

Über die Fibrinogen-Fibrinumwandlung.

von

K. Laki.

(Arbeit aus den Mitteln des fürstl. Esterházy'schen Stipendiums.)

Vorliegende Arbeit bezweckt das Studium des zweiten Abschnittes der Blutgerinnung, der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. Vor allem erwies es sich als erforderlich das Fibrinogen in möglichst reiner Form, frei von sonstigen Proteinen darzustellen und zu untersuchen welche Veränderungen durch die Einwirkung von Thrombin zustande kommen.

Isolierung des Fibrinogens.

Für die Reindarstellung des Fibrinogens verwandte ich das Oxalatplasma von Schweineblut.

Oxalatplasma. Das Gemisch von 200 ml 0,7%iger Kochsalz- und 100 ml 2%iger Na-Oxalatlösung wurde auf dem Schlachthofe unter mässigem Rühren mit Schweineblut auf 1 l aufgefüllt. Im Laboratorium wurde das Blut im Kühlraum (0° C) abzentrifugiert. Ich erhielt 500 ml Plasma.

Fällung durch Ammoniumsulphat. Dem kalten Plasma wurde 125 ml gesättigter Ammoniumsulphatlösung in kleinen Portionen zugefügt (0,20 Sättigung). Der Niederschlag wurde in der Kälte abzentrifugiert, sodann in dem Gemische von 90 ml 0,7 %iger NaCl- und 10 ml 2%iger Na-Oxalatlösung aufgelöst. Der kuchenartige Niederschlag löst sich langsam bei andauerndem Digerieren. Die erhaltene trübe Lösung wird durch Zentrifugieren geklärt.

Tricalciumphosphatadsorption. 100 ml 10 %iger Trinatriumphosphatlösung wurden 100 ml 10%iger CaCl₂-Lösung zugefügt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, sodann in der Zentrifuge mit dest. Wasser

zweimal ausgewaschen, schliesslich in 0,7%iger NaCl-Lösung so suspendiert, dass das Gesamtvolumen 150 ml betrug. Das Fibrinogen wurde aus seiner Lösung in NaCl an 25 ml frisch bereitetem Tricalciumphosphatgel adsorbiert. Nach dem Hinzufügen des Phosphatgels zentrifugiert man die Lösung. Das das Fibrinogen mit sich führende Phosphatgel wurde mit 50 ml 0,7%iger NaCl-Lösung in der Zentrifuge gewaschen, das Fibrinogen mittels 80 ml eines Gemisches von gleichen Teilen M/5 primären und sekundärem Phosphats eluiert.

Zweite Fällung durch Ammoniumsulfat. Zwecks weiterer Reinigung wurde das Fibrinogen aus dieser Phosphatlösung mit einer $\frac{1}{4}$ Vol. gesättigter Ammoniumsulfatlösung (0,20 Sättigung) aufs Neue gefällt, sodann wurde der Niederschlag nach Abzentrifugieren in 30 ml des oben erwähnten Phosphatpuffers unter andauerndem mässigem Digerieren aufgelöst. In der Regel erhielt ich eine wasserklare Lösung.

Die quantitativen Daten der Isolierung werden durch folgende Tabelle veranschaulicht.

	Fibrinogen mg in 1 ml	Fibrinogen %	Ausbeute an Fibrinogen
Oxalatplasma	3,6	10	1,800 g
Nach der ersten Ammoniumsulfatfällung	12,5	50	1,250 g
Nach der Ca-Phosphatadsorption	8,2	88,6	0,660 g
Nach der zweiten Ammoniumsulfatfällung	12,6	96,5	0,380 g

Bemerkt sei, dass von den Angaben dieser Tabelle oft auch grössere Abweichungen möglich sind, indem bereits die erste NaCl-Lösung nicht nur 50, sondern auch 65% Fibrinogen enthalten kann. Durch die Adsorption und Eluation vermag die Reinheit in der Regel 88—90% zu erreichen, wogegen dieselbe im letzten Schritte im allgemeinen 96—98% beträgt. Erwähnenswert ist, dass das Tricalciumphosphatgel unter den besprochenen Umständen aus der NaCl-Lösung 80% des Fibrinogens adsorbiert, wobei der Reinheitsgrad auf der Oberfläche des Adsorbens 80% ist.

Kristallisierung. Giesst man 10 ml der im letzten Schritte gewonnenen Lösung in die 10fache Menge dest. Wassers von 38—40° C, dann scheidet sich das Fibrinogen während des Abkühlens im Eisschranke in der Form eines schneeweissen flockigen Niederschlags ab, der unter dem Mikroskope aus

nadelförmigen Kristallen besteht.¹ Nach dem Abzentrifugieren löst sich der Niederschlag bei gelindem Erwärmen (38° C) in 8 ml Phosphatpuffer obiger Zusammensetzung langsam auf. Beim Impfen mit Thrombin gerinnt die Lösung. 1 ml dieser Lösung enthält 7,4 mg Fibrinogen und 7,4 mg Gesamteiweiss, d. h. das in der Lösung befindliche Fibrinogen hat sich vollständig in Fibrin umgewandelt. Diese Lösung ist auf die vorhergehende Weise aufs Neue kristallisierbar, die neuen Kristalle sind indessen schwerer löslich, was darauf hinweist, dass das Fibrinogen sich einigermaßen verändert hat.

Fibrinogenbestimmung.

Wir bestimmten das Fibrinogen durch Wägen des auf Einwirkung von Thrombin entstandenen Fibrins. Zu diesem Zwecke wird die zu untersuchende Lösung in ein abgewogenes Zentrifugenröhrchen (65 × 11 mm) gefüllt und durch Hinzufügen von Phosphatpuffer und Wasser auf das entsprechende pH und die nötige Salzkonzentration gebracht. Dann wird dem Gemisch Thrombinlösung zusetzt (Lösung A). Binnen einigen Minuten vollzieht sich die Umwandlung des Fibrinogens. Das nach weiteren 10—15 Minuten entstandene Fibrin ist mittels Spatel von der Röhrchenwand leicht ablösbar und zu einer flachen Masse knetbar. Nach mehrmaligem gründlichen Waschen mit NaCl-Lösung und danach mit Wasser trocknet man das Fibrin in den Röhrchen und wägt. Bei der Bestimmung des Fibrinogengehalts des Oxalatplasmas wird zwecks Erreichung des entsprechenden pH 1 ml Plasma 1 ml M/5 primäres K-Phosphat und 1 ml Wasser zugesetzt. Im Falle der Fibrinogenlösung in NaCl fügt man 1 ml Lösung 1 ml M/5 Phosphatpuffer (primär : sekundär = 3 : 1) und Wasser zu. Den Lösungen, in denen das Fibrinogen sich in einem Phosphatpuffer befindet, wird den zu bestimmenden 1 ml Fibrinogenlösung primäres Phosphat und 1 ml Wasser zugegeben. Bei solchen Zusammenstellungen löst sich das Fibrin von der Gefässchenwand leicht ab und kann mit einer Spatel zu einer flachen Masse gedrückt werden. Die Daten der Tabelle zeigen die auf diese Weise entstandenen und gewogenen Fibrinmengen. Das in den Lösungen befindliche Gesamteiweiss wird mittels warmer Trichloressigsäure ausgefällt und sein Gewicht

nach gründlichem Waschen des Niederschlags mit Wasser und darauffolgendem Trocknen in den tarierten Rörchen bestimmt.

Thrombinherstellung.

Das für die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin verwandte Thrombin wurde analog der oben besprochenen Schweineplasmaherstellung aus Rinderoxalatplasma gewonnen. Bei der Thrombinherstellung verfuhr ich im wesentlichen nach der Methode von Astrup.² Ich goss 1 l Plasma in die 10fache Menge angesäuerten dest. Wassers; der Niederschlag setzte sich bei 0° C über Nacht ab. Nach dem Zentrifugieren löste ich diesen in calciumfreier Ringerscher Lösung (300 ml) auf und liess ihn nach Hinzufügung von CaCl₂ und Hirnextrakt (s. Astrup) gerinnen. Nach Auspressen und Entfernung des entstandenen Fibrins diente die auf diese Weise gewonnene Lösung bei einem grossen Teil der Versuche als Thrombinlösung (Lösung A). Wird in einer solchen Thrombinlösung mittels 2 Vol. Aceton bei Zimmertemperatur ein Niederschlag erzeugt und dieser abzentrifugiert, sodann aus diesem mit 80 ml einer 0,7%iger NaCl-Lösung das Thrombin herausgelöst, so kann eine etwa 10fache Reinigung erzielt werden. Dialysiert man die auf solche Art gewonnene gereinigte Lösung gegen dest. Wasser, dann entsteht ein Niederschlag, der sich in einigen ml Ringerscher Lösung gut löst und starke Thrombinaktivität aufweist (Lösung B), Fibrinogen jedoch nicht allein zum Gerinnen bringt, vielmehr solches auch auflöst.

Kinetik der Thrombinwirkung.

Zeitlicher Verlauf der Reaktion. Mittels Zugabe von Kaliumpermanganat kann die Fibrinogenumwandlung zu jedem Zeitpunkte zum Stillstand gebracht werden. Das bis dahin entstandene Fibrin kann auf die oben beschriebene Weise von dem unveränderten Fibrinogen getrennt und getrocknet abgewogen werden. An Hand dieses einfachen Verfahrens kann auch der zeitliche Verlauf der Reaktion verfolgt werden. Nachstehender Versuch bezweckt eine solche Untersuchung: In abgewogene Zentrifugenrörchen füllte ich 2 ml Fibrinogenlösung (enthaltend 9,2 mg Fibrinogen) und 1 ml dest. Wasser. Nach

dem Hinzufügen und Vermischen mit 0,3 ml 3fach verdünnter Thrombinlösung (Lösung A) stellte ich mittels 0,5 ml N/10 Kaliumpermanganatlösung die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten ab. Nach dem Zusetzen des Permanganats drückte ich das entstandene Fibrin zusammen, währenddessen sich das Permanganat mit der Flüssigkeit vermischt, und die Reaktion zum Stillstand kam. Die Flüssigkeit wurde vom Fibrin abpipettiert, das Fibrin auf der bereits erwähnte Weise gewaschen, getrocknet und gewogen. Das Abstellen der Reaktion ist

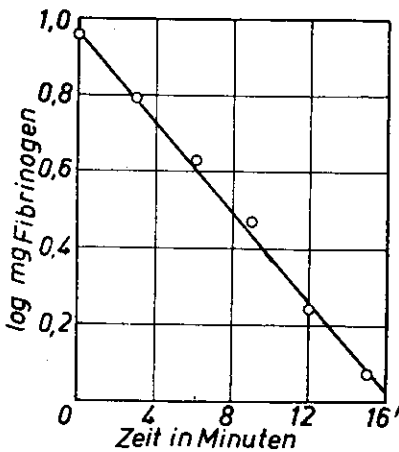


Abb. 1.

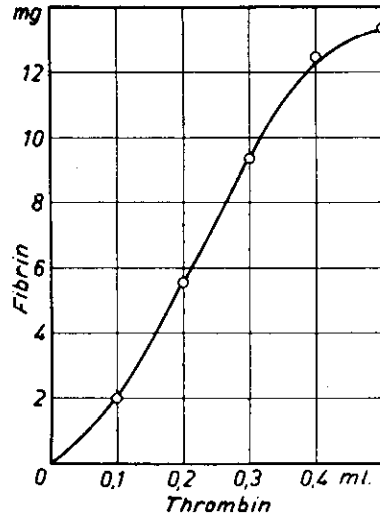


Abb. 2.

auf diese Weise binnen 15–20 Sekunden durchführbar. Abb. 1 zeigt das Versuchsergebnis: auf die Ordinate sind die Logarithmen der nicht umgewandelten Fibrinogenmengen in mg aufgetragen, während die Abszisse die bis zum Abstellen mittels Permanganat verstrichene Reaktionszeit angibt. Wie auf der Abbildung ersichtlich, scheint die Fibrinogenumwandlung, oder zumindest die Fibrinausscheidung — wie die Eiweißdenaturierungsreaktionen im allgemeinen — den monomolekularen Reaktionsstypus zu befolgen.

Einfluss der Thrombinmenge auf die Reaktion. Abb. 2 zeigt, wieviel Fibrin von verschiedenen Thrombinmengen aus der Fibrinogenlösung in gleichen Zeiten hergestellt werden. Der Versuch war in folgender Weise zusammengestellt. Ich beschickte auf die vorhergehende Weise kleine Zent-

rifugierröhrchen mit 1 ml Fibrinogenlösung (enthaltend 16,6 mg Fibrinogen), 1 ml M/5 primärem Phosphat und 1,5 ml dest. Wasser und mit wechselnden Mengen Thrombin; in das eine Röhrchen kam 0,5 ml Thrombinlösung (Lösung A), in das andre 0,4 ml Thrombinlösung + 0,1 ml Ringersche Lösung usw. Nach dem Hinzufügen der Thrombinlösung stellte ich die Reaktion nach 13 Minuten mittels 1 ml der beschriebenen Permanganatlösung ab. Auf der Abbildung stellt die Ordinate das entstandene Fibrin in mg, die Abszisse die Thrombinmengen dar. Die ergebnisse zeigen, dass die entstandene Fibrin-

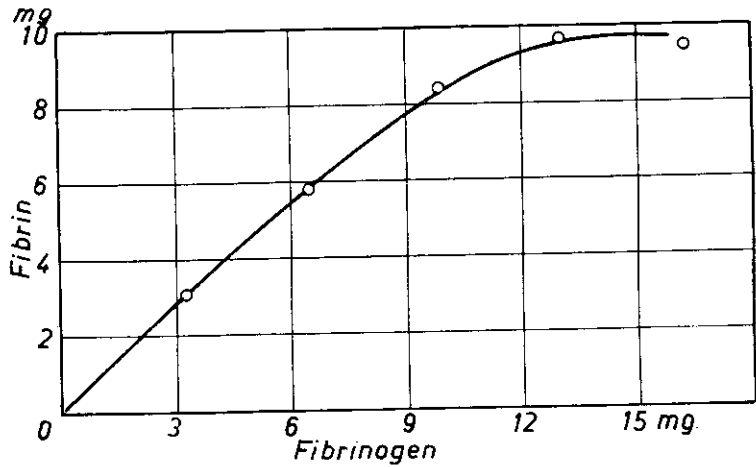


Abb. 3.

menge bis zu einer gewissen Grenze in geradem Verhältnis zu der zugefügten Thrombinmenge steht.

Einfluss der Fibrinogenmenge auf die Reaktion. Ähnlich dem vorhergehenden Versuche zeigt Abb. 3 wieviel Fibrin aus verschiedenen Fibrinogenmengen auf die Wirkung gleicher Thrombinmengen hin entsteht. Ich pipettierte in kleine Zentrifugieröhrchen 1 ml (enthaltend 16,3 mg Fibrinogen) und 0,8, 0,6, 0,4 ml Fibrinogenlösung und füllte diese in allen Gefäßen mit Phosphatpufferlösung auf 1 ml auf. Nach Hinzufügen von 1 ml M/5 primärem Phosphat und 1 ml dest. Wasser wurde dem Gemisch 0,2 ml Thrombinlösung (Lösung A) zugesetzt. Jedes Röhrchen wurde 5 Minuten nach dem Beimischen von Thrombinlösung mittels Permanganat versetzt.

Auf der Abbildung zeigt die Ordinate das entstandene Fibrin in mg, die Abszisse die Fibrinogenausgangsmengen in mg.

Alle diese Versuche weisen auf das enzymartige Verhalten des Thrombins hin, allein die endgültige Entscheidung der Frage ist ohne Isolierung des Thrombins nicht möglich.

Fibrinolyse. Die fibrinlösende Wirkung von Thrombinpräparaten wird von nachstehendem Versuche veranschaulicht. Ein kleines Zentrifugierröhrchen wird mit 0,3 ml Fibrinogenlösung (4 mg Fibrinogen enthaltend), 0,3 ml M/5 primären Phosphat, 0,6 ml dest. Wasser und 0,5 ml gereinigter und konzentrierter Thrombinlösung (Lösung B) beschickt. Das Fibrinogen gerinnt binnen einigen Sekunden. Setzt man nunmehr dieses, das geronnene Fibrinogen enthaltende Röhrchen in ein Wasserbad von 45° C, dann löst sich das Fibrin binnen 1—1½ Stunden vollständig auf. Das gelöste Fibrin koaguliert nach dem Zusetzen weitem Thrombins nicht aufs Neue. Scheinbar ist diese lösende Wirkung des Thrombins ganz spezifisch für Fibrin, denn bringt man die Fibrinogenlösung obiger Zusammensetzung durch Wärme zur Gerinnung, dann löst sich das gefällte Fibrinogen durch Thrombin nicht auf. In gleicher Weise bleibt auch das durch Trichloressigsäure gefällte und gewaschene Fibrinogen unlöslich.

Die Absorptionsspektren von Fibrinogen und Fibrin.

Die Fibrinogenlösung gerinnt bei pH 6,2 auf die Wirkung von Thrombin hin zu einer undurchsichtigen weissen Masse. Bei pH 7,2 bleibt Fibrin in M/5 Phosphatpufferlösung vollkommen durchscheinend, nur eine geringe Zunahme der Trübung ist zu beobachten. Unter solchen Umständen ist auch das Ultraviolettabsorptionsspektrum des Fibrins messbar. Das Absorptionsspektrum des Fibrinogens und des Fibrins wurde von P Csokán aufgenommen.³ Die Versuche erwiesen, dass das Fibrinogenspektrum im allgemeinen die Eigenschaften der Eiweisspektra aufweist: einen Absorptionsstreifen bei 279 $\mu\mu$ und eine Reugung bei 255 $\mu\mu$. Das Fibrinspektrum zeigt nebst den in Fibrinogen erscheinenden Streifen auch das Auftreten eines neuen Streifens: einen niedrigen solchen um 400 $\mu\mu$ herum. Aus dem Auftreten dieses neuen Maximums kann man bezüglich der

Struktur des Fibrins einen interessanten Schluss ableiten. Nach KISS u. MITARB.⁴ tritt bei den Schiff'schen Basen vom Typus *a* unserer Abb. 4 in Fällen, in denen der Stickstoff der Azomethingruppe ($-\text{HC}=\text{N}-$) durch Vermittlung einer Wasserstoffbindung an eine OH-Gruppe gebunden ist, neben den Streifen der Azomethingruppe ein neuerer Streifen auf; als Reaktion der durch die Wasserstoffbindung gestörten Azomethingruppe erscheint dieser Streifen genau auf derselben Stelle wie der oben erwähnte neue Streifen des Fibrins.

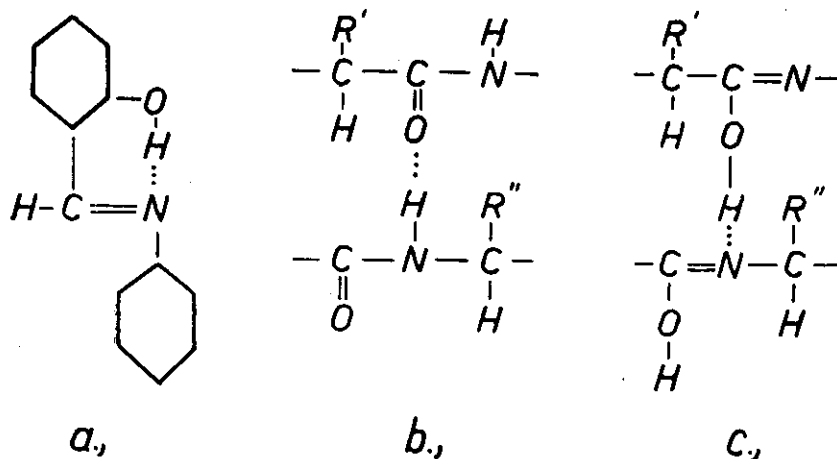
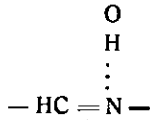


Abb. 4.

Auf der Abbildung 4. zeigt die Formel *b* zwei Polypeptidkettenstücke, wie sie sich im Eiweissmolekül mittels Wasserstoffbindungen verbinden. Nach den Infrarotabsorptionsuntersuchungen von RODEBUSH u. MITARB.⁵ kommt diese Wasserstoffbindung zwischen der NH-Gruppe und dem Carbonyl zustande.

Ordnet man die Doppelbindungen nach Formel *c* um, dann erhält man in der Polypeptidkette genau die gleiche Struktur bzw. Umlagerung, die nach BERGMANN⁶ auf der Oberfläche der peptidspaltenden Enzyme zustande kommt. Die dergestalt umgebildete Formel enthält zugleich genau dieseibe Atomgruppierung, die bei den vorhin erwähnten Schiff'schen Basen den auf das Auftreten der Wasserstoffbindung hinweisenden neuen Streifen hervorbringt.



Die Analogie würde, soweit sie zutreffend ist, zeigen, dass beim Umwandeln des Fibrinogens in Fibrin diese Umlagerung der Doppelbindungen stattfindet. Als Folge der Umlagerung würde mit den in die Polypeptidkette geratenen Doppelbindungen einigermassen eine Versteifung sowie eine Verkürzung der Kette einhergehen. Nach den Röntgenuntersuchungen von KATZ u. ROOY⁷ ist die Identitätsperiode im orientierten Fibrinfaden entlang dem Faden 6,7 Å anstatt 7,0 Å.

Zusammenfassung.

In gereinigten Fibrinogenlösungen bewirkt Thrombin eine vollständige Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. Die Umwandlung scheint eine monomolekulare Reaktionstypus zu befolgen. „Fibrinolysin“ macht einen scharfen Unterschied zwischen Fibrin und wärmedenaturiertem Fibrinogen. Das Ultravioletabsorptionsspektrum des Fibrins zeigt neben den Absorptionsstreifen des Fibrinogens auch einen neuern Streifen, der auf das Auftreten von Wasserstoffbindungen von gewissem Typus hinweist.

Literatur.

1. K. Laki, Z. physiol. Chem., 273, 95, (1942).
2. T. Astrup, S. Darling, J. Biol. Chem., 133, 761, (1940).
3. P. Csokán, K. Laki, Z. physik. Chem., A, 190, 278 (1942).
4. Á. v. Kiss, G. Auer, Z. physik. Chem., A, 189, 344 (1941).
5. A. M. Buswell, I. R. Downing, W. H. Rodebush, J. Amer. Chem. Soc., 62, 27559, (1940).
6. M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton, F. Schneider, H. Schleich, J. Biol. Chem., 109, 325, (1935).
7. I. R. Katz, A. de Rooy, Naturwiss., 21, 559 (1933).