

Enzymaktivität mit der Thiobarbiturat-Methode nach WARREN¹⁶ in üblicher Weise bestimmt.

Ergebnisse. Die Ergebnisse der Neuraminidase-Aktivitätsbestimmungen nach Einwirkung von H_2O_2 verschiedener Konzentration auf die Neuraminidasen sind aus den Figuren 1 und 2 zu ersehen. Bei allen drei bakteriellen Neuraminidasen findet sich zwar bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen von 1,5% eine Enzyminaktivierung. Bei *V. cholerae*- und *Cl. perfringens*-Neuraminidase beeinflussten schon Konzentrationen von 0,1% H_2O_2 die Enzymaktivität nicht mehr merklich, bei *P. multocida* allerdings war erst bei weniger als 0,01% H_2O_2 die Enzymaktivität nicht mehr erniedrigt. Aber darüber hinaus ergab sich die überraschende Beobachtung, dass zwar bei etwas verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen für die einzelnen Enzyme doch gleichlaufend in der Tendenz bei allen untersuchten Neuraminidasen eine deutliche Aktivierung durch niedrige Wasserstoffperoxid-Konzentrationen erfolgt, was aus der Tatsache deutlich wird, dass die H_2O_2 -freie Enzymkontrolle (als Nullwert bei den Kurven aufgetragen) stets wesentlich niedrigere Aktivität aufwies als die H_2O_2 -haltigen Proben. Und zwar liegt das Optimum der Enzymaktivierung für *Cl. perfringens* und für *V. cholerae* etwa bei 0,01% H_2O_2 , für *P. multocida* bei etwa 0,002% H_2O_2 .

Diskussion. Die vorliegenden Untersuchungen über den Einfluss von H_2O_2 auf die Neuraminidase-Aktivität wurden als Modellsysteme an den zur Zeit verfügbaren bakteriellen Neuraminidasen durchgeführt, um das besonders bei Mykoplasmen wichtige Zusammenwirken der beiden Pathogenitätsfaktoren Neuraminidase und Wasserstoffperoxid zu studieren. Ob bei den katalasehaltigen Neuraminidase-Bildnern wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium acnes*, *Pasteurella multocida* und *Vibrio cholerae* dieser synergistische Effekt des H_2O_2 auf die Neuraminidase eine geringere Rolle spielt als bei den Katalase-negativen Keimen wie *Bacteroides fragilis* und anderen Neuraminidase-positiven Keimen der Bacteroides-Gruppe⁹, *Clostridium perfringens* und andere Neuraminidase-positive Closteriden der Gasödemgruppe, *Diplococcus pneu-*

moniae, *Erysipelothrix insidiosa* und nicht zuletzt bei *Mycoplasma gallisepticum* muss offenbleiben, denn die hier studierten in vitro-Systeme werden durch die in vivo-Verhältnisse überlagert. Hier aber entsteht ebenfalls Wasserstoffperoxid, so etwa bei der Oxidation reduzierter Flavon-Systeme, das dann durch die im Makroorganismus meist vorhandene Katalase oder Peroxidase metabolisiert wird. Mit grosser Wahrscheinlichkeit wird daher die Aktivität der bakteriellen Neuraminidasen durch H_2O_2 auch innerhalb des Makroorganismus erhöht. In diesem Sinn ist auch der Befund zu deuten, wonach etwa die *P. multocida*-Neuraminidase bei geringeren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen aktiviert wird. Entsprechend verfügt *P. multocida* selbst über Katalase und trägt damit zu einem relativ niedrigen H_2O_2 -Gehalt selbst bei. Umgekehrt besitzt *Clostridium perfringens* keine Katalase und die Aktivierung durch H_2O_2 erfolgt bei etwas höheren H_2O_2 -Konzentrationen. Bei *V. cholera* schliesslich ist zwar eine bakterieneigene Katalase vorhanden, aber im Darm ist der Katalase-Gehalt vergleichsweise geringer als im infizierten Wundgewebe.

Summary. The activity of bacterial neuraminidasen can be influenced by H_2O_2 secreted by some organisms. Thus, at low H_2O_2 concentrations (0.002–0.01%), an increase of neuraminidase activities was observed, whereas at concentrations 0.1% the enzyme activities were destroyed.

H. E. MÜLLER und K. K. SETHI

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität,
D-53 Bonn-Venusberg 1 (Deutschland),
25. August 1971.

¹⁶ L. WARREN, J. biol. Chem. 234, 1971 (1959).

Antifibrinolytic Properties of Basic Proteins

Amongst many various biological properties of basic proteins, their action upon the blood haemostasis attracts particular attention. The heparin neutralizing effects of basic proteins of thrombocytes¹ and leukocytes² have been shown. These proteins, similarly to protamine sulphate, precipitate from plasma in a non-enzymatic manner soluble complexes of fibrin monomers and fibrinogen, degradation product of fibrinogen and fibrin and also fibrinogen itself^{1,3}.

Recently it has been shown that basic proteins of thrombocytes, leukocytes and various tissues and mainly histones interact with soluble complexes of fibrinogen-fibrin monomers and form molecular aggregates of various size and organisation and enhanced the clot formation. This effect can be inhibited by addition of acid mucopolysaccharides such as heparin and chondroitin sulphate³, which neutralized these effects of basic proteins. One can suppose that basic proteins are not only incorporated into the structure of a thrombin-induced clot but they also alter this structure. According to several authors, a changed structure of the clot of desmofibrin^{4,5} and the clot changed by synthetic antifibrinolytica^{5,6} are more resistant to the plasmin proteolytic action.

On the basis of these observations, in the present report the authors attempt to answer the question whether basic proteins exhibit antifibrinolytic properties or not.

Table I indicates that both histones and protamine possess a marked antifibrinolytic action dependent on the concentration of these basic proteins. At the same concentrations, histones and protamine do not inhibit the fibrin proteolysis when measured by the increase of TCA-soluble tyrosine. The assay of arginine in the fibrin clot showed greater amounts of this amino acid in samples in which fibrinogen was clotted in the presence of histones and prot-

¹ S. NIEWIAROWSKI, A. POPLAWSKI, B. LIPINSKI and R. FARBISZEWSKI, Expl. Biol. Med. 3, 121 (1968).

² H. J. SABA, H. R. ROBERTS and J. C. HERION, Blood 31, 369 (1968).

³ M. KOPEC, S. WĘGRZYŃOWICZ and Z. S. LATALLO, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135, 675 (1970).

⁴ J. GORMSEN, A. P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S. SHERRY, Arch. Biochem. Biophys. 120, 654 (1967).

⁵ H. LUKASIEWICZ and S. NIEWIAROWSKI, Thromb. Diath. haemorrh. 19, 584 (1968).

⁶ R. E. MAXWELL and D. ALLEN, Nature, Lond. 209, 211 (1966).

Table I. The effect of histones and protamine sulphate on fibrinolysis and proteolysis of fibrin by plasmin

Histones, protamine (final concentration mg/ml)	Fibrinolysis time (min)		Proteolysis (tyrosine μ g/ml)	
	Histones	Protamine	Histones	Protamine
2.5	120.0	26.0	25.0	24.0
2.0	75.0	26.0	25.0	23.0
1.5	55.0	20.0	24.0	23.2
1.0	35.0	14.0	23.0	24.0
0.5	18.0	8.0	23.5	22.0
0.25	6.0	8.0	22.0	22.0
0.125	5.0	5.0	21.9	22.0
0.0		5.0	23.0	

Fibrinolysis test system: 0.2 ml of histones or protamine + 0.2 ml of plasmin 0.1% + 0.2 ml of FSF-free fibrinogen⁹ 0.35% + 0.2 ml of thrombin 10 U/ml. Proteolysis test system: 0.5 ml of plasmin 0.1% + 0.5 ml of histones or protamine + 0.5 ml of FSF-free fibrinogen 0.35% + 0.5 ml of thrombin 10 U/ml. After 15 min incubation at 37°C, 1 ml of TCA was added and the amount of TCA-soluble tyrosine in the supernatant was estimated¹⁰.

amine, whereas the increase in tyrosine was observed only when histones were added (Table II). The increase of arginine was closely related to the concentration of these proteins and was higher when protamine was added. This can be explained by the fact that protamine contains more arginine than histones. When only protamine was added, no increase in tyrosine was found because protamine does not contain this aminoacid.

The results of the present report have shown that though histones and protamine exhibit high antifibrinolytic properties, they do not inhibit the proteolytic activity of plasmin. The antifibrinolytic action of histones and protamine seems to be brought about by building-up these proteins into the fibrin clot and by modification of its structure making the clot resistant to the fibrinolytic action of plasmin.

Recently it has been suggested that basic proteins which are widely distributed in mammalian tissues, and which might be released into circulation, may be an important factor contributing to the formation and deposition of fibrin-like material in clinical conditions⁷. It may be connected with the destruction of tissues from the disintegrated tumor cells, necrotic cells, damage of granulocytes and intravascular formation of platelet aggregates^{1,3,8}. In such cases, basic proteins by building-up into the structure of clot, exhibit the antifibrinolytic properties.

Table II. Built-up histones and protamine sulphate to the structure thrombin-clotted fibrin evaluated with arginine and tyrosine

Histones, protamine (final concentration mg/ml)	Arginine (μ g/ml)		Tyrosine (μ g/ml)	
	Histones	Protamine	Histones	Protamine
2.5	333.0	390.0	37.0	30.0
2.0	315.0	372.0	35.5	29.5
1.5	298.0	361.0	32.9	30.0
1.0	292.0	329.0	31.0	29.8
0.5	281.0	293.0	30.5	28.5
0.25	262.0	285.0	29.8	29.0
0.125	241.0	250.0	28.4	28.0
0.0		240.0		29.0

Test system: 1 ml of FSF-free fibrinogen 0.33% + 1 ml histones or protamine + 2 ml of thrombin 5 U/ml was incubated at 37°C for 30 min. The clot after separation was solubilized by heating in 2 ml of 2 N NaOH at 100°C for 5 min and amount of arginine¹¹ and tyrosine was estimated.

Zusammenfassung. In-vitro-Versuche über basische Eiweisskörper zeigen, dass Protamine und Histone in die Struktur des unter Thrombin-Einfluss entstehenden Fibrins eingebaut werden. Einbau basischer Proteine führt zur Änderung der Fibrinstruktur und zur Widerstandserhöhung auf die Plasminwirkung. Es scheint, dass die basischen Proteine die fibrinolytische Aktivität des Plasmins spezifisch hemmen.

K. WOROWSKI, R. FARBISZEWSKI and W. RZECZYCKI

Department of Biochemistry,
Institute of Physiology and Biochemistry, Medical School,
Białystok (Poland), 30 April 1971.

⁷ G. S. STEWART and S. NIEWIAROWSKI, *Thromb. Diath. haemorrh.* 25, 566 (1971).

⁸ J. HAWIGER, R. D. COLLINS and R. G. HORN, *Proc. Soc. exp. Biol.* 131, 349 (1969).

⁹ R. A. KERWICK, M. E. MACKAY, M. H. NANCE and B. R. RECORD, *Biochem. J.* 60, 671 (1955).

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

¹¹ R. FARBISZEWSKI, K. WOROWSKI and W. RZECZYCKI, *Analyt. Chem.* 17, 133, (1972).

The Effect of Antamanide and Perhydroantamanide on the Permeability of Model and Biological Membranes

The cyclic decapeptide antamanide from *Amanita phalloides*¹ is attracting considerable attention as an inhibitor of phalloidine and amanitins (the toxic principles of the toadstool *Amanita phalloides*) and as a K⁺ and Na⁺ complexone with marked preference for Na⁺². This complexing peculiarity of antamanide indicated its possible use as selective promoter of Na⁺-flow through membranes, an application of considerable interest as no substances

have as yet been found that could serve as such an instrument in membrane study. Accordingly we investigated the action of antamanide on a variety of model membranes, monolayers, bilayers, liposomes and on mitochondria and also determined its antimicrobial activity. A similar study was also carried out of perhydroantamanide, a compound obtained from antamanide on hydrogenation over an Adams catalyst³ so that it possessed L- α -cyclohexyl-