

Präparative Isolierung des Protein III der menschlichen Erythrocytenmembran

Preparative Isolation of Protein III of the Human Erythrocyte Membrane

H. Schiechl

Institut für Histologie und Embryologie der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. W. Burk)

(Z. Naturforsch. 32 e, 67–71 [1977]; eingegangen am 15. Oktober 1976)

Human Erythrocyte Membrane, Protein III, Isolation

The paper describes a method for the large-scale isolation of protein III (protein E, major intrinsic protein) from the human erythrocyte membrane with little expenditure of time. By treatment of the erythrocyte ghosts with diluted HCl at pH 2.3 and 0 °C some membrane proteins can be extracted. From the remaining "rest"-membranes, whose major constituents, besides phospholipides, are protein PAS-1, other carbohydrate containing proteins and protein III, the latter can be separated in pure form by means of gel filtration. The paper reports on the amount, purity and possible structural modifications of the protein III obtained by this isolation method.

Einleitung

Der Proteinanteil der menschlichen Erythrocytenmembran kann mittels der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in etwa 7 größere Banden aufgetrennt werden¹. Das Protein III¹ (Protein E², Protein a³, major intrinsic Protein⁴) mit einem MG von ca. 90000 Dalton macht etwa 25% des Proteinanteiles aus⁵. Als sogenanntes „integral“ oder „intrinsic“ Protein⁶ ist es entscheidend am Zusammensetzung der Membranstruktur beteiligt. Deshalb muß auch bei allen Methoden zu seiner Isolierung^{2, 4, 7} die Membran mittels Detergentien desintegriert werden. Markierungsbefunde ergeben, daß es die Membran von außen nach innen durchsetzt³. Nach neueren Studien soll es das Membran-„core“ mindestens 2mal queren, was durch eine vermutete S-artige Form ermöglicht werden soll⁸. Weitere Studien über den chemischen Aufbau dieses Proteins oder über seine Stellung innerhalb der übrigen Membranbestandteile könnten die Vorstellungen über die Struktur der Erythrocytenmembran erweitern. Dazu ist seine Isolierung in größeren Mengen erforderlich. Hier soll eine Methode beschrieben werden, die es sich zunutze macht, daß durch Behandlung mit verdünnter HCl ein Teil der Membranproteine aus den Ery-ghosts extrahiert werden kann⁹. Das Protein III verbleibt, neben anderen Proteinen, in der Restmembran und kann nach Lö-

sen dieser Restmembran in SDS durch Gelfiltration abgetrennt werden.

Material und Methoden

Membran Isolierung: Als Ausgangsmaterial diente 3–5 Tage altes menschliches Citratblut. 250 ml davon wurden zur Entfernung der Plasmaproteine und der Leukocyten 4mal mit je 400 ml 5 mM Na-Phosphat + 0,15 M NaCl pH 8,0 durch Zentrifugieren bei 1000 × g für 20 min gewaschen¹⁰. Der Gehalt an Leukocyten wurde nach jeder Waschung mit dem Mikroskop kontrolliert. Die Membranisolierung erfolgte nach der Methode von Steck *et al.*¹⁰. Nach 4maligem Waschen in je 600 ml 5 mM Na-Phosphat pH 8,0 durch Zentrifugieren bei 25000 × g für 15 min wurden die erhaltenen Ery-ghosts zur weiteren Verarbeitung verwendet.

HCl-Extraktion: Die Ery-ghosts wurden mit eiskaltem 5 mM Na-Phosphat pH 8 bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 0,2 mg/ml verdünnt. Anschließend wurde der Suspension tropfenweise unter starkem Rühren 1 N HCl zugesetzt, bis ein pH von 2,3–2,4 erreicht war. Danach wurde unter ständigem leichten Rühren 12 Stunden bei 0 °C stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde durch Zentrifugieren für 20 min bei 4000 × g und 0 °C der klare Überstand entfernt und der sedimentierte Membranrest 2mal mit 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 2,4 (mit 1 N HCl auf diesen pH-Wert hintitriert) auf dieselbe Art gewaschen. Schließlich wurde der Membranrest in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 8, welcher 5 mmol β-Mercaptoethanol und 1 mmol EDTA pro Liter sowie 1% SDS (SERVA, Heidelberg, Deutschland) enthält, gelöst.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Schiechl, Institut für Histologie und Embryologie der Universität Graz, Universitätsplatz 4, A-8010 Graz.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Chromatographie: Die chromatographische Auftrennung wurde mit Sephadex G 150 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in Säulen von der Dimension $150 \times 1,5$ cm durchgeführt. Zum Äquilibrieren wurde ein 5 mM Na-Phosphatpuffer, der zusätzlich 5 mMol β -Mercaptoäthanol + 1 mMol EDTA pro Liter sowie 1% SDS enthält, verwendet. Die pro Lauf verwendete Probenmenge betrug 5 ml. Die Elution erfolgte mit demselben Puffer wie zum Äquilibrieren verwendet bei einer Fließrate von 8–10 ml/Stunde. Das Eluat wurde in 1,7 ml Fraktionen gesammelt und der Proteingehalt bei $\lambda = 280$ nm oder nach Lowry²⁶ vermessen, wobei Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein verwendet wurde. Die Rechromatographie wurde in derselben Weise durchgeführt.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE): Sie wurde nach der Methode von Fairbanks *et al.*¹ mit 5,5-prozentigem Gel durchgeführt (alle Chemikalien: Schuchard, München, Deutschland). Bei 6 mA/Gel und einer daraus resultierenden Spannung von 60 V betrug die Laufzeit für eine Strecke von etwa 7 cm ca. 2 Stunden. Gefärbt wurde 14 Stunden mit 0,05-prozentigem Coomassie Brillantblau R 250 (in H_2O : *n*-Propanol : Eisessig = 6,5 : 2,5 : 1) und entfärbt mit 10-prozentiger Essigsäure. Der Kohlehydratnachweis wurde mit der PAS-Färbung nach der Methode von Zacharius *et al.*¹² durchgeführt.

Messung der HCl-bedingten Proteolyse: 5 Proben mit je 22,5 ml Erythrocyten-Membran-Suspension mit einem Proteingehalt von ca. 2,5 mg/ml wurden mit 1 N HCl auf pH 2,3 gebracht und bei 0 °C für 1 min sowie für 2, 6, 12 und 24 Stunden stehengelassen und nach der jeweiligen Zeit mit 1 N NaOH auf pH 7 gebracht. Anschließend wurden die Proben mit 2,5 ml 10-prozentigem SDS und einer genau gemessenen Menge BSA (Calbiochem, San Diego, USA) als Referenzprotein versetzt, und der SDS-PAGE unterworfen. Mit jeder Probe wurden dazu 6 Gelzyylinder beschickt (je 2 Gele mit 10, 20 bzw. 30 μ l) und unter den oben angegebenen Bedingungen wandern gelassen. Die Färbezeit betrug 12 Stunden und die Entfärbedauer 24 Stunden bei 6maligem Wechsel der Essigsäure. Die Ausmessung der von den einzelnen Banden eingeschlossenen Flächen wurde mit einem Mikrospektrophotometer bei $\lambda = 570$ nm durchgeführt. Der Durchmesser der kreisförmigen Meßpunkte war 0,02 mm. Die Extinktion wurde an hintereinander in einem Abstand von 0,5 mm gelegenen Punkten gemessen, wobei als Nullwerte die nicht gefärbten Teile des Gelzyinders dienten.

Aminosäure-Analyse: Annähernd 0,01 μ mol Protein III wurden 24 Stunden in 5,7 N HCl bei

110 °C unter N_2 -Atmosphäre hydrolysiert. Eine ebensolche Probe wurde 48 Stunden zur völligen Hydrolyse eventuell vorhandener Val-Val Bindungen hydrolysiert. Die Analyse wurde mit einem Biocal Modell BC 200 Aminosäure-Analysator durchgeführt.

Crossed Immunolectrophoresis (IE): Zur Vorbereitung für die Elektrophorese wurde die das Antigen enthaltende Lösung zur Entfernung des SDS gegen 0,156 M NaCl dialysiert. Das Volumen der NaCl-Lösung betrug 2 l und die Dauer der Dialyse war 4 Tage bei täglich 2maligem Wechsel der Außenlösung. Anschließend wurde die Antigenlösung 1-prozentig an Berol EMU-043 (MODO KEMI, Stenungsund, Schweden), einem nicht-ionalen Detergens, gemacht¹³. Eventuell auftretende Trübungen wurden durch Zentrifugieren bei $2,3 \times 10^6$ g · min entfernt. Die so vorbereiteten Proben enthielten ca. 0,60 mg Protein/ml. Die crossed IE-Analyse* nach der Methode von Clarke and Freeman¹⁴ wurden nach der bei Bjerrum *et al.*¹³ angegebenen Beschreibung mit einem 5 μ l Aliquot in 1-prozentigen Agarose-Gel, das 1-prozentig (w/v) und Berol EMU-043 war, durchgeführt. Der gereinigte Kaninchen-Antikörper gegen menschliche Erythrocytenmembran-Proteine stammt von DAKO-PATTS A/S (Copenhagen F, Dänemark). Die Tandem-crossed-Immunolectrophoresis wurde nach der Beschreibung von Krøll¹⁴ durchgeführt.

Berechnung von K_D : Sie erfolgte nach der Formel

$$K_D = \frac{V - V_0}{V_i},$$

wobei

V_0 = Ausschlußvolumen (= Elutionsvolumen von Tusche),

V = Elutionsvolumen des betreffenden Proteins,

V_{eos} = Elutionsvolumen einer Substanz, die völlig eingeschlossen wird (in diesem Fall Eosin),

V_i = $V_{eos} - V_0$ = inneres Volumen

in ml bedeuten.

Ergebnisse

Membrangewinnung und HCl-Extraktion: Alle im folgenden angeführten Werte sind Mittelwerte, gewonnen aus 15–20 Einzelversuchen. Aus 250 ml Blut wurden nach 4maligem Waschen in der angegebenen Weise 70–80 ml an dicht gepackten Ery-

* Die Analyse wurde freundlicherweise von O. J. Bjerrum, Proteinlaboratorium, Universität Kopenhagen, durchgeführt.

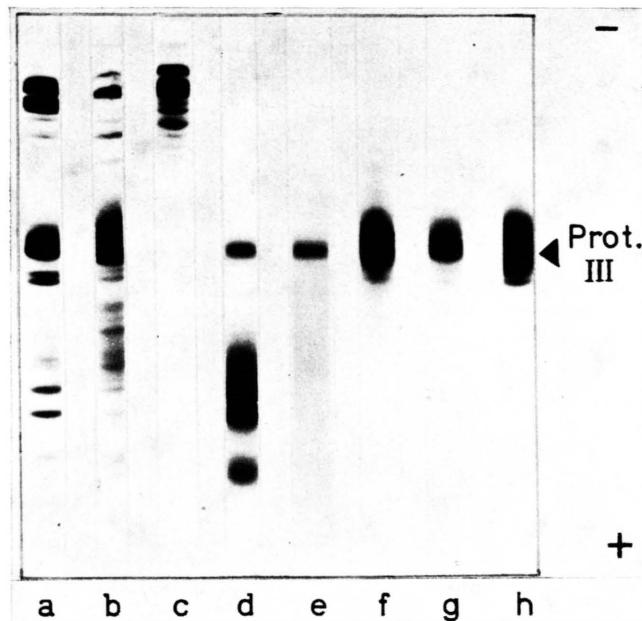


Abb. 2. SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese-Analyse der in den 3 peaks der Abb. 1 enthaltenen Proteine, durchgeführt nach den Angaben in Ref. 1. Anfärbung mit Coomassie-Brillant Blue R 250 (ausgenommen Gel e). a, unbehandelte menschliche Erythrozytenmembran; b, HCl-extrahierte „Rest“-Membran; c, peak 1; d, peak 3; e, peak 3 (PAS-Färbung); f, peak 2 (punktierter Teil); g, peak 2 (strichlicher Teil der Rechromatographie); h, wie g, aber Überladung des Gels mit der 4fachen Proteinmenge. Die aufgetragene Proteinmenge betrug ca. 30 $\mu\text{g}/\text{Gel}$.

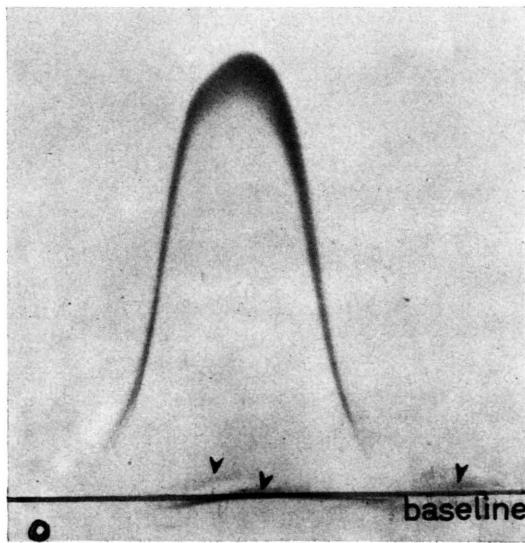


Abb. 3. Crossed immunoelektrophoretische Analyse des Protein III. Das Protein des peak 2 in Abb. 1 (punktierter Fläche) diente als Antigen (3 μg). Der größere peak stellt die Präcipitatlinie des Protein III dar, die 3 kleinere peaks (kurze Pfeile) sind wahrscheinlich Spuren von Verunreinigungen mit anderen Membranproteinen. Durchführung bei 16 °C in Agarose, die 1% (w/v) Berol EMU-043 enthält. Elektrophorese in der 1. Richtung: 10 V/cm für 60 min. Elektrophorese in der 2. Richtung mit polyspezifischem Antikörper gegen Erythrozytenmembran. Proteine (6 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) in Agarose: 2 V/cm für 16 Stunden.

throcyten erhalten. Die Anzahl der Erythrozyten darin war $8-9 \times 10^6/\text{mm}^3$ und das Verhältnis Erythrozyten : Leukocyten etwa $1 \times 10^6 : 10$. Aus diesen 80 ml konnten rein weiß erscheinende Membranen (ca. 30 ml Suspension) mit einem Gesamtproteingehalt von 180 mg isoliert werden, die der HCl-Extraktion unterworfen wurden.

Die zur HCl-Behandlung der Membranen optimale Konzentration beträgt 0,15 – 0,20 mg Protein/ml; höhere Konzentrationen verschlechtern das Ergebnis der Abspaltung der Proteine aus der Membran und noch niedrigere Konzentrationen bringen keinen zusätzlichen Effekt. Bei Verringern der Zeitdauer der HCl-Behandlung werden die Proteine IV a + b zunehmend schlechter abgespalten. Unter den angegebenen optimalen Bedingungen werden aus der Membran annähernd 40 – 45% der Proteine entfernt, und der zurückbleibende Rest, etwa 100 mg, werden nach Lösen im Elutionspuffer der Chromatographie unterworfen.

Chromatographie und SDS-PAGE: Als optimaler Wert hinsichtlich der aufgetragenen Proteinmenge wurde für eine Säule der angegebenen Dimension 25 mg Protein ermittelt. Davon können im Eluat 90% wiedergefunden werden. Abb. 1 zeigt das Ergebnis einer solchen Auftrennung: Das gesamte Protein ist auf 3, z. T. deutlich getrennte Peaks aufgeteilt. Peak 1 erscheint bei $K_D = 0,07$ (entspricht einem MG von über 150000) und um-

faßt 15% der aufgetragenen Proteinmenge. Peak 2 enthält 40% der aufgetragenen Proteine und hat ein $K_D = 0,23$ (MG ca. 90000 – 100000). Peak 3 ist breit und undeutlich von peak 2 abgesetzt; er enthält 45% des aufgetragenen Proteins und erscheint bei $K_D = 0,40 - 0,45$ (MG um 40000) im Eluat. In peak 1 werden außerdem die Phospholipid-Micelle eluiert, die eine Trübung verursachen, weshalb dieser peak bei Messung mit $\lambda = 280 \text{ nm}$ höher erscheint, als seinem Proteingehalt entspricht.

Die Analyse der Proteine dieser 3 peaks mittels der SDS-PAGE ergibt folgende Resultate: Peak 1 (Abb. 2 c *) enthält alle Proteine mit MG über 150000, die bei der HCl-Behandlung nicht restlos entfernt wurden. PAS-positive Banden sind nicht vorhanden.

Peak 2 (Abb. 2 f) enthält als Hauptbestandteil das Protein III. Daneben sind aber, wie aufgrund der unvollständigen Trennung der 3 peaks zu erwarten, noch Verunreinigungen von Proteinen der beiden Nachbarpeaks vorhanden.

Peak 3 (Abb. 2 d) enthält alle Proteine mit einem MG unter 70000, die durch die HCl-Behandlung nicht extrahiert wurden oder noch in Spuren in der Restmembran verblieben sind. Die PAS-Färbung (Abb. 2 e) zeigt zusätzlich, daß das Glykoporphin als Hauptkomponente in diesem peak enthalten ist.

Rechromatographie: Dazu wurden die Fraktionen des in Abb. 1 punktierten Teiles des peak 2 gepoolt und auf etwa 4 ml eingeengt. Das Elutionsergebnis ist in Abb. 1 (strichlierte Kurve) dargestellt und zeigt, daß die Proteine des peak 1 und 3 gut abgetrennt vor und hinter dem Hauptpeak eluiert werden. Eine SDS-PAGE mit den gepoolten Fraktionen des in Abb. 1 schraffierten Teiles der Elutionskurve zeigt eine einzige Bande (Abb. 2 g), die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit genau mit dem Protein III der Erythrozyten-Membran (Abb. 2 a) übereinstimmt. Bei Überladen der Gele mit der 4fachen Menge Protein (Abb. 2 h) sind noch Spuren der Proteine IV a + b sowie eine schwache Bande bei etwa MG = 60000 bemerkbar. Die Menge der Verunreinigungen läßt sich aber wegen Überlagerung durch die Bande des Protein III nicht ausmessen.

Proteinverluste bei der Chromatographie: Die Verluste an Protein III nach 2facher chromatographischer Reinigung setzen sich folgendermaßen zusammen.

* Abbn. 2 and 3 siehe Tafel auf Seite 68 b.

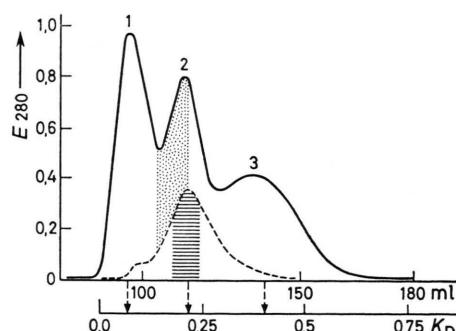


Abb. 1. Isolierung des Protein III der menschlichen Erythrozytenmembran durch Sephadex G 150-Chromatographie. Säulendimension: $150 \times 1,5 \text{ cm}$. Fließrate: 10 ml/Stunde. Messung des Proteingehaltes der einzelnen Fraktionen bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. Ausgezogene Kurve: Elutionsprofil der Proteine der nach HCl-Behandlung verbleibenden „Rest“-Membran. Aufgetragene Proteinmenge ist 25 mg. Die resultierenden Peaks sind mit den Zahlen 1 bis 3 bezeichnet. Das Protein III erscheint in peak 2. Gestrichelte Kurve: Elutionsprofil der gepoolten Fraktionen des punktierten Teiles von peak 2 in Abb. 1. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 8 mg. Die gepoolten Fraktionen des strichlierten Teiles dienten als Ausgangsmaterial für alle durchgeführten Analysen.

men: Abgesehen von den Verlusten bei der für die Rechromatographie erforderlichen Einengung des peak 2-Volumens, hängen sie in erster Linie davon ab, wie breit peak 2 aus seiner Umgebung herausgeschnitten wird. Gegen peak 1 kann sehr breit herausgeschnitten werden, da die Proteine dieses peak bei der Rechromatographie vollständig vom Protein III abtrennbar sind. Gegen peak 3 soll eng geschnitten werden, etwa in der in Abb. 1 dargestellten Art (schraffierte Fläche). Durch dieses asymmetrische Herausschneiden des peak 2 werden die als Verunreinigung noch in Spuren vorhandenen Proteine IV a+b, die ja aufgrund ihres MG sich am hinteren Ende des peak befinden, vermindert. Der Verlust an Protein III beträgt bei dieser Art des Herausschneidens ca. 30%. Rechnet man noch mit einem Verlust von ca. 20% durch das Herausschneiden bei der Rechromatographie, so erhält man einen Gesamtverlust an Protein III von etwa 45 – 50% bei der 2fachen Reinigung.

Aminosäure-Analyse: Das Ergebnis ist in Tab. I zusammengefaßt. Die angegebenen Zahlen sind Mit-

Tab. I. Aminosäure-Analyse des Protein III. Das Protein des strichlierten Teiles der Abb. 1 wurde für die Hydrolyse verwendet. Die Zahlen stellen den Anteil der entsprechenden Aminosäuren pro Protein III Molekül dar. Halb-Cys und Trp wurden nicht bestimmt.

Lys	49	Asp	81	Pro	80	Val	64	Tyr	29
His	26	Thr	56	Gly	83	Met	22	Phe	56
Arg	50	Ser	83	Ala	79	Ile	40		
		Glu	131	1/2-Cys	—	Leu	113		

telwerte aus den Ergebnissen von 6 verschiedenen Protein III-Isolierungen. Sie drücken den Anteil der jeweiligen Aminosäure an der Gesamtzahl von 1000 Aminosäuren aus. Nicht bestimmt wurden die Aminosäuren Halb-Cystin und Tryptophan.

Crossed Immunoelectrophoresis: Als Antigen wurde das Protein des punktierten Teiles von peak 2 (Abb. 1) verwendet. Das Präzipitationsmuster der crossed IE des isolierten Protein III zeigt einen großen symmetrischen peak und mehrere kleine (Abb. 3). Letztere stellen höchstwahrscheinlich Verunreinigungen dar. Der große peak zeigt bei der Tandem-crossed-IE Identitätsreaktion mit dem „major intrinsic protein“ der menschlichen Erythrocyten-Membran, das nach der Methode von Bhakdi *et al.*⁴ isoliert wurde.

Proteolyse des Proteins III durch HCl: Die Reproduzierbarkeit der zur Flächenbestimmung (und

damit Proteingehaltsermittlung) der Protein III-Bande an den Gelzylinern benutzten Methode betrug $\pm 10 - 12\%$. Die Flächengröße zeigte ein lineares Verhältnis zur Proteinmenge, wenn letztere $7 \mu\text{g}$ nicht übersteigt. Das ergab sich sowohl für das Protein III als auch für das BSA als Testsubstanz. Bei Verwendung der BSA-peaks als Referenz ergab die Vermessung der Protein III-peaks nach verschiedenen langer HCl-Einwirkung folgendes Bild: 12 Stunden Stehen bei 0°C und pH 2,3 brachte keine meßbare Proteinabnahme. Weitere 12 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur und demselben pH sowie Zusatz von 1% SDS zeigte eine geringe Abnahme der Proteinmenge, die aber mit 12 – 15% nur knapp außerhalb der Fehlergrenze der Methode lag. Ein Kontrollversuch mit Pepsinzusatz (ohne SDS) zeigte erwartungsgemäß eine rasche Abnahme der entsprechenden peak-Flächen.

Diskussion

Die für die Beurteilung der angegebenen Methode wichtigsten Punkte sind der Reinheitsgrad des isolierten Protein III sowie die Art und das Ausmaß der Strukturveränderungen, die während des Isolierungsvorganges am Protein auftreten können.

Kriterien für die Reinheit sind die Ergebnisse der SDS-PAGE, der crossed immunoelectrophoresis und der Aminosäure-Analyse. Alle drei zeigen, daß die Verunreinigungen sehr gering sind. Als Hauptkomponenten kommen dabei laut SDS-PAGE die Proteine IV a+b in Frage. Ihr mengenmäßiger Anteil in der intakten Erythrocyten-Membran ist ca. 35 – 38% der Menge des Protein III^{15,9}. Bei der HCl-Extraktion werden etwa 80% dieser beiden Proteine entfernt⁹ (von IV a mehr, von IV b weniger), so daß, bezogen auf die Protein III-Menge, etwa 8 – 10% in der sedimentierbaren Restmembran verbleiben. Durch das asymmetrische Herausschneiden des peak 2 wird diese Menge noch auf etwa 5 – 7% verringert.

Verunreinigungen durch das Protein PAS-1, die in der SDS-PAGE an derselben Stelle wie Protein III auftauchen würden, von diesem auch durch die PAS-Färbung nicht unterscheidbar wären (etwa 8% des MG von Protein III sind Kohlehydrate²), können ausgeschlossen werden, da das Protein PAS-1 mit einem K_D von etwa 0,43 sich sehr deutlich vom Protein III mit einem K_D von 0,25 unterscheidet und die beiden also durch 2malige Chromatographie völlig zu trennen sind. Die Analyse mit der

crossed immunoelectrophoresis zeigt ebenfalls, daß das isolierte Protein sehr rein ist. Die polypspezifische Antikörper-Präparation, die dafür verwendet wurde, offenbart lediglich geringe Verunreinigungen mit antigenem Material, wie man aus der Größe und der Farbintensität der zusätzlich vorhandenen peaks in Abb. 3 sehen kann. Hinzugefügt muß aber werden, daß die angewandte Methode keine direkte quantitative Bestimmung erlaubt.

Auch das dritte Kriterium, nämlich die Aminosäure-Analyse, zeigt, daß die Größe der Verunreinigung mit anderen Proteinen gering ist. Ein Vergleich der Ergebnisse der Aminosäure-Analyse des isolierten Proteins mit den von Bhakdi *et al.*⁴ für das „major intrinsic protein“ angegebenen Werten ergibt, daß beide innerhalb einer Fehlergrenze von 5–7% sehr gut übereinstimmen. Lediglich die Werte für das Leu und Arg weichen stärker ab.

Hinsichtlich der Art und Größe der Strukturveränderungen, die beim Isolieren am Protein III auftreten können, gibt es folgende Möglichkeiten:

Der Grad der Zerstörung der Tertiärstruktur und damit der Nativität, der durch die angewandten SDS-Konzentrationen und den niedrigen pH-Wert eintritt, kann ungefähr abgeschätzt werden. Es muß nämlich aus der Stärke der Präzipitationslinie des Protein III in Abb. 3 gefolgert werden, daß die Antigenität und damit auch bis zu einem gewissen Grad die Tertiärstruktur in einem hohen Grad erhalten geblieben bzw. nachträglich wieder erlangt worden ist.

Die Möglichkeiten zur Veränderung der Primärstruktur sind der niedrige pH-Wert und eventuell vorhandene proteolytische Enzyme aus Granulocyten. Aufsplitterung der Polypeptidkette in mehrere größere Bruchstücke durch diese beiden Ursachen würden bei der angewandten Isolermethode zwar

einen Verlust an Protein III bringen, die Bruchstücke würden jedoch aufgrund ihres wesentlich verkleinerten MG nicht mit dem Protein III zusammen eluiert werden. Die Proteolyse-Versuche mit HCl weisen jedoch darauf hin, daß 12stündigiges Verweilen bei pH 2,3 unter den angegebenen Bedingungen sowohl bei Protein III als auch bei BSA keinen Substanzverlust gegenüber der Ausgangsmenge bringt. Sekundäraggregate der Bruchstücke untereinander müßten bei der SDS-PAGE aufgetrennt werden und sind außerdem im angewandten Milieu unwahrscheinlich.

Abspaltung einiger weniger endständiger Aminosäuren durch HCl-Hydrolyse, wodurch also das MG der Polypeptidkette nicht wesentlich verändert würde und somit weder an der Veränderung der Wanderungsstrecke bei der SDS-PAGE noch am kaum veränderten K_D -Wert bemerkt werden könnte, können aufgrund der vorliegenden Befunde naturgemäß nicht ausgeschlossen werden. Eine teilweise Veränderung der Guanidinogruppe im Arginin durch die HCl könnte die etwas erniedrigten Werte dieser Aminosäure in Tab. I erklären.

Auch das crossed immunoelectrophoresis Muster des Protein III zeigte kein Zeichen einer Protein-Degradation, der peak in Abb. 3 ist symmetrisch und voll ausgebildet¹⁶.

Ein Vergleich der bisher vorhandenen Isolierverfahren für das Protein III^{2, 4, 7} mit dem hier beschriebenen ergibt folgendes Bild: Nachteilig ist das Vorhandensein von SDS, das sehr schwer durch Dialyse zu entfernen ist, im isolierten Produkt; es erscheint somit für die Prüfung seiner biologischen Funktion weniger geeignet. Der große Vorteil ergibt sich aus der Einfachheit der Durchführung und aus der Möglichkeit, große Mengen reines Protein III mit nur geringem Zeitaufwand zu gewinnen.

¹ G. Fairbanks, T. L. Steck u. D. F. H. Wallach, *Biochemistry* **10**, 2606–2616 [1971].

² M. J. A. Tanner u. D. H. Boxer, *Biochem. J.* **129**, 333–347 [1972].

³ M. S. Bretscher, *J. Mol. Biol.* **59**, 351–357 [1971].

⁴ S. Bhakdi, O. J. Bjerrum u. H. Knüfermann, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.

⁵ D. F. H. Wallach, *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 61–83 [1972].

⁶ S. J. Singer u. G. L. Nicholson, *Science* **175**, 720–731 [1972].

⁷ J. Yu u. T. L. Steck, *J. Biol. Chem.* **250**, 9170–9175 [1975].

⁸ R. E. Jenkins u. M. J. Tanner, *Biochem. J.* **147**, 393–399 [1975].

⁹ H. Schiechl, *Biochim. Biophys. Acta* **307**, 65–73 [1973].

¹⁰ T. L. Steck, R. S. Weinstein, J. H. Strauss u. D. F. H. Wallach, *Science* **168**, 255–257 [1970].

¹¹ D. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 [1951].

¹² R. M. Zacharius, T. E. Zell, T. H. Morrison u. J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.* **30**, 148–152 [1969].

¹³ O. J. Bjerrum, S. Bhakdi, T. C. Bøg-Hansen, H. Knüfermann u. D. F. H. Wallach, *Biochim. Biophys. Acta* **406**, 489–504 [1975].

¹⁴ H. G. M. Clarke u. T. Freeman, *Prot. Biol. Fluids* (H. Peeters, ed.), pp. 14, 503, Elsevier, Amsterdam 1967.

¹⁵ T. L. Steck, *J. Cell Biol.* **62**, 1–19 [1974].

¹⁶ O. J. Bjerrum u. T. C. Bøg-Hansen, *Scand. J. Immunol.* **4**, Suppl. 2, 89–99 [1975].

¹⁷ J. Krøll, *Scand. J. Immunol.* **2**, Suppl. 1, 57–59 [1973].