

bransuspension wurde so gewählt, dass im feuchten Präparat auf ein Gesichtsfeld des Phasenkontrastmikroskopes (Wild;  $85 \times 10$ ) ca. 50 Erythrocytenmembranen fielen. In der Regel wurden 2 Ösen der untersuchenden Suspension mit der Öse an der Oberfläche des Objektträgers verteilt. Die nativen und «trypsinisierten» Membranen wurden nach unserer früheren Methode hergestellt<sup>7</sup>.

**Resultate.** Die Perjodsäure löste bis m/500 eine Säureagglutination und eine deutliche optische Verdickung des Randes der Erythrocytenmembranen aus. Die «trypsinisierten» Membranen verhielten sich diesbezüglich ähnlich, aber sie waren etwas kleiner. Ein unerwartetes Phänomen ergaben die nativen Membranen. Sie zeigten im Innern der agglutinierten Massen oder in brückenähnlichen Verbindungen zwischen den Agglutinaten sehr lange spindel-, ziegel- und fadenförmige Auszüge, wie in den Mikrophotographien (Figur 1 und 2) ersichtlich ist.

Auszüge konnten in mit Perjodsäure ähnlich behandelten «trypsinisierten» Erythrocytenmembranen in zahlreichen parallelen Untersuchungen selten beobachtet werden, wie die Tabelle zeigt.

Morphologische Einwirkung von  $HJO_4$  auf Rinder-Erythrocytenmembranen (spindel-, ziegel-, fadenförmig ausgezogene Membranen)

Vorbehandlung der Erythrocyten vor der Herstellung der Membranen	Zahl der Versuche	Keine; fragliche Reaktion	Schwache Reaktion	Starke Reaktion
keine Trypsin	17 10	1 8	6 2	10 0

Ausgezogene Membranen kamen bei den nativen Membranen, in der Regel in mehreren Präparaten einer Versuchsreihe, bei m/2 bis m/500  $HJO_4$  vor. Da diese Reaktion aber in manchen Präparaten ausblieb, musste die Rolle eines mechanischen Faktors – bei der Herstellung der Präparate – angenommen werden. Verschiedene mechanische Einwirkungen wurden vergleichend untersucht. Schütteln mit normalen Glaskügelchen und mit «ballotini» in der Schüttelmaschine bzw. im elektromagnetischen Vibrator (Mickle) förderte die Reaktion; Ultraschallbehandlung zerstörte die Membranen. Zweifellos erschienen weniger «Auszüge», wenn die Suspension an die Oberfläche des Objektträgers mit Kapillarpipette anstelle von Öse aufgetragen und verteilt wurde. Der quantitative Unterschied zwischen nativen und trypsinisierten

Erythrocytenmembranen blieb bei allen Versuchsanordnungen erhalten. Ähnliche Resultate wurden auch mit Menschen- und Schaf-Erythrocytenmembranen erhalten.

**Diskussion.** Der eine von uns nahm auf Grund serologischer Beobachtungen an proteolytisch vorsichtig vorbehandelten Erythrocyten an, dass – im Gegensatz zu früheren Auffassungen – die Oberfläche mit einer lockeren Proteinschicht bedeckt ist<sup>8</sup>. Diese Schicht soll in der grössten Mächtigkeit an der Oberfläche der Rindererythrocyten vorkommen; sie verhindert sterisch die Brückenbildung der Antikörpermoleküle mit den Antigenen bzw. mit den Haptenen, die mit den Proteinen der tiefer liegenden semipermeablen Membran gekoppelt sind. Auf Grund der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass  $HJO_4$  mit der lockeren Proteinschicht der Membranoberfläche reagiert, wodurch diese fadenförmig ausziehbar wird und dadurch indirekt sichtbar gemacht werden kann. Die seltene, morphologisch ähnliche  $HJO_4$ -Reaktion der «trypsinisierten» Erythrocyten wäre darauf zurückzuführen, dass die Oberfläche der Membran bedeckende lockere Proteinschicht nicht bei jeder Trypsinbehandlung restlos entfernt wird.

COFFIN und PICKLES wiesen nach<sup>9</sup>, dass ein Teil der durch Perjodat «zerstörten» D- und S-Antigene durch Trypsinbehandlung der Erythrocyten zu aktivieren ist. Im Lichte der in dieser Arbeit berichteten Befunde kann auch die Frage gestellt werden, ob in den Arbeiten mit «intakten» Erythrocyten jede scheinbare Inaktivierung der Blutgruppensubstanzen auf eine oxydierende Wirkung des Perjodats zurückzuführen ist, oder aber auch eine sterische Hemmung infolge der Reaktion des Perjodats mit der lockeren Proteinschicht der Membranoberfläche eine Rolle spielt<sup>5</sup>.

**Summary.** M/2 up to M/500  $HJO_4$  produces a very peculiar ductility of native erythrocyte membranes, whereas a similar effect is hardly observed on the membranes of trypsin-treated erythrocytes. This observation demonstrates indirectly, probably for the first time, the morphological existence of a loose protein-layer assumed by one of the authors to be present on the surface of erythrocytes<sup>8</sup>.

MARIANN SCHERRER-GERVAI und J. TOMCSIK

Hygiene-Institut der Universität Basel (Schweiz), 10. April 1962.

<sup>8</sup> J. TOMCSIK, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 16, 185 (1960).

<sup>9</sup> S. F. COFFIN und M. M. PICKLES, J. Immunol. 71, 177 (1953).

## Isolierung und Charakterisierung einer Protein-substanz der Erythrocytenoberfläche

MORTON und PICKLES<sup>1</sup> haben beobachtet, dass die Erythrocyten bei schonender proteolytischer Behandlung partiell verdaut werden können, ohne Hämolyse zu erleiden. Die so behandelten Erythrocyten verhielten sich bei der Hämagglutination wesentlich anders als die nicht behandelten. PONDER<sup>2</sup> nahm an, dass durch Trypsinbehandlung der Erythrocyten das Trypsin an der Oberfläche als eine monomolekulare Schicht aufgelagert wird; diese Auflagerung soll in einer späteren Phase zur Auflockerung der Oberfläche führen. TOMCSIK<sup>3</sup> entwickelte

die Hypothese, dass die an der Oberfläche liegende, bei manchen Erythrocyten mächtige, lockere Proteinschicht bereits durch eine kurze enzymatische Verdauung entfernt wird; dadurch werden gewisse enzymresistente Antigenmizellen ohne enzymatischen Abbau der semipermeablen Membran freigesetzt. KLENK et al.<sup>4</sup> beschrieben, dass vom lipoidfreien Bestandteil der Proteine des Rindererythro-

<sup>1</sup> J. A. MORTON und M. M. PICKLES, Nature (Lond.) 159, 779 (1947).

<sup>2</sup> E. PONDER, Blood 6, 350 (1951).

<sup>3</sup> J. TOMCSIK, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 16, 185 (1960).

<sup>4</sup> E. KLENK und W. STOFFEL, Hoppe-Seylers Z. 303, 78 (1956).

cytenstomas Neuraminsäure abgespalten werden kann und als Zellrezeptor fungiert. SPRINGER und RAPAPORT<sup>5</sup> führten die Farbenreaktion, die sie mit Kohlenhydratreagenzien in einer partiellen Lösung der proteolytisch behandelten Rindererythrocyten beobachteten, auf Neuraminsäure zurück. COOK et al.<sup>6</sup> gelang es, durch Trypsinbehandlung nach der Methode von MORTON und PICKLES eine Substanz von der Erythrocytenoberfläche abzulösen. Sie stellten durch Untersuchungen mit UV-Spektren und durch kolorimetrische Bestimmungen fest, dass die Substanz Sialinsäure enthält. Der hohe Stickstoffgehalt der Substanz und die Ninhydrin-positiven Flecken in den Papierchromatogrammen liessen auf ein «Sialomucopепtid» schliessen.

Keine Arbeit konnte in der Literatur gefunden werden, wo an der Oberfläche der Erythrocyten eine Proteinschicht, die mit der Semipermeabilität der Zelle nichts zu tun hat, nachgewiesen wurde. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist, die vermutete Proteinhülle, speziell an der Oberfläche der Rindererythrocyten, wo sie, unserer Annahme nach, in der dicksten Schicht vorhanden sein soll, mit chemischen Methoden nachzuweisen.

**Technik.** Zu 1 vol gewaschener Rindererythrocyten wurden 4 vol einer Trypsinlösung 1:16000 (Trypsin Armour krist.) gegeben. Diese Trypsinverdünnung wurde auf Grund von serologischen Vorversuchen gewählt, in denen die Hämagglutinationaktivierung durch verschiedene Konzentrationen des Trypsins untersucht wurde. 1:16000-Verdünnung des krist. Trypsins verdaut die Oberflächenschicht der Membran selbst in 20% Erythrocytensuspension, ohne dass die Gefahr einer chromatographischen Analyse störenden Trypsinverunreinigung vorhanden wäre. Trypsin wurde in m/15 Sörensen Phosphatpuffer pH 8 und in einem ana Volumen physiologischem NaCl gelöst. Die Suspension der Erythrocyten wurde mit der Trypsinlösung 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und nachher abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit war klar und schwach rosa gefärbt. Sie gab eine negative Biuret-, eine schwache Sulfosalicylsäure-, Trichloressigsäure- und eine positive Ninhydrinreaktion. Phosphat- und Chloridionen waren nachweisbar. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und bei dieser Temperatur mit 3 vol Äthanol/Äther 1:1 ausgefällt. Der entstandene weisse Niederschlag konnte in der Kühlzentrifuge bei 3000 U/min bei 0°C während 20 min abzentrifugiert werden. Er wurde im Vakuumexsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

Die Hydrolyse dieser Substanz wurde in einer eingeschlossenen Ampulle im Ölbad bei 100°C mit kleinen Mengen (10–20 mg) ausgeführt. (Die Hydrolyse mit 8n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gab keine guten Resultate.) Die Hydrolyse mit 6n HCl während 2 h zeigte in den darauffolgenden papierchromatographischen Untersuchungen mit Ninhydrin grosse gelbe Flecken als Hinweis auf Polypeptide. Die Substanz konnte während 6–15 h mit 6n HCl bei 100°C vollständig hydrolysiert werden. Das Hydrolysat wurde zur Entfernung des HCl bei 40°C im Vakuum eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 10prozentigem wässrigem Äthanol aufgenommen. Diese Lösung wurde zur Papierchromatographie verwendet.

Zur papierchromatographischen Trennung des Hydrolysates wurden 30 Lösungsmittelsysteme ausprobiert. In den meisten Systemen liefen die Substanzen zu wenig weit und ergaben niedere R<sub>f</sub>-Werte oder keine getrennten Flecken.

Folgende vier Lösungsmittelsysteme wurden zur eindimensionalen Trennung des Hydrolysates mit Erfolg verwendet:

Phenol-Wasser	8:2
Methanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser	10:10:5
Äthanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser	10:10:5
Äthanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser-Propionsäure	10:10:5:2

Für die zweidimensionalen Chromatogramme wurde das Hydrolysat in folgenden Systemen getrennt:

Methanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser	10:10:5	Äthanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser-Propionsäure	10:10:5:2
<i>n</i> -Butanol-Aceton-Wasser-Diäthylamin	10:10:5:2	<i>n</i> -Butanol-Butanon-Wasser-Dicyclohexylamin	10:10:5:2

Zur Entwicklung der Chromatogramme wurde Ninhydrin verwendet. Zuckerreagenzien ergaben keine deutlichen Resultate.

<sup>5</sup> G. F. SPRINGER und M. J. RAPAPORT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 103 (1957).

<sup>6</sup> E. M. W. COOK, D. H. HEARD und E. V. F. SEAMANN, Nature (Lond.) 188, 1011 (1960).

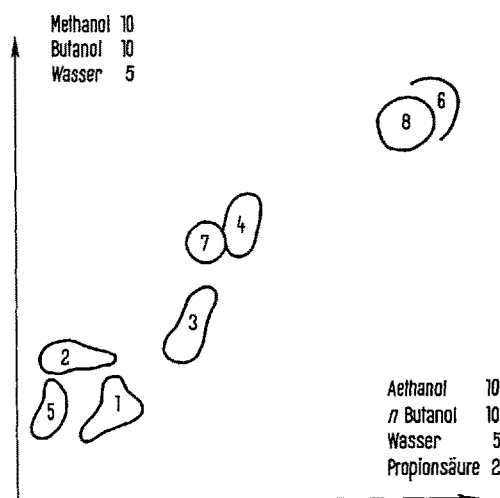


Fig. 1. Zweidimensionale, aufsteigende Chromatographie des Proteinhydrolysates. 1 = Arginin, 2 = Lysin, 3 = Glutaminsäure, 4 = Alanin, 5 = Histidin, 6 = Leucin, 7 = Threonin, 8 = Phenylalanin. Indikator: Ninhydrin.

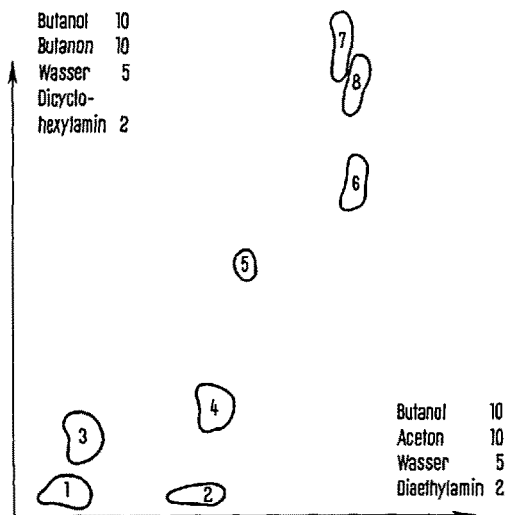


Fig. 2. Zweidimensionale, aufsteigende Chromatographie des Proteinhydrolysates. 1 = Arginin, 2 = Lysin, 3 = Glutaminsäure, 4 = Alanin, 5 = Histidin, 6 = Leucin, 7 = Threonin, 8 = Phenylalanin. Indikator: Ninhydrin.

**Resultate.** Die isolierte Substanz ist ein weisses, amorphes Pulver, das gut in Wasser, Salzsäure, Natriumhydroxid und physiologischem NaCl löslich, in Äthanol, Äther und Aceton unlöslich ist. Die wässrige Lösung zeigte keine Denaturierungserscheinungen bei 100°C. Sie ergibt eine negative Biuret-, eine positive Tetrabromphenolphthaleinmethylester- und Ninhydrinreaktion. Bei serologischen Reaktionen zeigt die Substanz kein charakteristisches Verhalten, da sie nicht nur mit verschiedenen Kaninchenimmunseren, sondern auch mit normalem Menschenserum eine nichtspezifische Präzipitationsreaktion gibt. In früheren Versuchen wurde nachgewiesen, dass die aus trypsinisierten Erythrocyten gewonnene Flüssigkeit im Kaninchen keine spezifischen Antikörper bildet. Da die Substanz noch beträchtliche Mengen anorganischer Salze als Verunreinigung enthält, konnte keine genaue chemische Analyse durchgeführt werden. Die papierchromatographische Analyse des Hydrolysates ergab die folgende Aminosäurezusammensetzung: Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Threonin.

**Diskussion.** Die von der Erythrocytenoberfläche durch Trypsinbehandlung abgelöste Substanz konnte mit direkter Trichloressigsäurefällung nicht isoliert werden (Verunreinigung durch Hämoglobin). Einengen der Verdauungsflüssigkeit auf 1/100 des Originalvolumens mit einer Proteinkonzentrierungsmethode mittels Polyäthylenglycol und – um sie von anorganischen Salzen zu befreien – Dialyse gegen destilliertes Wasser führte zu keiner brauchbaren Konzentrierung der abgelösten Substanz, da während der Dialyse nicht nur die anorganischen Ionen, sondern auch die durch Trypsinbehandlung freigelegten Aminosäuren und die niederen Polypeptide durch die Dialysiermembran diffundierten. Die beiden erwähnten Methoden erwiesen sich zur Reinigung der Proteinsubstanz als nicht geeignet.

Um nachzuweisen, dass die isolierten Aminosäuren nicht von Trypsin stammen, wurden folgende Versuche durchgeführt: 1:16 000 und 1:54 000 Trypsinverdünnungen (Armour-Trypsin krist.) in 6*N* HCl wurden 8 h bei 100°C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit den gleichen Lösungsmittelsystemen parallel zu den Proteinhydrolysaten papierchromatographisch untersucht. Die mit Ninhydrin erhaltenen Flecken waren nicht identisch.

Wässrige Lösungen des Trypsins (Armour-Trypsin krist.) wurden in Konzentrationen von 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% und 0,0001% hergestellt. Zu 1 vol dieser Lösungen wurden 3 vol Äthanol-Äther 1:1 gegeben. Ausser in der einprozentigen Trypsinlösung erhielt man damit keinen Niederschlag. Also konnte bei der Äther/Äthanol-Präzipitation der von uns isolierten Substanz Trypsin nicht präzipitiert worden sein.

Die durch Trypsinbehandlung freigelegte Substanz stammt von der sogenannten «Proteinhülle» der Erythro-

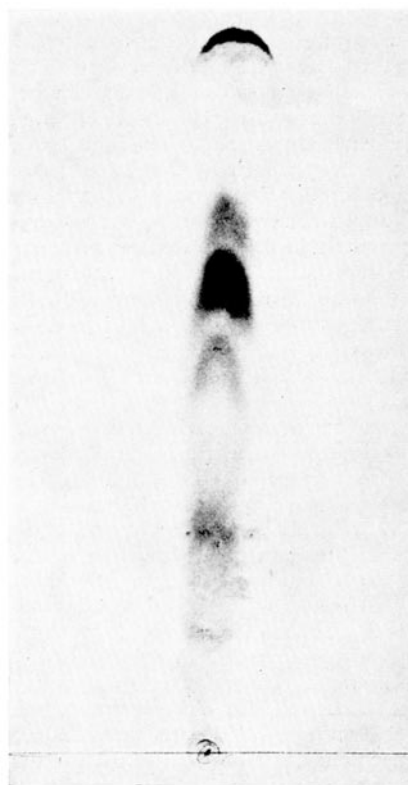


Fig. 3. Eindimensional aufsteigende Chromatographie des Proteinhydrolysates. Lösungsmittelsystem: Methanol-Butanol-Wasser 10:10:2, Indikator: Ninhydrin.

cyten. Sie ist ein Protein oder Polypeptid und kann durch Säurehydrolyse in Aminosäuren zerlegt werden.

**Summary.** Through a modified trypsin treatment of the surface of beef-erythrocytes, a substance was isolated with precipitation by a mixture of ethanol and ether, which did not contain significant amounts of hemoglobin and trypsin. A 6*N* HCl hydrolysate revealed with paper-chromatography 8 amino-acids in this substance. The surface of beef-erythrocyte membranes is covered with a protein- or peptide-layer.

MARIANN SCHERRER-GERVAI und J. TOMCSIK

Hygiene-Institut der Universität Basel (Schweiz), 3. Mai 1962.

### Zur Frage einer antagonistischen Wirkung von Herzglykosiden und Nebennierensteroiden am Kationentransport der Erythrocytenmembran

Im Jahre 1957 wurden von SULSER und WILBRANDT<sup>1</sup> Versuche veröffentlicht, nach denen gewisse Nebennierenrindenhormone, besonders die Mineralocorticoide Aldosteron, 9- $\alpha$ -Fluorohydrocortison und Cortexon, der Hemmwirkung von K-Strophanthosid auf den aktiven Kationentransport menschlicher Erythrocyten entgegenwirkten.

Ähnliche Befunde wurden, offenbar unabhängig, von BERNSTEIN<sup>2</sup> mitgeteilt. Diese Ergebnisse liessen sich jedoch in verschiedenen Laboratorien nicht bestätigen<sup>3</sup>, und darauf in unserem Laboratorium durchgeführte Untersuchungen führten ebenfalls zu negativen Resultaten, die

<sup>1</sup> F. SULSER und W. WILBRANDT, *Helv. physiol. Acta* 15, C37 (1957).

<sup>2</sup> R. E. BERNSTEIN, *X. Int. Congr. cell. Biol.*, Paris (ed. von L'expansion scient. française, 1960), p. 165.

<sup>3</sup> I. M. GLYNN, *J. Physiol.* 136, 148 (1957).