

A Mouse Toxic Hemagglutinating Factor in Keyhole Limpet Hemolymph

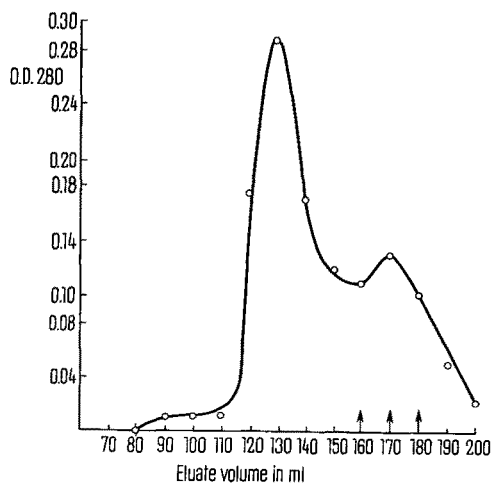
Large quantities of hemolymph can be obtained from the American keyhole limpet (*Megathura crenulata*) by incising the mantle close to the shell and allowing the blueish fluid to drain out in the cold for several hours. The hemocyanin can be removed from this by centrifugation at 100,000 *g* for 2 h, leaving a clear, colourless supernatant fluid. During a survey of marine invertebrates for the occurrence of factors which agglutinate mammalian red cells, this fluid was found to be highly active. It would agglutinate 1% suspensions of all red cells kept at 0°C during testing to a dilution of approximately 1/2000. The species tested included sheep, human groups A and B, Swiss white outbred mice, Balb/C and C₃H mice and rabbits. If the cells were incubated at 37°C with the hemolymph dilutions then hemolysis resulted within 10 min to the same titre. This activity of the hemolymph was extremely heat labile, 99% inactivation occurring after 1 min at 56° or 10 min at 42°C.

The active fraction was precipitated by 40% saturated ammonium sulphate and could be entirely recovered in the 0.15 *M* saline solution of this precipitate. Further fractionation of this material was achieved by passing 25 mg through Sephadex G200, 2 peaks were obtained and the biological activity was restricted to the later one (see Figure). The tubes 16–18 containing the hemagglutinin were pooled and concentrated to yield 4.8 mg protein containing approximately half of the original activity, giving about 2-fold purification in terms of activity/mg of protein.

This crudely purified material and the original hemolymph were found to possess an extraordinary toxicity for mice following i.v. injection. As little as 0.1 ml of a 1/50 dilution of the original fluid represented an LD₅₀ dose on i.v. injection. Within 30 sec of the injection the mice showed signs of rapid shallow breathing with cyanosis. This was accompanied by other signs of smooth muscle contraction such as emptying of the bladder and defecation. Death occurred within 1 or 2 min, otherwise the mice recovered completely. The LD₅₀ dose of the crude hemolymph represented 10 µg of protein and the material purified on sephadex was about twice as active.

The similarity between the toxic signs seen and those of acute anaphylaxis was striking, this coupled with the high hemagglutinating or hemolytic activity of the material for

mouse cells suggest an intriguing analogy with mammalian antibody systems¹.



Sephadex G200 fractionation of Keyhole limpet hemagglutinin. Column (60 × 2 cm) was eluted with 0.15 *M* phosphate buffered saline pH 7.2. All the activity was recovered in the eluate between 160–180 ml.

Zusammenfassung. Die Hämolymphe der Tellermuschel, *Megathura crenulata*, ist hochtoxisch für die Maus. Gegen Erythrozyten verschiedener Säuger wirkt sie hämagglutinierend und hämolysierend.

M. P. ROWLEY and D. ROWLEY

Department of Microbiology, University of Adelaide, (South Australia), 26 March 1968.

¹ Acknowledgment. We would like to express our gratitude to Dr. B. PAPERMASTER for generously providing us with facilities in the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley.

Proteolytische Aktivität normaler und antigenstimulierter Makrophagen

Ein Kernproblem der modernen Immunologie ist der Locus der Antikörperbildung. Nach den Arbeiten von FAGREUS¹, insbesondere aber nach jenen von WELLER und COONS², wurde festgestellt, dass in den Plasmazellen (Plasmozyten) Antikörper produziert werden. Die Untersuchungen von DIXON³ und später von FISHMAN et al.^{4,5} ergaben, dass am Prozess der Antikörperproduktion auch Mikrophagen teilnehmen. Ihre Rolle ist jedoch bisher noch nicht ganz geklärt worden^{6–11}. Dennoch geht aus zahlreichen Befunden hervor, dass als erstes Ergebnis der Wechselwirkung zwischen Antigen und Makrophag RNS produziert wird, die die Antikörpersynthese in den Plasmozyten induziert.

In dieser Mitteilung werden die Resultate der Veränderungen der proteolytischen Aktivität der polymorphen Kernleukozyten nach Einwirkung des Aujeszky-Virus erörtert.

Material und Methoden. Die Untersuchungen wurden auf Polynuclearleukozyten von Meerschweinchen mit

¹ A. FAGREUS, Acta Med. scand. Suppl. 204 (1948).

² T. H. WELLER und A. H. COONS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 86, 789 (1954).

³ F. I. DIXON, in *The Problem of Auto-Antibodies* (P. Grabar, Texas 1957).

⁴ M. FISHMAN und F. L. ADLER, J. exp. Med. 117, 592 (1963).

⁵ M. FISHMAN, R. A. HAMMERSTROM und V. P. BOND, Nature 198, 592 (1963).

⁶ M. BURNET, Br. Med. J. 2, 645 (1959).

⁷ F. R. SABIN, J. exp. Med. 70, 67 (1939).

⁸ T. N. HARRIS und W. E. EHRRICH, J. exp. Med. 84, 157 (1946).

⁹ J. M. MCKENNA und K. M. STEVENS, J. exp. Med. 111, 573 (1960).

¹⁰ P. D. McMASTER, *Antibody Formation in the Cell* (Academic Press, New York 1961), vol. 5, p. 232.

¹¹ M. FISHMAN, J. exp. Med. 114, 837 (1961).

Lebendgewicht von 350–500 g durchgeführt. Die Tiere wurden bei einer Standarddiät gehalten und ad libitum mit Wasser getränkt. Vor Benutzung der Tiere wurde ihnen das Futter entzogen.

Die Polynuclear-Leukozyten wurden gewonnen durch zweimalige i.p. Injektion der Tiere mit 1% Natriumchlorid¹², dem 5 IE Heparin/ml der Lösung zugefügt war. Die Durchführung der Phagozytose erfolgte mittels Inkubation eines Teils der Zellen mit einer Suspension des Aujeszky-Virus im Verhältnis von 50 Virusteilchen je Zelle bei 37°C, während 30 min, der andere Teil der Zellen diente als Kontrolle. Nach Ablauf dieser Frist wurden die inkubierten wie auch die Kontrollzellen dreimal mit PBS gewaschen und je siebenmal eingefroren und bei 25°C aufgetaut. Bei einem Teil der gespaltenen Zellen wurde die Trockensubstanz und bei anderem ihre proteolytische Aktivität nach der von POLJAKOVA modifizierten Methode von ANSON^{13,14} bestimmt. Angesichts des vergleichenden Charakters der Untersuchungen drückten wir die proteolytische Aktivität nicht in IE sondern in der pro Stunde aus 1 mg trockener Zellmasse gebildeten Tyrosinmenge aus.

Resultate. Die Untersuchungen wurden auf Zellsediment peritonealer Flüssigkeit von 20 Meerschweinchen durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Tabelle angeführt.

Das Enzymsystem enthält 2 ml 2% Pferdehämoglobin, 0,5 ml Puffer, pH 3,8 und 0,5 ml Extrakt von polymorphkernigen Leukozyten, Inkubation 1 h bei 37°C.

Aus der Tabelle geht hervor, dass von 1 mg trockener Zellmasse normaler Polynuclearleukozyten von Pferdehämoglobin/h 92 mg Tyrosin und von denselben Leukozyten nach Antigenbehandlung (Aujeszky-Virus) 124 mg Tyrosin abgespalten werden. Daraus folgt, dass sich die proteolytische Aktivität der Polynuclearleukozyten nach Behandlung mit dem Aujeszky-Virus erhöht. Verglichen mit den unbehandelten Leukozyten beträgt die Erhöhung rund 34,5%.

Der biologische Wert dieser Erhöhung der proteolytischen Aktivität lässt sich schwer bestimmen. Einige Literaturangaben geben jedoch zu gewissen Vermutungen Anlass.

Es wurde festgestellt, dass Leukozyten lösliche Eiweissantigene aufnehmen, was auch bei den Viren wahrscheinlich durch Pinozytose erfolgt^{15–17}. Die Korpuskularantigene, die in vorliegendem Falle Teilchen des Aujeszky-Virus sind, spalten sich kurz nach der Agglutination¹⁸. Die Spaltung wird durch proteolytische Enzyme bewerkstelligt. Auf Grund der Untersuchungen von LAPRESLE und DURIEUX¹⁹ wurde festgestellt, dass bei dieser Spaltung Bausteile gewonnen werden, die ihren antigenen Charakter beibehalten. Laut einer Reihe von Befunden können sich Antigenfragmente, wenn auch nur in geringen Mengen, mit der RNS der Polynuclearleukozyten ver-

binden, wobei der produzierte Komplex instande wäre, die Bildung von Antigenkörpern zu induzieren²⁰. So gelang es einem von uns, mittels Ribonucleinsäure, die aus mit Aujeszky-Virus behandelten Polynuclearleukozyten isoliert wurden, in normalen Lymphknoten zellen Antikörper zu induzieren, welche ihrerseits instande sind, die zytopathogene Wirkung des Aujeszky-Virus zu neutralisieren²¹.

Auf Grund der obigen Angaben dürfte die Erhöhung der proteolytischen Aktivität der Polynuclearleukozyten eine Schutzreaktion sein, bei der Antikörper gegen das verwendete Virus produziert werden.

Proteolytische Aktivität normaler und antigenstimulierter Polynuclearleukozyten

	Polynuclearleukozyten	
	normal	antigenstimuliert
Anzahl der Versuche	20	20
Durchschnittswert der proteolytischen Aktivität	92	124
Standardabweichung	3,5	3,1

mg freigesprochenes Tyrosin je mg trockene Zellmasse im Laufe 1 h bei 37°C.

Summary. The proteolytic activity of polynuclear leucocytes of the guinea-pig was determined prior to and after incubation with the pseudorabies virus (the virus of Aujeszky disease). It was found that the proteolytic activity of leucocytes treated with the virus was increased by 34.5%. There is a brief discussion of the biological value of the increased proteolytic activity.

O. NACHKOVA, G. BOYADJIEV
and D. NACHKOV

*Institut für Immunologie, Sofia 24 (Bulgarien),
2. Januar 1968.*

¹² F. ROSSI und M. ZATTI, Br. J. exp. Path. 45, 5 (1964).

¹³ M. L. ANSON, J. gen. Physiol. 22, 79 (1958).

¹⁴ O. POLJAKOVA, Ukr. biokhem. Zh. (1961).

¹⁵ M. BESSIS und E. BRICKA, Revue Hémat. 5, 396 (1957).

¹⁶ M. BESSIS, Biologie méd. 46, 1 (1957).

¹⁷ C. CHAPMAN-ANDRESEN, Expl. Cell Res. 12, 397 (1957).

¹⁸ R. J. DUBOS, in *Biochemical Determinants of Microbial Diseases* (Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1954), p. 34.

¹⁹ C. LAPRESLE und J. DURIEUX, Annls. Inst. Pasteur, Paris 92, 62 (1957).

²⁰ G. S. GARVEY und J. H. CAMPBELL, J. exp. Med. 105, 361 (1957).

²¹ D. NACHKOV, im Druck.

Experimental Antibodies to Walker Ascitic Tumour Cell Nuclei: Their Production and Biological Activity

Recently we have described the experimental production of immunofluorescent specific antibodies in rabbits to human leucocyte nuclei¹. The present report concerns the production of antisera against Walker ascitic tumour cell nuclei for the purpose of determining their biological activity in vivo.

Material and methods. Walker ascitic cells were obtained by peritoneal aspiration from 30 female rats (Wistar strain,

150–200 g). Walker cell nuclei were isolated in sucrose² and in citric acid media¹. For the immunization, nuclei pre-incubated with active human antinuclear sera or non-

¹ D. ŽITNAN and I. CEBECAUER, Folia biol., Praha 14, 215 (1968).

² H. BUSCH, W. C. STARBUCK and J. R. DAVIS, Cancer Res. 19, 684 (1959).