

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 311—313, Mai 1970

Zur Frage von Antigenbeziehungen des C-reaktiven Proteins zu normalen Lipoproteiden und zur β_{1C} -Fraktion

Von HILDE GÖTZ und F. SCHEIFFARTH

Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg

(Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth)

(Eingegangen am 15. Januar 1970)

Vergleichende immunochemische Analysen der Immunpräzipitate von C-reaktivem Protein jeweils mit α_1 -Lipoprotein, α_2 -Lipoprotein, β_1 -Lipoprotein sowie mit β_{1C} -Globulin, haben ergeben, daß C-reaktives Protein mit keiner der genannten Serumfraktionen eine Antigenverwandtschaft aufweist.

The question of antigenic relationships between C-reactive protein and normal lipoproteins and β_{1C} -protein

Comparative immunochemical analyses of immunoprecipitates of C-reactive protein with each of α_1 -lipoprotein, α_2 -lipoprotein, β_1 -lipoprotein as well as with β_{1C} -protein have shown that none of these serum fractions possesses antigenic relationship to C-reactive protein.

Im Präzipitatemuster eines immunoelektrophoretisch differenzierten CRP-positiven Serums findet sich bei Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums das C-reaktive Protein (CRP) als langgestreckte, zumeist scharf gezeichnete Linie im Bereich des γ -Immunglobulin-Systems (Abb. 1); diese Linie verläuft nahezu

reits antigene Beziehungen zwischen C-reaktivem Protein und dem — elektrophoretisch — benachbarten β_{1C} -Protein¹⁾ bestehen.

Zur Klärung dieser Fragen wurden nachfolgend beschriebene, vergleichende immunochemische Analysen vorgenommen.

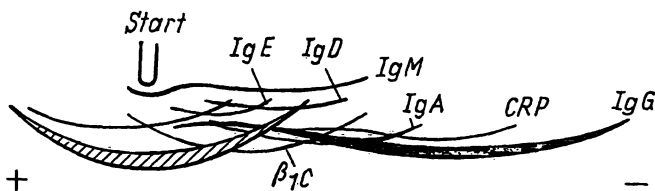


Abb. 1

Halbschematische Darstellung der Präzipitate des β/γ -Globulin-Systems eines immunoelektrophoretisch differenzierten menschlichen Serums.
CRP = C-reaktives Protein

parallel zum IgG-Präzipitattbogen; sie weist keinerlei partielle oder totale immunologische Identitätsreaktionen mit benachbarten β - oder γ -Fraktionen auf (1—15).

In der einschlägigen Literatur wird, dessen ungeachtet, immer wieder auf Assoziierungsphänomene des C-reaktiven Proteins mit Lipoiden des menschlichen und experimentell gewonnenen C-reaktiven Proteins des Kaninchens mit entsprechenden Lipoiden hingewiesen (14, 16—19), ohne daß diese Frage bis heute neu aufgegriffen und völlig geklärt worden wäre. Außerdem ist bekannt, daß C-reaktives Protein bei der spezifischen CRP-Anti-CRP-Reaktion Komplement bindet, worauf die in der älteren Immunologie angewandte Komplementbindungsreaktion zur quantitativen Bestimmung des C-reaktiven Proteins gegründet war (in 18, 20, 21). Von anderer Seite wurde allerdings festgestellt, daß weder zur Präzipitation von C-Polysaccharid und C-reaktivem Protein noch zur Präzipitation von C-reaktivem Protein und spezifischem Anti-CRP Komplement erforderlich ist (in 18). Hier interessiert, ob be-

Untersuchungsgut, Versuchsordnung und Methodik

Untersuchungsgut

Es wurden 24 CRP-positive Seren, die mit der üblichen Anti-CRP-Latex-Technik für CRP-positiv befunden wurden, darunter 4 stark lipämische Seren, untersucht. Die Seren stammten von Patienten mit primär-chronischer Polyarthrit (mit akuten Schüben), asthmoider Bronchitis, Hepatitis epidemica sowie von zwei Patienten mit γ G-Myelom.

Versuchsordnung

Die verschiedenen Seren wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Immuno-Doppeldiffusion im Agargel unter Verwendung monovalenter Antiseren gegen α_1 -Lipoprotein, α_2 -Lipoprotein, β_1 -Lipoprotein sowie β_{1C} -Protein mit nachfolgender Lipoprotein-färbung analysiert. Dabei wurde die Anordnung von Serum- und Antiserumproben so getroffen, daß das spezifische CRP-Anti-CRP-Präzipitat jeweils mit dem Präzipitat einer der für die vergleichenden Analysen gewählten Serumfraktionen in unmittelbare Beziehung gebracht werden konnte (vgl. Abb. 2).

Methodik

Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten beim nüchternen Patienten lege artis durch Punktion einer Armvene unter sterilen Kautelen. Die erwähnten stark lipämischen Seren ergaben sich aufgrund einer pathologischen Hyperlipämie, nicht alimentär.

Zweidimensionale Immuno-Doppeldiffusion im Agargel

Es wurde nach der von OUCHTERLONY (22) beschriebenen Technik vorgegangen. Es wurde ein 1proz. gepufferter²⁾ Agar verwendet.

1) β_{1C} entspricht der hydrazinempfindlichen C' 3a-Komponente des Komplementfaktors C' 3 eines menschlichen Serums.

2) Phosphat-Puffer pH 7,1 (0,15M).

Die Serumproben wurden jeweils in normaler Konzentration, die verschiedenen Antisera gegen α_1 - α_2 - und β_1 -Lipoprotein sowie gegen β_{1C} -Protein ebenfalls in normaler, d. h. in der von der Industrie gelieferten Konzentration, das Anti-CRP-Serum³⁾ in Verdünnungen von 1:8 und 1:16 mit physiol. NaCl-Lösung verwendet. Die Zeit bis zur optimalen Ausbildung der Präzipitationslinien betrug bei 37° zwischen 12 und 36 Stdn. Die Dokumentation erfolgte durch Färbung der Präzipitationslinien mit Amidoschwarz 10 B und Photographie im durchscheinenden Licht.

Lipoproteinfärbung (in l. c. (23))

Die mit den optimal auspräzipitierten Antigen-Antikörper-Systemen ausgestatteten Objektträger-Präparate wurden für 12 Stdn. in 1proz. NaCl-Lösung gelegt. Es wurde hierfür eine Mehrzweck-Küvette (24) verwendet, die ein müheloses Wechseln der Lösung in etwa 2 stdg. Abständen gestattet, ohne daß die Agarschicht vom Objektträger abschwimmen kann. Danach wurden Objektträger-Präparate unter Filterpapier bei 37 bis 40° getrocknet, das Filterpapier durch leichtes Befeuchten mit dest. Wasser entfernt und nunmehr in eine Sudanschwarz B-Färbelösung gelegt.

Sudanschwarz B-Färbelösung

1proz. Sudanschwarz B-Lösung in 60proz. Äthanol. Mehrmals filtrieren. Färbezeit 30 Min.

Entfärben

3mal je 15 Min. in 50proz. Äthanol. Präparat lufttrocknen.

Dokumentation erfolgt durch Photographieren im durchscheinenden Licht.

Ergebnisse

Die Befunde nach zweidimensionaler Immuno-Doppeldiffusion im Agargel geben eindeutig zu erkennen, daß das C-reaktive Protein mit keiner der hier gegenübergestellten Serumkomponente eine immunologische Identitätsreaktion aufweist.

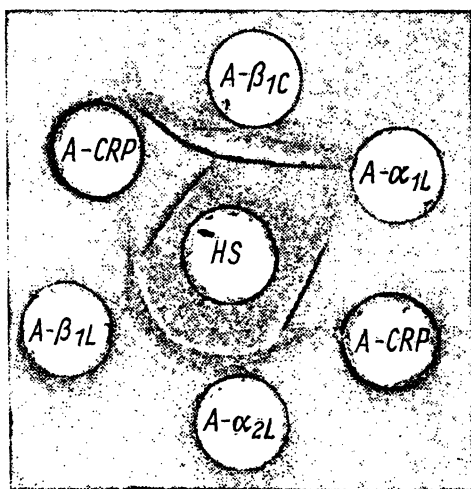


Abb. 2

Befunde der zweidimensionalen Immuno-Doppeldiffusion im Agargel bei vergleichender Versuchsanordnung. Verglichen wurden C-reaktives Protein (CRP) mit α_1 -Lipoprotein (α_{1L}), C-reaktives Protein mit α_2 -Lipoprotein (α_{2L}), C-reaktives Protein mit β_1 -Lipoprotein (β_{1L}) sowie C-reaktives Protein mit β_{1C} -Globulin (β_{1C}) sowie C-reaktives Protein mit β_{1C} -Globulin (β_{1C})
HS = Humanserum; A- = Anti-

³⁾ Sämtliche Antisera wurden von den Behringwerken, Marburg/Lahn bezogen.

titätsreaktion aufweist. Es ergaben sich auch keine Hinweise für nur partielle Identität (Abb. 2). Dies gilt sowohl für die normal beschaffenen als auch für die stark lipämischen Seren.

Nach Behandlung der Immunodiffusions-Präparate mit Sudanschwarz B fand sich eine deutliche Färbung der spezifischen Immunpräzipitate für die α_1 -, α_2 - und β_1 -Lipoproteinfraktionen, nicht aber der Präzipitate des β_{1C} -Globulins und des C-reaktiven Proteins.

Zwischen dem Präzipitat des α_2 -Lipoproteids und dem des β_1 -Lipoproteids ließ sich sowohl mit der Amidoschwarz- als auch mit der Sudanschwarz-Färbung und selbstverständlich auch unter den Nativpräzipitaten eine immunologische Identitätsreaktion nachweisen.

Diskussion

Die Ergebnisse beweisen, daß C-reaktives Protein und Lipoproteide eines menschlichen Serums sowie C-reaktives Protein und β_{1C} -Protein keine immunchemisch faßbare Antigengemeinschaft besitzen. Die eingangs zitierte, in der Literatur immer wieder beschriebene enge Bindung von C-reaktivem Protein an Phosphorlipide (14, 17—19) ist deshalb entweder als reines Anlagerungsphänomen oder als biochemische Reaktion zwischen C-reaktivem Protein und Lipoiden ohne Proteinanteil zu verstehen.

Die Identitätsreaktion zwischen α_2 -Lipoprotein und β_1 -Lipoprotein entspricht einer hinlänglich bekannten Erfahrungstatsache aus der Protein-Immunochemie.

Die Befunde nach Färbung mit Sudanschwarz B lassen den Schluß zu, daß das C-reaktive Protein selbst offenbar kein Lipoprotein darstellt. Physikochemische Analysen weisen in der Tat auch darauf hin, daß gereinigtes C-reaktives Protein weder Lipidanteile noch Phosphor enthält (13, in l. c. 18), dagegen Neuraminsäureester besitzt und die Fähigkeit, mit Mucopolysacchariden Komplexe zu bilden (25—27).

Mit Bezug auf das Verhalten des C-reaktiven Proteins zur β_{1C} -Globulinfraktion darf aufgrund der vorliegenden Befunde zwar die antigene Eigenständigkeit jedes der verglichenen Proteinsysteme als sicher gelten, es kann jedoch aus dem Ergebnis dieser Versuchsanordnung nicht ohne weiteres auf Reaktionsmechanismen hinsichtlich eines Komplementverbrauches beim Ablauf einer spezifischen CRP-Anti-CRP-Reaktion geschlossen werden.

Die Tatsache, daß sich das β_{1C} -Protein nicht mit Sudanschwarz B anfärben ließ, wird durch die Aufklärungsarbeit von MÜLLER-EBERHARD (28) dadurch bestätigt, daß β_{1C} als Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 3% ohne Lipidkomponente dargestellt werden konnte.

Literatur

1. ANZAI, T., K. SATO, M. FUKUDA und C. M. CARPENTER, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y. 120, 94 (1965). — 2. BUSTAMANTE, V., Bull. Soc. chim. biol. Paris, 39, 155 (1957). — 3. BUSTAMANTE, V., J. ARINO und L. M. Y. PNIÉS, Presse méd., Paris 65, 313 (1957). —

4. FERRI, R. G. und W. COSSERMELLI, Arch. Internat. Rheumatol. 1, 493 (1958). — 5. GÖTZ, H., M. PÉREZ-MIRANDA und F. SCHEIFFARTH, diese Z. 7, 275 (1969). — 6. GÖTZ, H. und F. SCHEIFFARTH, Newer findings about C-reactive protein, XVII. Coll. Prot. Biol.

- Fluids, Brügge (1969). — 7. HEDLUND, P. und I. BRATTSEN, a) *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 7, 99 (1955); b) *ibid.* 8, 213 (1956). — 8. HEIDE, K., *Bibl. Haematol.* 12, 245 (1961). — 9. HEREMANS, J., *Les globulines sériques du système gamma*. Arscia S. A., Bruxelles u. Masson et Cie, Paris (1960). — 10. MÜLLER, W., N. KLEINE und M. MATTHES, *Zschr. Rheumaforsch.* 17, 226 (1958). — 11. RILEY, R. F., M. K. COLEMAN und Y. HOKAMA, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 11, 530 (1965). — 12. SCHEIFFARTH, F. und H. GÖTZ, in HENNING, H.: *Praktische Ergebnisse neuer klinischer Forschung*, Schattauer, Stuttgart (1962). — 13. SCHULTZE H. E., G. SCHWICK, J. SONNET, J. HEREMANS und J. L. MICHAX, *Klin. Wschr.* 38, 62 (1960). — 14. WOOD, H. F., M. McCARTY und R. J. SLATER, *J. Exper. Med.* 100, 71 (1954). — 15. ZACH, J. und K. ZIMMERMANN, *Klin. Wschr.* 37, 160 (1959). — 16. KEITEL, W., *Med. Klin.* 57, 1925 (1962). — 17. McCARTY, M., *J. Exper. Med.* 85, 491 (1947). — 18. SCHWARZ, G., *Das C-reaktive Protein*. Fortschr. d. Immunit.forsch. 5, Steinkopff, Darmstadt (1963). — 19. WERNER, B., *Med. Mschr.*, Stuttgart 19, 303 (1965). — 20. MUSHIEL, L. H. und R. J. WEATHERWAX, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.* 87, 191 (1954). — 21. RAPPORT, M. M. und L. GRAF, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.* 93, 69 (1956). — 22. OUCHTERLONY, Ö., *Progr. Allergy*, 5, 1 (1958). — 23. HENNING, N., *Klinische Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Aufl., Urban u. Schwarzenberg, München/Berlin/Wien (1966). — 24. PÉREZ-MIRANDA, M. und H. GÖTZ, *diese Z.* 6, 499 (1968). — 25. HOKAMA, Y., a) *J. Immunol. Baltimore* 98, 521 (1967); b) *ibid.* 98, 529 (1967). — 26. HOKAMA, Y., M. K. COLEMAN und R. F. RILEY, *J. Immunol., Baltimore* 85, 72 (1960). — 27. RILEY, F. R. und Y. HOKAMA, *Science Washington* 132, 1894 (1960). — 28. MÜLLER-EBERHARD, H. J., *Acta Soc. med. Upsal.* 66, 152 (1961).

Priv.-Doz. Dr. Hilde Götz
1 Berlin 19
Spandauer Damm 130