

The Binding of C¹⁴ Labelled Bacterial Polysaccharide to Serum Proteins

The varied biologic effects of polysaccharide endotoxins from gram negative bacteria have been modified by incubation with serum, plasma or with plasma proteins. The pyrogenic response in man^{1,2} and rabbits³ was reduced by *in vitro* incubation with serum. The necrosis of mouse sarcoma induced by various polysaccharides was diminished by prior incubation with plasma proteins⁴. The lethal properties of bacterial vaccine and endotoxin for rats was decreased by human, rat, or rabbit plasma and especially by globulins of low salt-ethanol fractions II, III, III and IV-1⁵. Recently, JONES *et al.*⁶ have shown, in the guinea pig, a greater inactivation of the 17-hydroxycorticosteroid evoking property of C¹⁴ labeled *K. pneumoniae* polysaccharide by *in vivo* conditions rather than *in vitro* incubation. By paper electrophoresis a greater proportion of C¹⁴ labeled polysaccharide was found in the albumin fraction *in vivo* than after *in vitro* incubation.

The present article presents the binding of two C¹⁴ labelled *K. pneumoniae* polysaccharides to the serum proteins of the guinea pig, mouse, rat, rabbit, and man. Polysaccharide (A) was prepared by 0.01 M KOH extraction of *K. pneumoniae* grown on agar containing sodium acetate-1-C¹⁴, as previously described⁷. Polysaccharide (P) was prepared from (A) with purified papain⁸, activated with cysteine and ethylenediaminetetraacetic acid in phosphate buffer pH 6.9 at 60°C for 1 h followed by 10% trichloroacetic acid (TCA), dialysis against water and the precipitation of the polysaccharide with 80% ethanol and 1% sodium acetate. The papain treatment removed

Relative Binding *in vivo* and *in vitro* of C¹⁴ Labeled *K. pneumoniae* Polysaccharide to Protein Fractions of Pooled Sera of Different Species (% Bact. Polysaccharide/% Protein)

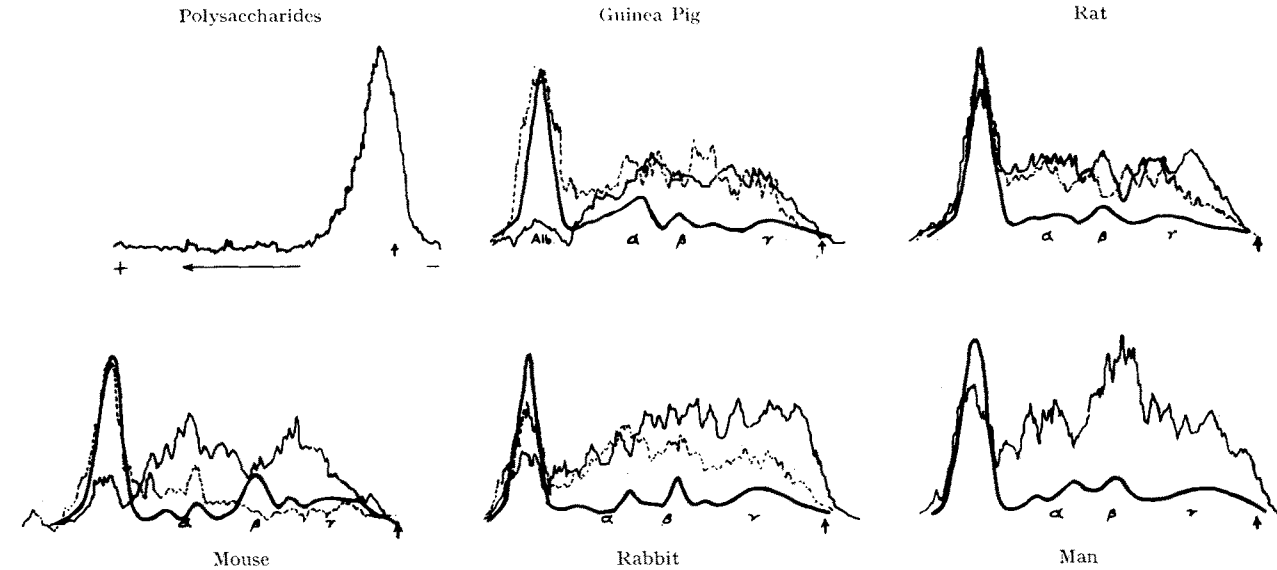
			Albu- min	Globulin		
				α	β	γ
Guinea Pig	<i>in vitro</i>	(A)	0.05	0.51	2.53	2.80
	<i>in vitro</i>	(P)	0.06	0.60	2.15	2.40
	<i>in vivo</i> *	(A)	0.72	0.38	1.25	1.90
	<i>in vivo</i>	(P)	0.79	0.52	1.30	1.65
Rat	<i>in vitro</i>	(A)	0.71	1.41	0.75	1.46
	<i>in vitro</i>	(P)	0.79	1.75	0.61	1.02
	<i>in vivo</i>	(A)	0.77	1.82	0.52	1.09
	<i>in vivo</i>	(P)	0.84	1.54	0.48	0.88
Mouse	<i>in vitro</i>	(A)	0.27	1.30	0.93	2.64
	<i>in vitro</i>	(P)	0.37	1.00	1.00	2.53
	<i>in vivo</i>	(A)	0.82	1.36	0.76	0.93
	<i>in vivo</i>	(P)	0.88	1.50	0.64	1.11
Rabbit	<i>in vitro</i>	(A)	0.18	2.04	1.85	1.96
	<i>in vitro</i>	(P)	0.23	1.88	1.98	2.29
	<i>in vivo</i>	(A)	0.52	2.30	1.20	1.51
	<i>in vivo</i>	(P)	0.60	2.65	1.04	1.32
Man	<i>in vitro</i>	(A)	0.42	1.77	1.82	1.48
	<i>in vitro</i>	(P)	0.30	2.11	2.63	1.15

* 3 h after intravenous injection.

traces of protein present in polysaccharide (A). Each polysaccharide in 1% solution with 0.15 M NaCl was added to fresh pooled serum to give a final concentration of 100 µg/ml. The polysaccharide solution was injected intravenously, 1 mg/100 g body weight, into guinea pigs, mice, rats, and rabbits and blood obtained at various intervals thereafter. The circulating plasma level of polysaccharide, initially about 250 µg/ml, declined to 75 to 100 µg/ml at 3 to 6 h. Serum proteins were estimated densitometrically from paper electropherograms stained with bromphenol blue. C¹⁴ localization in the electropherograms was quantitated with a planimeter from linear recordings of a thin mica window scanner (Tracerlab).

Both polysaccharides had very slight electrophoretic mobility on filter paper (diethyl barbiturate buffer, pH 8.6, I/2.075, 15 h, 6 v/cm) (Fig.). The time of *in vitro*

¹ F. HEGEMANN, Z. Immunitat. 111, 214 (1954).
² F. GOODALE, JR., E. S. SNELL, F. WENDT, and W. I. CRANSTON, Clin. Sci. 15, 491 (1956).
³ D. P. RALL, J. R. GASKINS, and M. G. KELLY, Amer. J. Physiol. 188, 559 (1957).
⁴ M. LANDY, R. C. SKARNES, F. S. ROSEN, R. J. TRAPANI, and M. J. SHEAR, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 744 (1957).
⁵ M. HO and E. H. KASS, J. lab. clin. Med. 51, 297 (1958).
⁶ R. S. JONES, E. V. HOWELL, and K. EIR-NES, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (in press).
⁷ R. S. JONES and Y. CARTER, Arch. Path. 63, 484 (1957).
⁸ J. R. KIMMEL and E. L. SMITH, J. biol. Chem. 207, 515 (1954).



Electrophoretic Mobility of *K. pneumoniae* Polysaccharide (A). Bound to Plasma Proteins *in vitro* and *in vivo*. —, *in vitro*; ----, *in vivo*

incubation of polysaccharide with plasma produced no change in the electrophoretic distribution of polysaccharide. There was considerable species variation in the amount of bacterial polysaccharide moving with the different plasma protein fractions. Comparison of the ratios of % bacterial polysaccharide to % protein is given in the Table. *In vitro*, the pooled sera of the guinea pig showed the least binding of polysaccharide to albumin (Table). In contrast to the *in vitro* binding, a greater total as well as relative amount of both polysaccharides was found in the albumin fraction of the guinea pig, three or more hours after intravenous injection. The differences in *in vitro* and *in vivo* binding of polysaccharide to albumin was less marked in sera of mice and rabbits, whereas little difference was noted in that of the rat. In the guinea pig, mouse, and rabbit, the *in vivo* binding polysaccharide was accompanied by decreased binding to β - and γ -globulins. In the guinea pig, *in vivo*, the polysaccharide bound to albumin increased from an initial 147 $\mu\text{g}/\text{mg}$ to 750 $\mu\text{g}/\text{mg}$ at 3–6 h.

It would appear that, *in vitro*, the serum and plasma of guinea pigs normally lacks some factor or factors present to a progressively greater degree in the rabbit, man, mouse, and rat. Such factors in plasma or in tissue could modify the serum proteins, the bacterial polysaccharides, or the moieties associated with either. The labeled polysaccharide bound to the different protein fractions had not been altered immunochemically since 90% of the label was removed from the plasma by precipitin tests with rabbit and guinea pig anti-*Klebsiella* plasma. Additional studies indicated that the albumin-binding is not due to a) modification of the bacterial polysaccharide by proteolytic factors in plasma, tissue or intact leukocytes, b) heparin-lipemia clearance, c) acidic mucoprotein, or d) plasma or tissue changes induced by prior injection of polysaccharide. Studies by others tend to exclude C-reactive protein⁹ and properdin system⁴.

R. S. JONES

University of Utah College of Medicine, Salt Lake City, September 29, 1958.

Zusammenfassung

Die Bindung zwischen C^{14} -markiertem Polysaccharid aus *K. pneumoniae* und Plasmaproteinen von Mensch, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Hase wurde papier-elektrophoretisch untersucht. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen Albumin und C^{14} -markiertem Polysaccharid bei der Ratte am ausgeprägtesten, beim Meerschweinchen am geringsten ist. *In vivo*-Versuche ergaben jedoch eine erhebliche Bindung zwischen Albumin und Polysaccharid in beiden Gattungen.

⁹ P. HEDLUND, Acta med. Scandinav. 118, 329 (1944).

Untersuchungen an saponinhaltigen Homogenaten

Durch die Zerstörung des Protoplasten bei der Homogenisation werden schwer überschaubare Verhältnisse geschaffen. Die im Homogenat suspendierten Zellorganellen werden gänzlich anderen Milieubedingungen unterworfen, die zu strukturellen Veränderungen führen und mannigfaltige Reaktionsmöglichkeiten (chemische Reaktionen,

Permeabilitätsänderungen, Adsorption, Extraktion usw.) bieten. Eine offensichtliche Möglichkeit solcher Veränderungen ist bei pflanzlichen Objekten durch das Freiwerden des Vakuoleninhaltes gegeben. Da es schwierig ist, die tatsächlich ablaufenden Reaktionen und Veränderungen in ihrer Art und in ihrem Ausmass zu erfassen, soll hier über Untersuchungen an saponinhaltigen Homogenaten als Beitrag zum Homogenisationsproblem berichtet werden.

Im Rahmen einer Arbeit¹ wurden die Blätter von *Viola tricolor* var. maxima hort. als Objekt für die Isolierung von Chloroplasten geprüft. Diese Pflanze gilt in der Literatur als saponinhaltig. Die Tatsache, dass Saponine infolge ihrer oberflächenaktiven Wirkung die Durchlässigkeit pflanzlicher Zellen für verschiedene Stoffe erhöhen², lässt ähnliche Wirkungen auch an den Grenzflächen der im Homogenat suspendierten Organellen erwarten. Es wurde geprüft, ob die bei der Homogenisation frei werdenden Saponine mit Zellorganellen – besonders mit den Chloroplasten – reagieren.

Die Untersuchungen basierten auf der hämolysierenden Wirkung der meisten Saponine und der Fähigkeit vieler, mit Cholesterin und Phytosterinen nichthämolysierende Additionsverbindungen zu bilden³, die durch Behandlung mit Xylol spaltbar sind. Die Voraussetzungen zur Bildung solcher Verbindungen sind durch den Gehalt der Chloroplasten an Phytosterinen⁴ gegeben. – Viola-Blätter wurden in 0,3 molarer Glukoselösung (Leitungswasser) homogenisiert. Aus dieser durch Glaswolle gefilterten Suspension wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 475 g im Sediment angereichert. Die Hämolysierung wurde in gepufferter Blutgelatine (Rinderblut) nach FISCHER⁵ durchgeführt. Zur Ermittlung des Hämolysioptimums durch Viola-Saponin wurden Filtrierpapierscheibchen (0,5 cm) mit dem überstehenden des Homogenates nach Zentrifugation bei 475 g getränkt, danach getrocknet, auf Objektträgern mit gepufferter Blutgelatine übergossen und mit Deckgläsern abgedeckt. Das Saponin erwies sich als ein Stoff, der bei einem pH-Wert um 6,7 auf Rindererythrozyten seine stärkste hämolysierende Wirkung entfaltet und mit Cholesterin – die Papierscheibchen wurden 1 h in 1%iger Cholesterinlösung (Äther-Äthanol 1:1) gekocht – eine nichthämolysierende Verbindung eingeht, die durch Kochen mit Xylol (2 h am Rückfluss) wieder gespalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass ätherlösliche Stoffe (Phytosterine usw.) aus den plastidenhaltigen Sedimenten in gleicher Weise mit dem Saponin reagieren wie Cholesterin.

Nun wurde geprüft, ob dieses Saponin mit den Chloroplasten im Homogenat reagieren kann. Hierzu wurde ein Homogenat vor der Zentrifugation 30 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurde abzentrifugiert und das Sediment gründlich mit Glukoselösung und zuletzt mit destilliertem Wasser zur völligen Entfernung gelösten Saponins nachgewaschen. Nach Trocknung wurde ein Teil dieses Präparates direkt in Blutgelatine eingebettet, der andere Teil wurde 2 h mit wenig Xylol am Rückfluss gekocht, mit Äther gewaschen, getrocknet und ebenfalls in Blutgelatine übergeführt. Nur im letzten Fall liess sich eine positive Hämolysie beobachten. Dieses Resultat spricht also für eine Reaktion des Saponins mit den Chloroplasten. Untersuchungen von KE und CLENDEN-

¹ H. KERN, Diss. Münster 1956; Protoplasma (im Druck).

² O. B. MUTHU, Protoplasma 18, 141 (1953).

³ A. WINDAUS, Ber. dtsh. chem. Ges. 42, 238 (1909).

⁴ E. RABINOWITCH, Photosynthesis and Related Processes (New York 1945).

⁵ R. FISCHER, Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, mathem. naturw. Kl. Abt. I 139, 321 (1930).