

## Immunologische Eigenschaften der menschlichen mit Heparin präzipitierten Plasmafraktion

Arbeiten der letzten Jahre betonten die Rolle des Fibrinogens in der Pathogenese des Fibrinoids, welches nach immunochemischen Arbeiten<sup>1,2</sup> neben anderen Komponenten auch Fibrin enthält. THOMAS *et al.*<sup>3</sup> beobachteten bei der experimentellen Schwartzmanschen Reaktion nach Heparinzusatz und Abkühlung des Kaninchenblutes die Entstehung eines besonderen Präzipitats, einer Plasmafraktion (HPF), die auch bei manchen entzündlichen und nekrotisierenden Prozessen beobachtet wurde<sup>4-6</sup>. Sie ist in löslicher Form im dekalzifizierten Plasma vorhanden. Nach Zugabe einer gewissen Heparinmenge sowie ähnlicher Substanzen kommt es zur Herabsetzung ihrer Löslichkeit, diese wird ebenfalls beeinflusst durch Temperatur, ionale Verhältnisse und pH<sup>4</sup>. Paperelektrophoretisch zeigt die zum Teil mit Thrombin gerinnbare Fraktion dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie das Fibrinogen. In einigen Eigenschaften ist sie dem Morrisonschen «Kontraktinogen»<sup>6</sup>, dem «Fibrinogen B»<sup>7</sup> und dem «Kryofibrinogen»<sup>8</sup> vergleichbar. THOMAS *et al.*<sup>3</sup> wiesen auf eine mögliche Funktion der HPF als Fibrinoid-precursor hin.

Die vorliegende Arbeit untersucht die immunologischen Eigenschaften der HPF.

**Methodik:** Herstellung der HPF: Plasma von 6 Kranken (mit Lymphogranulomatose, maligner Retikulose, Phlebothrombose), mit 500 Heparineinheiten pro 5 ml Blut, wurde auf 3-4°C abgekühlt. Der so entstandene Niederschlag wurde mehrfach mit kaltem 0,15 M NaCl und 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4 gewaschen.

Die Paperelektrophorese wurde im Veronalpuffer von pH 8,6 (Ionenstärke 0,05) durchgeführt.

**Die Antiseren:** Das spezifische Antiserum wurde durch obligate intravenöse Immunisierung der Kaninchen mit HPF (Gesamtmenge von ca. 270 mg des gerinnbaren Anteils der HPF) hergestellt. Elf Tage nach der letzten Injektion wurde das Kaninchenblut in 3,8% Trinatriumzitrat (1:10) aufgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde durch Zugabe der minimalen Menge von gereinigtem Thrombin defibriniert.

**Immunologische Methoden:** Die Ringpräzipitationsmethode, die Oudinsche Agar-Gel-Diffusionsmethode<sup>9</sup> und die Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY<sup>10</sup> wurden benutzt. Sämtliche Agarbasen, die Merthiolat im Verhältnis von 1:10<sup>-4</sup> enthielten, wurden mit Veronalpuffer von pH 7,4 verdünnt. Antiseren und Antigene wurden in 0,05 M NaCl und 3,8%iger Trinatriumzitratlösung verdünnt.

**Ergebnisse:** Sämtliche lösbar HPF zeigten bei der Paperelektrophorese dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie das Fibrinogen (Abb. 1). Bei der Ringpräzipitation wurde mit den absorbierbaren Anti-HPF-Seren und dem homologen Antigen eine positive Präzipitation bis zur Verdünnung von 1:128 und mit dem Fibrinogen der Cohnschen Fraktion I im Verhältnis von 1:32 bis 1:64 erzielt. Auch die anderen isolierten HPF zeigten eine positive Präzipitation. Bei der einfachen Agar-Gel-Diffusion beobachteten wir die Entstehung von mindestens 8 Präzipitationslinien, falls gereinigte HPF und nicht absorbierbares Antiserum benutzt wurden. Nach der Absorption des Antisera entstanden jeweils eine stärkere und 2 schwächeren Zonen. Die Diffusion bei niedriger Temperatur (3-4°C) liess unter Verwendung desselben Antisera und der homologen HPF nur 2 Linien erkennen. Bei der Doppeldiffusion wurde die Entstehung von mindestens 3 Zonen beobachtet (Abb. 2). Eine der Zonen war mit der Linie des mit Thrombin präzipitierten Anteils der Cohnschen Fraktion I und des gereinigten Fibrinogens der Cohnschen Fraktion I identisch. Nach Zugabe von Thrombin zur gelösten HPF trat sie nach Beseitigung des Niederschlags nicht mehr in Erscheinung. Die Zone, welche dem Fibrinogen entsprach<sup>11,12</sup>, fehlte auch nach Erhitzen

des Fibrinogens.

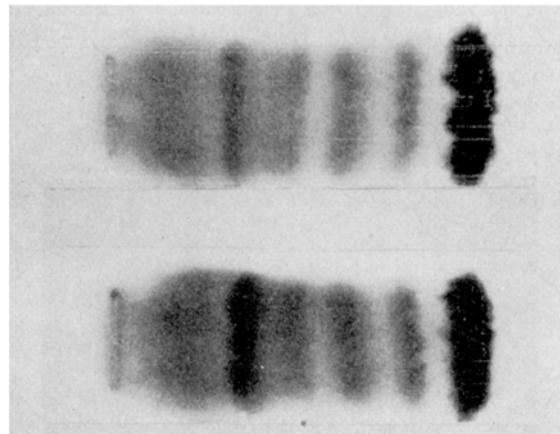


Abb. 1: Elfo; oben: Zitratplasma ohne Zusatz von HPF  
unten: Zitratplasma nach Zusatz von HPF

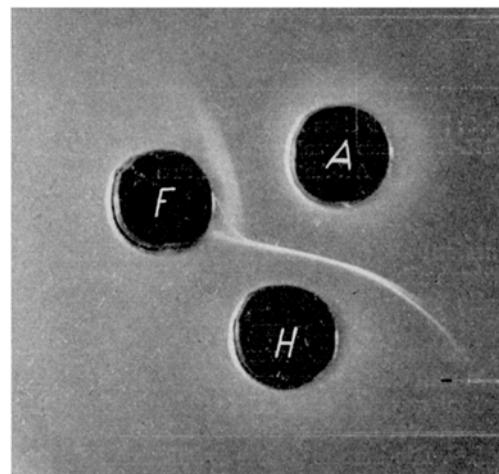


Abb. 2: H: Die mit Heparin präzipitierte Plasmafraktion  
F: Fraktion I nach COHN A: Anti-HPF-Serum

- 1 R. MELLORS und L. ORTEGA, Amer. J. Path. 32, 455 (1956).
- 2 D. GITLIN, J. CRAIG und C. JANEWAY, Amer. J. clin. Path. 33, 55 (1957).
- 3 L. THOMAS, R. SMITH und R. V. KORFF, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 86, 813 (1954).
- 4 R. SMITH und R. V. KORFF, J. clin. Invest. 36, 596 (1958).
- 5 G. SICCA und N. DEL BONO, Arch. Maragliano 13, 1189 (1957).
- 6 J. MORRISON, Amer. J. med. Sci. 211, 325 (1946).
- 7 B. LYONS, Nature 155, 633 (1945).
- 8 D. KORST und C. KRATOCHVIL, Blood 10, 945 (1955).
- 9 J. OUDIN, Ann. Inst. Pasteur 75, 309 (1948).
- 10 O. OUCHTERLONY, Ark. Kemi Miner. Geol. [B] 26, 14 (1948).
- 11 M. SELIGMAN, B. GOUDMAND, A. JANIN, J. BERNARD und P. GRABAR, Rev. Hématol. 12, 302 (1957).
- 12 J. SALMON und Y. BOUAMEAUX, Thromb. Diat. Haem. 2, 2 (1958).

der HPF während 3 min auf 56°C. Die zweite Linie, welche stets bei den Diffusionsversuchen mit HPF vorhanden war und welche nach Sättigung des Antiserums mit  $\gamma$ -Globulin verschwand, war mit der Linie des zu Vergleichszwecken zugesetzten  $\gamma$ -Globulins identisch. Beim Vergleich der einzelnen HPF in Kreuzversuchen konnten wir keine besondere abweichende Komponente nachweisen (Abb. 3). Das Anti-HPF-Serum übte keinen Einfluss auf die Konversion des plasmatischen Prothrombins aus. Nach seinem Zusatz zur gelösten HPF und in Anwesenheit des Thrombins trat eine faserige Masse in Erscheinung, die sich unter gleichen Bedingungen von dem gelatinösen Präzipitat bei Benutzung der Cohnschen Fraktion I unterschied.

mit  $\gamma$ -Globulin verschwand, enthält. In den Kreuzversuchen mit Anti-HPF-Seren und homologen und heterologen HPF ist in keinem Fall das Entstehen einer atypischen Präzipitationslinie, deren Gegenwart auf die individuelle Spezifität der HPF und dadurch auf den Paraproteincharakter der HPF im strengen Sinne des Wortes hinweisen würde, beobachtet worden. Dies wird auch durch den Umstand begründigt, dass bei den elektrophoretischen Untersuchungen der Seren der untersuchten Patienten keine einem Paraprotein ähnliche Komponente aufgefunden werden konnte.

K. BARTA und A. BARTOVA

*I. Medizinische Klinik der Palacky Universität, Olomouc (Tschechoslowakei), 17. August 1959.*

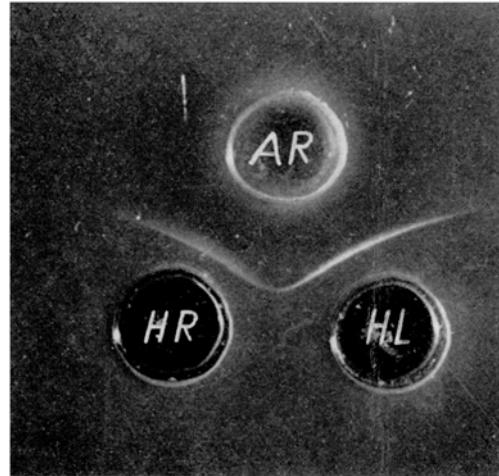


Abb. 3: HR-HPF eines Kranken mit maligner Retikulose  
HL-HPF eines Kranken mit Lymfogranulomatose  
AR-Anti-HPF-Serum

**Diskussion:** Die gewonnenen plasmatischen Kryopräzipitate waren alle bei 37°C in 0,15 M NaCl gut lösbar. Sie waren alle teilweise mit Thrombin gerinnbar. Der ungerinnbare Anteil konnte durch intensive Waschung nicht mehr weiter herabgesetzt werden. Die nach Zugabe von Thrombin und Ca<sup>2+</sup> gewonnenen Polymeren zeigten einen bestimmten gegenseitigen Unterschied ihrer Lösungsfähigkeit in verdünnter Schwefelsäure und 30%igem Harnstoff<sup>13</sup>. Die bereits früher erwähnten Eigenschaften (ähnliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten wie das Fibrinogen, teilweise Gerinnbarkeit mit Thrombin), ferner der Umstand, dass das HPF nach Abkühlung von Heparinplasma und nicht nach Abkühlung des Serums mit oder ohne Heparinzusatz entsteht, weisen auf die Verwandtschaft mit Fibrinogen hin. Die durch Immunisation der Kaninchen mit plasmatischen Kryopräzipitaten gewonnenen Antiseren gaben Präzipitationslinien sowohl mit der HPF als auch mit dem Fibrinogen der Cohnschen Fraktion I. Eine der Präzipitationslinien war bei Verwendung der Doppeldiffusionsmethode nach OUCHTERLONY mit der Linie des gereinigten Fibrinogens der Cohnschen Fraktion I identisch. Sie trat jedoch nach Erhitzen des Antigens (HPF) (3 min auf 56°C), nach Fällung der HPF mit Thrombin und auch nach Absättigung des Antiserums mit dem Fibrinogen nicht mehr in Erscheinung. Daraus wird geschlossen, dass die HPF eine mit dem Fibrinogen immunologisch identische Komponente neben einer  $\gamma$ -Globulin-Komponente, deren Präzipitationslinie nach völliger Absättigung des Antiserums

### Summary

The plasmatic fraction, which is precipitated by cooling human heparin plasma, has been found to contain the constituent identical with  $\gamma$ -globulin and also another component with the fibrinogen of Cohns' fraction I immunologically identical. With the help of the agar-gelose diffusion method, no qualitative immunological differences have been found with regard to the antigenic composition of the plasmatic fraction isolated in cases of various system diseases.

<sup>13</sup> K. BARTA, Acta univ. Palack (im Druck).

### Studies on Biosynthesis of Sucrose

The authors have already reported<sup>1</sup> the presence of sucrose phosphorylase in sugar cane juice. The sucrose phosphorylase isolated by the authors is similar to that isolated by HASSID and DOUDOROFF<sup>2</sup> only in so far as it is not inhibited by NaF. It has not been reported as yet how the sucrose phosphorylase from the cane juice differs from the enzymes reported earlier in *Pseudomonas saccharophila*<sup>2</sup>, wheat germ extract<sup>3,4</sup>, and pea extract<sup>5</sup>. In this communication, a study of the kinetics of the enzyme has been incorporated to indicate that the sucrose phosphorylase isolated from cane juice differs markedly from the enzyme reported earlier.

It has been found that the enzyme is stable towards dialysis against citrate, veronal acetate and phosphate buffers at pH 6.6 and 5°C. Dialysis towards distilled or tap water up to 72 h at 5°C did not reduce the enzyme activity to any appreciable extent. This is in contrast to the enzyme from *Pseudomonas*<sup>2</sup> and pea extract<sup>5</sup>.

Repeated precipitation with ammonium sulphate and dialysis against tap or distilled water did not injure the enzyme activity, proving thereby that no other coenzyme is associated with sucrose phosphorylase to carry out the sucrose synthesis reaction in the sugarcane plant. No

<sup>1</sup> J. P. SHUKLA and K. A. PRABHU, Naturwissenschaften, in press.

<sup>2</sup> M. DOUDOROFF, N. KAPLAN, and W. Z. HASSID, J. biol. Chem. 148, 67 (1943).

<sup>3</sup> L. F. LELOIR and C. E. CARDINI, J. Amer. chem. Soc. 75, 6084 (1953).

<sup>4</sup> L. F. LELOIR and C. E. CARDINI, J. biol. Chem. 214, 149 (1955).

<sup>5</sup> J. F. TURNER, Nature 172, 1149 (1953).