifuge anschliesst.

a) *Methode 10.* In dieser Methode wird also von der selektiven Löslichkeitsbeeinflussung einzelner Plasma-Proteine durch zweiwertige Metall- und Erdalkalimetallionen Gebrauch gemacht. Die experimentellen Einzelheiten gehen aus dem in Tabelle III wiedergegebenen Fraktionierschema hervor, das so angeordnet ist, dass auf der linken Seite Fällungen, anschliessend deren Extraktion, auf der rechten Seite Lösungen und anschliessend die Ausfällung einzelner Komponenten derselben vermerkt sind. Mit Ausnahme des Alkohols

sind alle Konzentrationsangaben in Mol/Liter ausgedrückt. Der Wert  $Ba^{++} = 0,01$  bedeutet somit 0,01 Mol  $Ba^{++}$ /Liter, was gleichzusetzen ist mit 0,01 Gramm-Atom  $Ba^{++}$  oder 0,02 Gramm-Äquivalent  $Ba^{++}$ /Liter.



Spezialzentrifuge zur Trennung von Erythrozyten, Leukozyten und Plasma<sup>1</sup>.

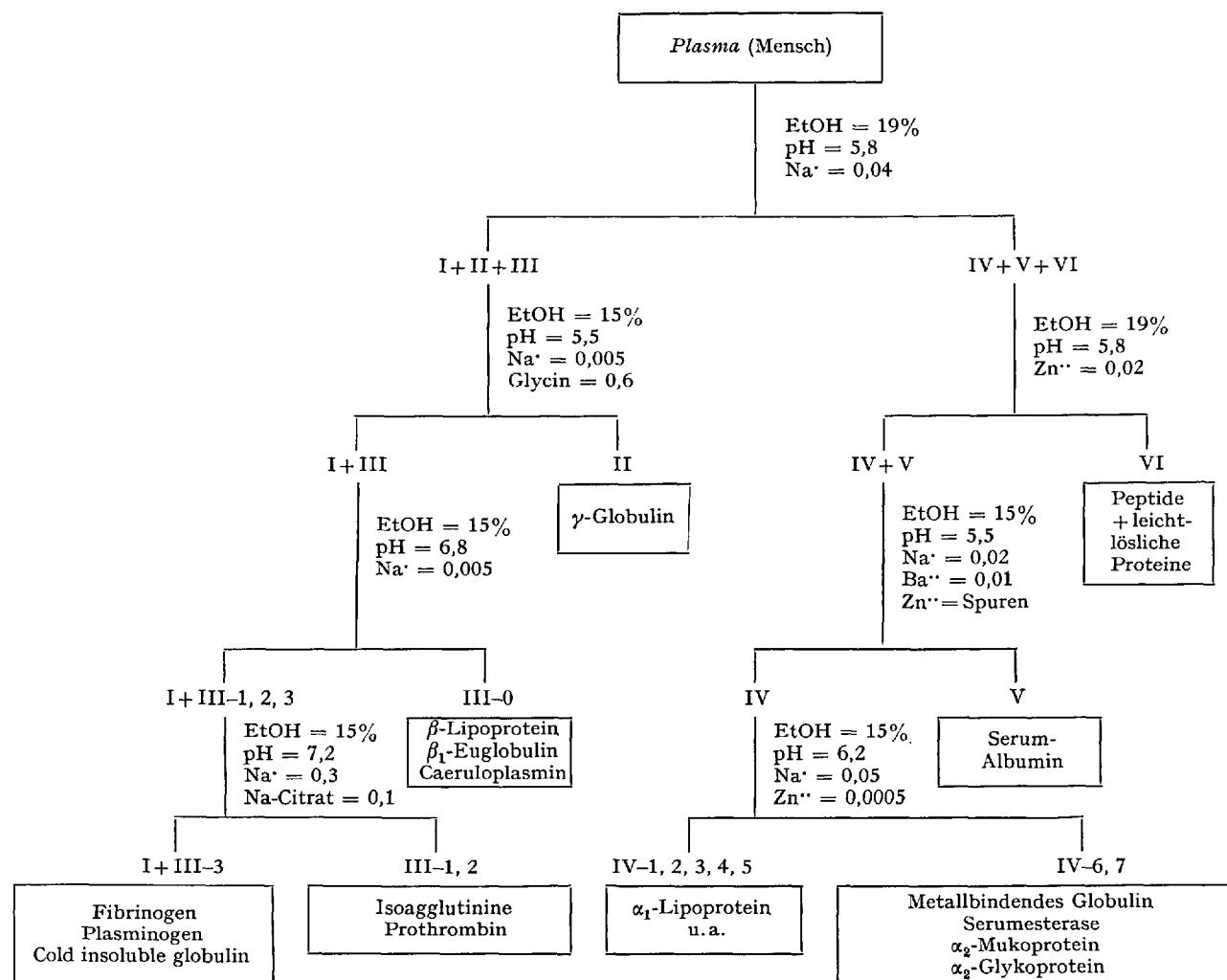
Bei diesem Fraktionierverfahren, das bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , in einem pH-Bereich von 5,5 bis 7,2 und bei maximal 19 Vol.-% Äthanol durchgeführt wird, werden somit eine Reihe von Proteinen bei pH 5,8 ausgefällt (Fraktion I + II + III), insbesondere Fibrinogen,  $\gamma$ -Globulin,  $\beta$ -Lipoprotein, Prothrombin sowie die Isoagglutinine. Eine weitere Gruppe von Proteinen (Fraktion IV + V + VI), darunter Albumin, Serumesterase, metallbindendes Globulin und  $\alpha_1$ -Lipoprotein, bleibt in Lösung. Aus dieser Lösung lässt sich das Albumin sodann durch Zusatz von Zinkionen, entsprechend einer Konzentration von 0,02 Mol/Liter, ausscheiden und aus dieser Fällung mit einem Puffer von pH 5,5, 15% Äthanol, enthaltend 0,01 Mol Bariumionen je Liter, in reiner Form extrahieren. Was die linke Hälfte des Fraktionierschemas anbetrifft, ist bemerkenswert, dass  $\gamma$ -Globulin hier als salzartige Komplexverbindung mit  $\beta$ -Lipoprotein abgeschieden wird, da bei pH 5,8  $\gamma$ -Globulin eine positive,  $\beta$ -Lipoprotein eine negative Überschussladung aufweist. Dies ist entgegen dem früher befolgten Prinzip der Vermeidung solcher Protein-Protein-Verbindungen, hat sich aber bei der Fraktionierung bewährt, besonders weil in der nachfolgenden Stufe das  $\gamma$ -Globulin durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante der Lösung (Glycinzusatz) leicht wieder aus der Verbindung abgetrennt werden kann. Die zugesetzten Metall- und Erdalkalimetallionen müssen vor der

<sup>1</sup> E. J. COHN, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochimie, Paris 1952. — J. L. TULLIS, Blood 7, 891 (1952).

<sup>2</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

<sup>1</sup> J. L. TULLIS, Blood 7, 891 (1952).

Tabelle III  
Methode 10 (COHN\*)



\* E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

Trocknung der isolierten Fraktionen durch Austauschharze oder durch Dialyse (zum Beispiel gegen Äthylen-diamin-Tetraacetatlösung) entfernt werden. Ferner ist die Entfernung der beträchtlichen Glyzinmengen durch Dialyse oder Umfällung angezeigt. Die Methode wurde von LEVER und Mitarbeitern<sup>1</sup> für die Fraktionierung von 5 cm<sup>3</sup> Plasma unter Anwendung von Filtration in der Kälte modifiziert und ist somit auch zur Untersuchung individueller Plasmaproben bei klinischen Studien verwendbar.

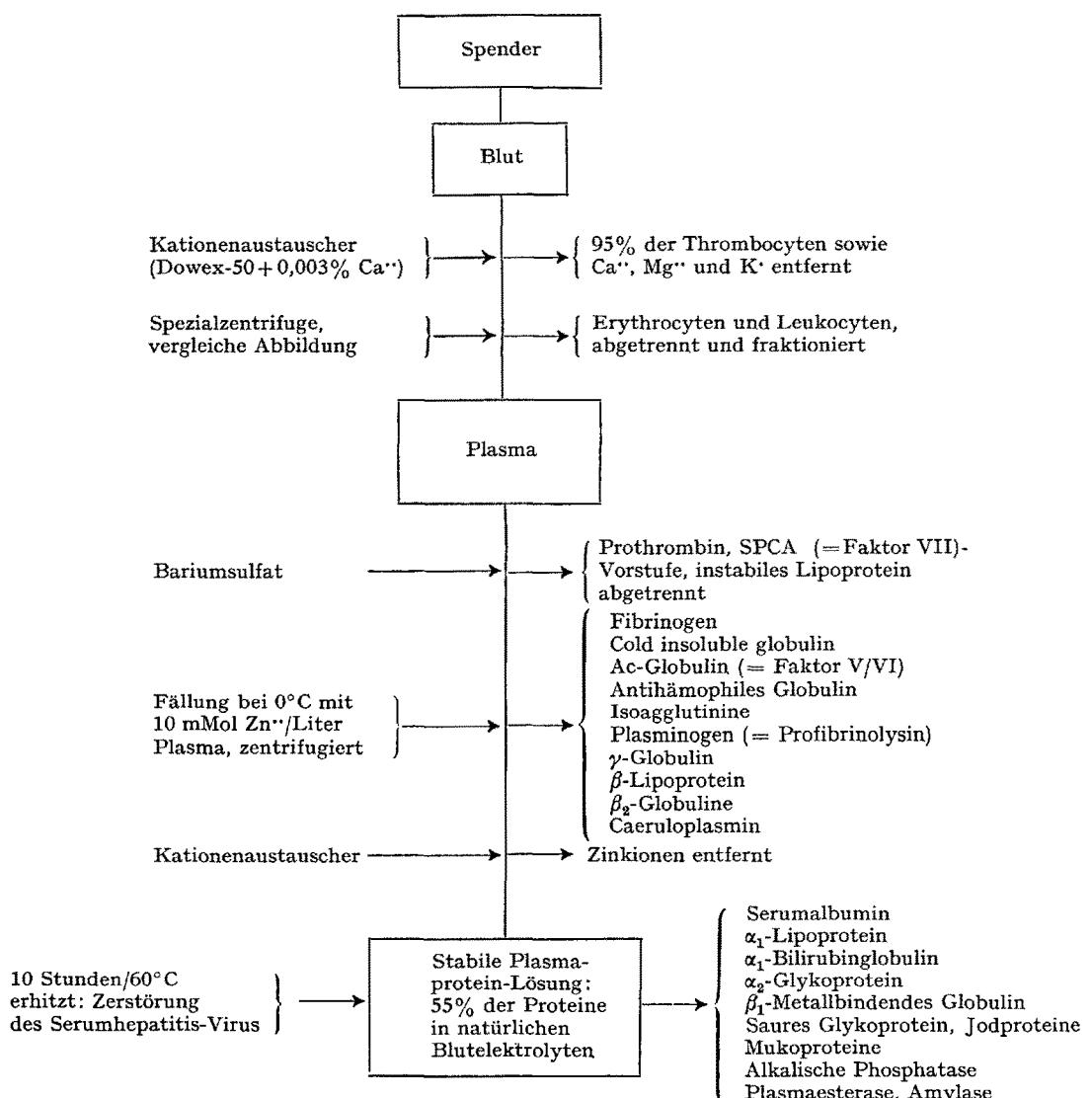
b) *Vollautomatisches Verfahren.* Neueren Datums sind Bestrebungen, auf den Gebrauch von Alkohol als Fällungsmittel und damit auf Temperaturen unter null Grad zu verzichten, um dafür spezifische Reaktionen zwischen den Plasmaproteinen einerseits, Metallionen

und Zuckern andererseits auszunützen<sup>1</sup>. Das Verfahren schliesst sich direkt an die im Vorgehenden erwähnte Methode der Adsorption von Thrombocyten an Austauschharze mit anschliessender Trennung der Erythrocyten und Leukocyten in der in der Abbildung schematisch dargestellten Zentrifuge an. Das zellfreie Plasma mit einer Temperatur von 0°C wird anschliessend in einem geschlossenen, sterilen System gemäss der in Tabelle IV wiedergegebenen Weise in eine  $\gamma$ -Globulin enthaltende Fällung und in die sogenannte «stable plasma protein solution» aufgetrennt, die entweder direkt oder nach weiterer Unterfraktionierung verwendet werden können.

<sup>1</sup> W. F. LEVER, F. R. N. GURD, E. UROMA, R. K. BROWN, B. A. BARNES, K. SCHMID und E. L. SCHULTZ, J. Clin. Invest. 30, 99 (1951).

<sup>1</sup> E. J. COHN, J. L. TULLIS, D. M. SURGENOR und M. D. D'HONT, Science 114, 479 (1951). – *Blood Cells and Plasma Proteins*, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard University, No. 2. Ed.: J. L. TULLIS (Academic Press, Inc., New York).

*Tabelle IV*  
Vollautomatisches Verfahren (COHN\*)



\* E. J. COHN, J. L. TULLIS, D. M. SURGENOR und M. D. D'HONT, Science 114, 479 (1951).

#### *Stabilität verschiedener Bluteiweißkörper*

Die Blutkörperchen müssen hinsichtlich ihrer Stabilität in einer andern Gruppe eingereiht werden als die Plasmaproteine, da sie als Blutzellen Gebilde darstellen, welche noch einen eigenen Stoffwechsel haben. Jede Isolierung und Konservierung der Blutkörperchen setzt somit voraus, dass man diesem Umstand Rechnung trage, da die Zellen ja sehr bald funktionsuntüchtig werden und zugrunde gehen, weil einzelne ihrer gekoppelten Enzymsysteme infolge Mangels an Substrat, Coenzym oder aus andern Gründen inaktiviert werden. So schreitet die Glykolyse als wichtigste Stoffwechselreaktion der *Erythrocyten* auch im Zustand der Konservierung unter Bildung von Milchsäure fort, weshalb man dem Blut Glukose zusetzt, um diese Reaktion zu unterhalten. Der Gedanke war naheliegend, durch Lagerung bei tieferer Temperatur und

damit Verlangsamung des Stoffwechsels die Haltbarkeit der Erythrocyten zu verbessern, was sich tatsächlich im Bereich von 4 bis 10°C bewährte. Bei Temperaturen unter null Grad tritt Hämolyse ein, falls nicht durch sehr schnelle Tiefkühlung die Bildung von Eiskristallen vermieden und die Erstarrung des Wassers in amorpher Form begünstigt wird. Tiefkühlung in glycerinhaltigen Lösungen ist heute eine vielverwendete Methode der Konservierung von Erythrocyten<sup>1</sup>, obwohl zur Vermeidung von Hämolyse beim Auftauen besondere Vorsichtsmassregeln beobachtet werden müssen<sup>2</sup>.

*Leukocyten* sind wesentlich instabiler; ihre Lebensdauer beschränkt sich auf Stunden und nicht auf Tage

<sup>1</sup> A. U. SMITH, Lancet 249, H. 2, 910 (1950). — H. A. SLOVITER, Lancet 260, H. 1, 823, 1350 (1951).

<sup>2</sup> J. E. LOVELOCK, Lancet 262, H. 1, 1238 (1952). — H. CHAPLIN und N. VEALL, Lancet 264, H. 1, 218 (1953).

oder Monate. Citrat hat gegenüber Leukocyten besonders hinsichtlich der Phagocytosefähigkeit einen ungünstigen Einfluss, und in citrathaltigen Blutkonserven sind diese Zellen denn auch bereits nach zwei Tagen morphologisch und funktionell stark geschädigt. Dagegen erhöhen Plasmaproteine die Stabilität der Leukocyten. Leukocytenkonzentrate aus Citratblut haben in Fällen von Agranulocytose ihren günstigen Einfluss auf die Leukopenie erwiesen<sup>1</sup>.

Die *Thrombocyten* spielen bei der Blutgerinnung bekanntlich eine grosse Rolle. Sie bilden die am wenigsten stabile Gruppe von Blutkörperchen, da sie bereits im Kontakt mit benetzbarer Oberfläche zusammenklumpen und zerfallen, was auf Grund der Ansicht verschiedener Autoren die nachfolgende Blutgerinnung auslöst, indem mehrere Substanzen in Freiheit gesetzt werden, welche die Prothrombinumwandlung beschleunigen<sup>2</sup>. Durch Arbeiten in Gefäßen mit nichtbenetzbarer Oberfläche (Paraffin, Silikon, Kunststoffe) kann diesem Übelstande begegnet werden. Da die gebräuchlichen Verfahren der Blutgewinnung und Konservierung die Thrombocyten nicht intakt lassen, ist eine Verbesserung der Methoden angezeigt, wobei folgende Punkte an erster Stelle berücksichtigt werden müssen: Peinliche Technik der Blutentnahme, Verwendung decalcifizierender Antikoagulantien, Arbeiten bei niedrigen Temperaturen und Ausschluss benetzbarer Oberflächen. Hinsichtlich der optimalen Konservierungsbedingungen ist noch sehr wenig bekannt. Intakte, funktionstüchtige Thrombocyten kommen in erster Linie für die Therapie der thrombocytopenischen Purpura in Frage.

Die Stabilität der *Plasmaproteine* ist sehr unterschiedlich, weshalb kaum ein Reagens oder eine Methode zu finden sein wird, die zum Beispiel zur Sterilisation sämtlicher Plasmaeiweißkörper geeignet sind<sup>3</sup>. Unter den Plasmaproteinen ist wohl das Albumin eines der stabilsten Proteine, während Fibrinogen in Lösung eine bedeutend geringere Stabilität aufweist. Albuminlösungen lassen sich nach Zusatz von Stabilisatoren durch zehnständiges Erhitzen auf 60°C sterilisieren, was für die Zerstörung des allfällig anwesenden Serumhepatitis-Virus von grosser Bedeutung ist. Andere Proteine sind weniger hitzestabil. Prothrombin und Leukozyten lassen sich durch ultraviolette Bestrahlung sterilisieren, während die gleiche Behandlung einen nach-

teiligen Einfluss auf die Stabilität von Albumin und Fibrinogen hat. Zur Sterilisation des Fibrinogens soll Stickstofflost (nitrogen mustard) geeignet sein.

In geeigneter Form und im trockenen Zustand sind jedoch sämtliche Plasmaproteine hinlänglich stabil, besonders bei Lagerung in der Kälte und in verschlossenen Gefäßen.

#### Fortschritte in der Charakterisierung bereits bekannter Plasmaproteine

Da seit der Zeit von 1947 die Entwicklungen sich nicht allein auf die Ausarbeitung neuer Methoden zur Blutfractionierung, sondern ebenfalls auf die Untersuchung bekannter, aber noch ungenügend charakterisierter Plasmaproteine erstreckte, sollen hier in Kürze die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst werden. Die dabei zur Sprache kommenden Proteine umfassen  $\beta$ -Lipoprotein, Serumesterase, metallbindendes Globulin, ein saures Glykoprotein sowie die Komponenten der Blutgerinnung. Untersuchungen an weiteren Plasmaproteinen sind hier nur noch angedeutet, da sie weniger zur Charakterisierung und bereits im Zusammenhang mit andern Problemen ausgeführt wurden.

a)  $\beta$ -Lipoprotein<sup>1</sup>. Als Ausgangsmaterial diente Fraktion III-0, gewonnen nach Methode 6<sup>2</sup> oder 9<sup>3</sup>, oder eine entsprechende Fraktion nach Methode 10<sup>4</sup>, aus welcher nach einer Vorreinigung reines  $\beta$ -Lipoprotein dadurch gewonnen wurde, dass die Lösung durch präparative Ultrazentrifugation während 6 h bei 45000 U./min ( $120000 \times g$ ) in einem Medium hoher Dichte in fünf verschiedene Phasen aufgetrennt wurde, wobei sich das  $\beta$ -Lipoprotein durch Flotation in der zweitobersten Phase anreicherte.

Das 5% der Plasmaproteine umfassende  $\beta$ -Lipoprotein besteht zu 75% aus Lipoiden und zu 25% aus Protein, weist ein Löslichkeitsminimum bei pH 5,4 und ein Molekulargewicht von 1300000 auf. Da es beim Gefrieren oder Gefriertrocknen in irreversibler Weise zerstört wird, weil offenbar die letzten Anteile von Wasser als Hydratationswasser eine wichtige Funktion in der Bindung der Lipoid- und Polypeptidreste haben, muss  $\beta$ -Lipoprotein in wässriger Lösung nahe beim Gefrierpunkt aufbewahrt werden. Der Nachweis von Spuren von Oestriol,  $\beta$ -Carotin, Vitamin A und E in hochgereinigtem  $\beta$ -Lipoprotein machen dessen Funktion der Aufrechterhaltung eines gewissen Plasma-

<sup>1</sup> M. M. STRUMIA, Amer. J. Med. Sci. 187, 527 (1934).

<sup>2</sup> A. G. WARE, J. L. FAHEY und W. H. SEEGERS, Amer. J. Physiol. 154, 140 (1948). — A. G. WARE und W. H. SEEGERS, J. Biol. Chem. 172, 699 (1948). — R. I. MC CLAUGHRY und W. H. SEEGERS, Blood 5, 303 (1950). — S. A. JOHNSON, Amer. J. Physiol. 170, 631 (1952). — A. J. QUICK, Amer. J. Physiol. 115, 317 (1936). — R. FEISLY und M. ENOWICZ, Schweiz. med. Wschr. 76, 274 (1944). — R. FEISLY, Helv. med. Acta 12, 215 (1945). — C. L. CONLEY, R. C. HARTMANN und W. I. MORSE, J. Clin. Invest. 28, 340 (1949). — A. FONIO, Commun. 3rd Internat. Congr. Haematol. — P. SOULIER und LE BOLLOCH, Sem. Hôp. 26, 3702 (1950). — S. VAN CREVELD und M. M. PAULSEN, Lancet 261, H. 2, 242 (1951); 262, H. 1, 23 (1952).

<sup>3</sup> E. J. COHN, Proc. 2nd Conf. Separ. Formed Elem. 1950, Boston, Mass. (USA.).

<sup>4</sup> J. L. ONCLEY, F. R. N. GURD und M. MELIN, J. Amer. Chem. Soc. 72, 458 (1950). — J. L. ONCLEY, F. R. N. GURD, D. GITLIN, F. W. J. TEALE und A. V. GOSSARD, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 401.

<sup>5</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, Jr., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 (1946).

<sup>6</sup> J. L. ONCLEY, M. MELIN, D. A. RICHERT, J. W. CAMERON und P. M. GROSS, Jr., J. Amer. Chem. Soc. 71, 541 (1949).

<sup>7</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

spiegels dieser und ähnlicher Substanzen wahrscheinlich. Durch Extraktion mit Alkohol-Äther-Mischungen lassen sich die Lipoide zu 99% entfernen, das zurückbleibende Protein verliert seinen Euglobulincharakter und wird wasserlöslich. Im Zusammenhang eines  $\alpha$ - und eines  $\beta$ -Lipoproteins bestimmter Zusammensetzung sind vielleicht die Untersuchungen von GOFMAN und seiner Arbeitsgruppe von Bedeutung<sup>1</sup>. Hier wird ebenfalls durch Ultrazentrifugieren in Medien höherer Dichte das Vorhandensein von Plasmakomponenten bewiesen, die mit verschiedener Geschwindigkeit nach der Oberfläche wandern, das heißt flottieren, und die einzelnen Komponenten werden durch ihre Sr-Werte (Svedberg-Einheiten der Flotation) charakterisiert. Es steht damit fest, dass der prozentuale Anteil verschiedener Sr-Klassen von Lipoproteinen nach Mahlzeit, Alter, Gesundheitszustand und anderen Faktoren stark variiert, wobei interessanterweise eine besondere Korrelation zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen an Sr-12-20-Komponenten und Arteriosklerose festgestellt wurde. Von grosser praktischer Bedeutung ist zudem die Eigenschaft des Heparins, solche gefährlichen Sr-Klassen von Lipoproteinen *in vivo* in ungefährliche Klassen von niedrigem Sr-Wert überzuführen, wobei Heparin offenbar mit einer andern Plasmakomponente unter Bildung des sogenannten «clearing factor» reagiert<sup>2</sup>, jenes Faktors, der lipämisches Plasma klärt. Dieser Faktor wurde in der Cohnschen Fraktion III-1, 2, 3 und zum Teil in den Fraktionen III-0 und I, seine Vorstufe in Fraktion IV-1 und ein für das System wichtiger Cofaktor in Fraktion III-0 nachgewiesen.

b) *Serumesterase*<sup>3</sup>. Die unspezifische Cholinesterase oder Serumesterase wurde aus der nach Methode 6<sup>4</sup> gewonnenen Fraktion IV-4 isoliert, indem aus dieser durch Dialyse oder starkes Verdünnen eine lipoide Fällung abgetrennt wurde und dabei eine Lösung mit hohem Gehalt an Serumesterase und metallbindendem Globulin zurückblieb. Aus dieser Lösung liess sich die Esterase als Fraktion IV-6 mit einem Minimum an Verunreinigungen bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 4,7, Ionenstärke 0,02 und 18% Äthanol ausfällen. Sie weist ein Löslichkeitsminimum bei pH 4,9 auf. Bei diesem pH-Wert beobachtet man eine tausendfache Zunahme der Löslichkeit beim Erhöhen der Ionenstärke von 0,02 auf 0,10.

<sup>1</sup> J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN und H. ELLIOTT, *J. Biol. Chem.* **179**, 973 (1949). — J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, H. ELLIOTT, W. MANTZ, J. HEWITT, B. STRISOWER und V. HERRING, *Science* **111**, 166, 186 (1950). — J. W. GOFMAN, H. B. JONES, F. T. LINDGREN, T. P. LYON, H. A. ELLIOTT und B. STRISOWER, *Circulation* **2**, 161 (1950). — J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, H. B. JONES, T. P. LYON und B. STRISOWER, *J. Gerontol.* **6**, 105 (1951). — F. T. LINDGREN, H. A. ELLIOTT und J. W. GOFMAN, *J. Phys. Coll. Chem.* **55**, 80 (1951).

<sup>2</sup> C. B. ANFINSON, E. BOYLE und R. K. BROWN, *Science* **115**, 583 (1952).

<sup>3</sup> D. M. SURGENOR, L. E. STRONG, H. L. TAYLOR, R. S. GORDON, Jr., und D. M. GIBSON, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 1223 (1949). — V. P. WHITTAKER, *Physiol. Rev.* **31**, 312 (1951). — R. G. O. KEKWICK, M. E. MACKAY und N. H. MARTIN, *Biochem. J.* **53**, XXXVI (1953).

<sup>4</sup> E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, Jr., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN und H. L. TAYLOR, *J. Amer. Chem. Soc.* **68**, 459 (1946).

Es sei hier kurz daran erinnert, dass die Erythrocyten<sup>1</sup> und Thrombocyten<sup>2</sup> spezifische Acetylcholinesterase enthalten, deren präparative Gewinnung praktisch ebenso wichtig ist wie diejenige der unspezifischen Serumesterase. Neuerdings wird Serumesterase als Antagonist und somit zur Steuerung des Succinylcholins verwendet, das seinerseits zur Muskelerschlafung während der Anästhesie Anwendung findet<sup>3</sup>.

c) *Metallbindendes Globulin*. Die meisten Versuche wurden mit der nach Methode 6<sup>4</sup> aus Fraktion IV-4 isolierten Fraktion IV-7<sup>5</sup>, welche zu 76% aus metallbindendem Globulin besteht, aber auch mit entsprechenden, nach neueren Methoden hergestellten Fraktionen ausgeführt. Nach Abtrennung des Lipoproteins (Fraktion IV-5) und der Serumesterase (Fraktion IV-6) aus der Ausgangsfaktion IV-4 lässt sich eine Rohfraktion des metallbindenden Globulins (Fraktion IV-7) bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 5,9, Ionenstärke 0,09 und 40% Äthanol ausfällen. Die weitere Reinigung<sup>6</sup> besteht in der Aussäufung von Verunreinigungen bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 4,3–4,5, Ionenstärke 0,10 und 25% Äthanol, worauf metallbindendes Globulin als Fraktion IV-7,2 mit einer Reinheit von 90 bis 95% und in einer Ausbeute von 0,42 g/l Plasma (70% des metallbindenden Globulins in Fraktion IV-7) bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 6,2, Ionenstärke 0,24 und 40% Äthanol ausgefällt werden kann. Das Protein zeigt in Form des Fe<sup>++</sup>-Komplexes zehnmal grössere Löslichkeit als im eisenfreien Zustand, während Kupferionen die Löslichkeit nicht erhöhen. Zur Bestimmung dient die charakteristische Absorption des Fe<sup>++</sup>-Komplexes bei 435 m $\mu$  oder diejenige des Cu<sup>++</sup>-Komplexes bei 460 m $\mu$ . Das metallbindende Globulin, welches auch im kristallisierten Zustand erhalten wurde<sup>6</sup>, gehört elektrophoretisch zur Gruppe der  $\beta_1$ -Globuline, hat ein Molekulargewicht von 90000 und einen isoelektrischen Punkt nahe bei 5,9. Auf Grund seiner Fähigkeit, je Molekül zwei Eisen- oder Kupferionen zu binden, wird es für den Transport dieser Metallionen im Plasma verantwortlich gemacht<sup>7</sup>.

d) *Saures Glykoprotein und andere sehr leicht lösliche Komponenten*. Nach Abtrennung des Albumins als fünfte Fraktion nach Methode 6 verbleibt eine Lösung, die nur sehr leicht lösliche Proteine, Peptide und andere Moleküle, wie Aminosäuren, Hormone usw., enthält.

<sup>1</sup> J. A. COHEN und M. G. P. J. WARRINGA, *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 195 (1953). — C. A. ZITTLE, E. S. DELLA MONICA und J. H. CUSTER, *Federation Proc.* **11**, 316 (1952).

<sup>2</sup> J. ZAJÍČEK und N. DATTA, *Acta Haematol.* **7**, 39 (1952).

<sup>3</sup> F. F. FOLDES, T. S. MACHAJ, R. D. HUNT, P. G. McNALL und P. C. CARBERRY, *J. Amer. Med. Assoc.* **150**, 1559 (1952). — R. J. HAMER HODGES, *Lancet* **264**, H. 1, 143 (1953).

<sup>4</sup> Siehe Note 4, linke Spalte.

<sup>5</sup> D. M. SURGENOR, L. E. STRONG, H. L. TAYLOR, R. S. GORDON, Jr., und D. M. GIBSON, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 1223 (1949).

<sup>6</sup> B. A. KOECLIN, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2649 (1952).

<sup>7</sup> D. M. SURGENOR, B. A. KOECLIN und L. E. STRONG, *J. Clin. Invest.* **1**, 73 (1949). — A. L. SCHADE, R. W. REINHART und H. LEVY, *Arch. Biochem.* **20**, 170 (1949). — C. G. HOLMBERG und C. B. LAURELL, *Acta chem. Scand.* **1**, 944 (1947).

Die Fraktionierung dieser Restlösung wurde kürzlich beschrieben<sup>1</sup>. Hierbei wurden sämtliche sich noch in Lösung befindenden Proteine, darunter auch das saure Glykoprotein (Fraktion VI), durch Zusatz von Zinkhydroxyd ausgefällt. Aus der überstehenden Lösung liessen sich Polysaccharide mit spezifischer Blutgruppenaktivität mittels Calciumhydroxyds als Fraktion VII gewinnen, während hierauf Aminosäuren und Peptide mit Hilfe von Ionenaustauschern als Fraktion VIII abgetrennt wurden. Die Restlösung liess sich noch in eine lipophile Fraktion IX und eine hydrophile Fraktion X auf trennen.

Bei der Unterfraktionierung von Fraktion VI wurde zuerst eine Vorfraktion VI-3 bei  $-5^{\circ}\text{C}$ , pH 5,8, 19% Äthanol und 0,5 M Zinkacetat, hierauf eine zweite Vorfraktion VI-2 bei pH 6,1, 0,02 M Bariumacetat unter sonst gleichen Bedingungen ausgefällt. Zur Abscheidung des sehr leicht löslichen Glykoproteins (Fraktion VI-1) war es nötig, die Temperatur auf  $-18^{\circ}\text{C}$  zu erniedrigen und die Äthanolkonzentration auf 35% zu erhöhen. Dieses Protein, welches in 93%iger Reinheit erhalten wurde, hat einen isoelektrischen Punkt von 2,7 und besteht nur zu 66% aus Polypeptidmaterial. Von den restlichen 34% entfallen 17,2% auf Hexose, 11,5% auf Hexosamin und 1,2% auf Phosphorsäure. Im normalen Plasma beträgt seine Konzentration 0,5 g/l. Das Glykoprotein wurde als Bleisalz kristallisiert. Durch seine Zusammensetzung und seine physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheidet sich dieses eigenartige Protein somit deutlich von den übrigen Plasmaproteinen.

e) *Komponenten der Blutgerinnung*<sup>2</sup>. Es können hier nur die wichtigsten und mit der Entwicklung der besprochenen Methoden in Zusammenhang stehenden Punkte dieses sehr ausgedehnten Gebietes berücksichtigt werden.

Um die Gerinnungskomponenten in unverändertem Zustand isolieren zu können, waren besonders zwei Neuerungen der Cohnschen Verfahren außerordentlich wichtig: Die Vermeidung der Lyse von Thrombocyten durch strikte Verwendung von Kanülen, Schläuchen und Gefäßen mit unbenetzbarer Oberfläche sowie die Entfernung von Calciumionen und Thrombocyten durch Austauschharze. Besonders hier hatte die Abkürzung der Verfahren von etwa 72 h auf wenige Minuten seine günstigen Auswirkungen. In der nach Methode 10<sup>3</sup> unter Ausschluss von Citrat und mit allen Vorsichtsmassregeln durchgeführten Fraktionierung von Plasma wurden folgende für die Blutgerinnung wichtigen Komponenten in einzelnen Fraktionen lokalisiert und zum Teil isoliert (Tab. V).

<sup>1</sup> K. SCHMID, J. Amer. Chem. Soc. 72, 2816 (1950); 75, 60 (1953).

<sup>2</sup> D. M. SURGENOR, B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN und K. SCHMID, J. Phys. Coll. Chem. 55, 94 (1951).

<sup>3</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

Tabelle V  
Blutgerinnungskomponenten, isoliert nach Methode 10<sup>1</sup>

Komponente	angereichert in	Menged. Fraktion in % der Plasmaproteine
Prothrombin SPCA-(= Faktor VII-)Vorstufe	BaSO <sub>4</sub> -Adsorbat	1,0
Fibrinogen Antihämophiles Globulin Plasminogen (Profibrinolysin)	Fraktion I	3,8
Plasmininhibitor (Antifibrinolysin)	Fraktion II	(7,0)
Ac-Globulin (Faktor V/VI)	Fraktion III	(19,0)
Heparinkomplement (in $\alpha$ -Lipoproteinfraktion)	Fraktion IV	(13,0)

f) *Weitere Untersuchungen*. Die Isolierung und Reinigung von Fibrinogen aus menschlichem Plasma wurde bereits 1948 beschrieben<sup>2</sup>. Neueren Datums ist die Beschreibung eines modifizierten Verfahrens zur Gewinnung von Rinderfibrinogen<sup>3</sup>. Vergleichende Untersuchungen über so gewonnene Fibrinogenpräparate aus Menschen- und Rinderplasma wurden kürzlich publiziert<sup>4</sup>. Detailstudien an Antikörpern, Isoagglutininen und weiteren Plasmaproteinen wurden durch die Forschungen im Zusammenhang mit der Entwicklung neuerer Fraktionierverfahren etwas in den Hintergrund gedrängt. Dagegen sind in der Zwischenzeit Untersuchungen über die Modifikation von Serumalbumin ausgeführt worden. Es gelang, die Lysyl-e-Aminogruppen von Albumin mit O-Methylisoharnstoff in Guanidiniumgruppen überzuführen<sup>5</sup>, die Tyrosyl- und Histidylgruppen in abgestufter Weise zu jodieren und die jodierten Serumalbumine zu kristallisieren<sup>6</sup>, die freien Carboxylgruppen durch Diazoacetamid oder Methyldiazoacetat unter Bildung von Glykolsäurederivaten in selektiver Weise zu blockieren<sup>7</sup> und die Sulfhydrylgruppen zweier Albuminmoleküle mittels Quecksilberionen<sup>8</sup> oder einer bifunktionellen Quecksilberverbindung<sup>9</sup> unter Bildung von Albumindimeren in reversibler Weise zu verknüpfen. Schliesslich wurde

<sup>1</sup> E. J. COHN, F. R. N. GURD, D. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DEROUAUX, J. M. GILLRSPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMAN, R. F. MOUTON, K. SCHMID und E. UROMA, J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).

<sup>2</sup> P. R. MORRISON, J. T. EDSELL und S. G. MILLER, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3103 (1948).

<sup>3</sup> P. R. MORRISON, S. SHULMAN und W. F. BLATT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 78, 653 (1951).

<sup>4</sup> J. T. EDSELL, 120. Kongress Amer. Chem. Soc. und 12. Internat. Kongress reine angew. Chem., New York 1951. – Ref.: Angew. Chem. 64, 338 (1952).

<sup>5</sup> W. L. HUGHES, Jr., H. A. SAROFF und A. L. CARNEY, J. Amer. Chem. Soc. 71, 2476 (1949).

<sup>6</sup> W. L. HUGHES, Jr., und R. STRÄSSLE, J. Amer. Chem. Soc. 72, 452 (1950).

<sup>7</sup> P. E. WILCOX, 120. Kongr. Amer. Chem. Soc. und 12. Internat. Kongr. reine angew. Chem., New York 1951. – Ref.: Angew. Chem. 64, 338 (1952).

<sup>8</sup> W. L. HUGHES, Jr., J. Amer. Chem. Soc. 69, 1836 (1947).

<sup>9</sup> R. STRÄSSLE, J. Amer. Chem. Soc. 73, 504 (1951). – J. L. ONCLEY, W. L. HUGHES, Jr., F. R. N. GURD und H. M. DINTZIS, Abstracts, 2<sup>o</sup> Congr. internat. Biochim., Paris 1952, 185.

die Darstellung einer grossen Anzahl sehr schön und verschiedenartig kristallisierter Metallkomplexsalze von Serumalbumin beschrieben<sup>1</sup> und über röntgenographische Untersuchungen an diesen kristallisierten Albuminderivaten berichtet<sup>2</sup>. Es würde jedoch zu weit führen, auf Einzelheiten dieser Untersuchungen einzugehen, und es muss daher auf die vermerkten Literaturstellen verwiesen werden.

<sup>1</sup> J. LEWIN, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3906 (1951).

<sup>2</sup> B.W. LOW und E.J. WEICHEL, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3911 (1951).

### Summary

Recent advances in the development of procedures for the fractionation of human blood have been reviewed, with a short introduction stressing the underlying theoretical basis of such procedures. Due consideration has been given to the isolation of the formed elements, obtained for the first time in a state resembling that of nature. Furthermore, some detailed investigations upon plasma proteins obtained by the older and by newer methods have been reviewed.

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. — Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. — Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. — The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### Les cas d'exception au théorème de LAPLACE sur les perturbations séculaires des éléments vectoriels des orbites planétaires

Les équations héliocentriques de chacune des planètes perturbées dans le problème des  $n$  corps s'écrivent grâce aux vecteurs

$$\mathfrak{C} = [\mathbf{r} \ \mathbf{v}] = \left[ \mathbf{r} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \right], \quad |\mathfrak{C}| = C; \quad \mathfrak{D} = [\mathbf{v} \ \mathfrak{C}] = \left[ \mathbf{v} \ \mathbf{r} \frac{d\mathbf{r}}{dt} \right], \quad \mu = f(m_{\odot} + m),$$

sous la forme<sup>1</sup>

$$\begin{aligned} \left[ \mathfrak{D} \frac{d\mathfrak{C}}{dt} \right] - \frac{\mu^2 - D^2}{C^2} \cdot \frac{D^2}{C^2} \mathfrak{C} \frac{d\tau}{dt} + D^2 \operatorname{grad}_{\mathfrak{C}} R &= 0, \\ \left[ \mathfrak{D} \frac{d\mathfrak{D}}{dt} \right] - \frac{D^2}{C^2} \mathfrak{D} \frac{d\tau}{dt} + D^2 \operatorname{grad}_{\mathfrak{D}} R &= 0, \quad (1) \\ \left( \frac{\mu^2 - D^2}{C^2} \right) &= 2 \int \frac{\partial R}{\partial \tau} dt. \end{aligned}$$

Ces équations seront singulières pour

$$\int \frac{\partial R}{\partial \tau} dt = \infty$$

et pour  $\mathfrak{C} = 0$ . Mais ces deux singularités permettent d'obtenir immédiatement les résultats classiques suivants:

$$1^{\circ} \quad \int \frac{\partial R}{\partial t} \cdot \frac{\partial t}{\partial \tau} dt = \infty.$$

La fonction perturbatrice développée en une série de FOURIER

$$R = \sum K \cos D = \sum F(a, a', e, e', i, i') \times \cos \{(nt + \epsilon)j + (n't' + \epsilon')j' + k\pi + k'\pi' + s\Omega + s'\Omega'\}$$

donne après l'intégration

$$\frac{1}{nj + n'j'} \int K \sin D \frac{\partial t}{\partial \tau} dt.$$

<sup>1</sup> J. O. FLECKENSTEIN, Exper. 8, 136 (1952).

Cette intégrale devient même pour les éléments réguliers singulière dans le cas de  $nj + n'j' = 0$ ; ce qui veut dire que le quotient des fréquences de révolution de la planète perturbante et de la planète perturbée est rationnel (théorème de LAPLACE, 1773).

2°  $\mathfrak{C} = 0$ , ce qui veut dire que toutes les vitesses des aires sont égales à zéro. La deuxième équation du système (1) donne à cause de

$$\mathfrak{D} = -\frac{\mu}{\tau} \mathbf{r}$$

la relation

$$\frac{\mu}{r} D^2 \mathbf{r} \cdot \frac{d\tau}{dt} = 0 \quad \text{ou} \quad \frac{1}{r} \mathbf{r}(t) \frac{d\tau}{dt} = 0.$$

Cette relation est remplie pour

a)  $\frac{1}{r} \mathbf{r}(t) = 0$ , c'est-à-dire dans le cas où toutes les  $n-1$  planètes se choquent simultanément dans le soleil (lemme de SOKOLOFF, 1926, ou de WEIERSTRASS-SUNDMAN, 1910, pour le cas spécial du problème des trois corps).

b)  $d\tau/dt = 0$ , c'est-à-dire pour  $\tau = \text{const.}$  Les temps des passages des périhéliés sont constants pour un mouvement rectiligne des  $n-1$  corps, dont on sait que deux des droites déterminent dans le cas des trois corps un plan fixe ou coïncident en une même droite (lemme de DZIOBEK, 1888). Pour la régularisation des équations différentielles dans les cas des chocs binaires des trois corps il suffit d'abord de supposer comme SUNDMAN  $\mathfrak{C} \neq 0$ ; le cas  $\mathfrak{C} = 0$  représente le choc ternaire ou la complanarité des trois corps.

J. O. FLECKENSTEIN

Institut d'Astronomie et de Météorologie, Bâle-Binningen, le 18 mars 1953.

### Zusammenfassung

Die vektorielle Darstellung der Differentialgleichungen des  $n$ -Körper-Problems nach MILANKOWITCH erlaubt, auch die Ausnahmefälle des Laplaceschen Theorems und die Singularitäten beim  $n$ -fachen Zusammenstoß sofort zu übersehen.