

Biochemische Differenzierung der Pr₁-/Pr₂-determinierenden von der MN-determinierenden N-Acetyl-Neuraminsäure durch Acetylierungsversuche mit Erythrocytenglykoproteinen

Wolfgang MERZ und Dieter ROELCKE

Thannhauser-Abteilung für Stoffwechselforschung in der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg, und Institut für Immunologie und Serologie der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 21. Dezember 1970/23. August 1971)

In contrast to MN receptors, Pr₁ and Pr₂ antigens of isolated glycoprotein of erythrocytes are not inactivated by acylation of free amino groups.

By introduction of easily leaving groups, e.g. trifluoroacetic residues, inactivation of the MN activity can be made reversible.

No differences between Pr₁ and Pr₂ antigens could be found with the reactions described in this paper.

Acylation in aqueous phase (buffer/anhydrous acetic acid) and in organic phase (pyridine/anhydrous acetic acid) gave identical results qualitatively and quantitatively. It was not possible to split the N-acetic binding neither under mild alkaline conditions nor with aminoacylase. 4–5 amino groups out of 11 could be acylated, whereas succinylation in aqueous phase (buffer/anhydrous succinic acid) resulted in modification of only one free amino group, the calculations being based on a molecular weight of 30000. Following succinylation MN activity was also lost, whereas the antigenic activity of Pr₁ and Pr₂ remained unchanged. The appearance of a negative charge instead of the positive charge of the free amino group on the glycoprotein did not affect Pr₁ or Pr₂ activity in any way.

If glycoprotein was esterified under conditions which cause esterification of free sialic acid to a wide extent neither MN activity nor Pr₁/Pr₂ activity was altered.

Das Erythrocytenoberflächenglykoprotein, das durch die Phenol-Wasser-Extraktion dargestellt werden kann, ist Träger von Strukturen, die als Antigene durch Antikörper nachgewiesen werden können. Es dient mehreren Arbeitsgruppen zu biochemischen Untersuchungen über MN-Antigene [1–4]. Von Springer und Ansell [5] wurde gezeigt, daß die MN-Antigene inaktiviert werden, wenn die N-Acetyl-neuraminsäure (NS) von Erythrocyten durch Neuraminidase abgespalten wird. Offenbar stellt die NS den terminalen Zucker der Immundeterminanten von MN dar [2–4]. Die MN-Antigene können durch Heteroantikörper, die durch Kaninchenimmunisierung gewonnen werden, und durch menschliche M- und N-Isoantikörper nachgewiesen werden.

Neben den MN-Antigenen ist in neuerer Zeit durch die Untersuchungen von Roelcke [6–8] ein weiterer Erythrocytenantigen-Komplex bekannt geworden, dessen Faktoren Pr₁ und Pr₂ [9] sich ebenfalls auf dem Erythrocytenoberflächenglykoprotein befinden und wie die MN-Antigene ihre Aktivität durch NS-Ab-

spaltung von Erythrocyten verlieren. Die Pr₁/Pr₂-Rezeptoren sind durch Kälteautoagglutinine nachweisbar und lassen sich von dem I-Antigen, gegen das Kälteagglutinine in der Regel gerichtet sind, aufgrund ihrer Inaktivierbarkeit durch proteolytische Enzyme sowie durch Neuraminidase abgrenzen.

Damit sind zwei Antigensysteme auf dem Erythrocytenglykoprotein bekannt, die durch NS determiniert werden. Trotz dieser biochemischen Verwandtschaft sind beide Systeme voneinander unabhängig [7]. In Versuchen mit M^k-Erythrocyten, denen aufgrund genetischer Determinierung spezifisch die MN-determinierende NS fehlt [10], konnte von Roelcke *et al.* [11] gezeigt werden, daß die MN-determinierende NS am Aufbau der Pr₁/Pr₂-Antigene unbeteiligt ist. In Versuchen mit Glykopeptiden, die nach Ficinbehandlung von Erythrocytenglykoproteinen erhalten werden [12], haben Roelcke *et al.* [13] gezeigt, daß die Antigene Pr₁ und Pr₂ auf verschiedenen Glykopeptiden vorkommen. Damit ist die Pr₁-determinierende NS unabhängig von der Pr₂-determinierenden NS.

Diese Befunde belegen eine hochgradige Variabilität der NS in Ausübung von Antigenfunktionen, deren biochemisches Substrat bisher unbekannt ist. Li-

Nicht allgemein gebräuchliche Abkürzung. NS, N-Acetylneuraminsäure.

Enzyme. Neuraminidase (EC 3.2.1.18); Aminoacylase; (EC 3.5.1.14).

sowska u. Morawiecki [14] konnten zeigen, daß Acetylierung von MN-aktivem Glykoprotein die MN-Antigene inaktiviert, offenbar, weil für die MN zuständige NS zur Ausübung ihrer Antigenfunktion auf die Interferenz mit freien NH_2 -Gruppen angewiesen ist. Wir haben deshalb geprüft, ob die Blockierung freier NH_2 -Gruppen auch Einfluß auf die Pr_1/Pr_2 -Antigenität nimmt und zeigen in dieser Arbeit, daß trotz der MN-Inaktivierung die Pr_1/Pr_2 -Antigene nach Acylierung des Erythrocytenglykoproteins intakt bleiben. Damit können die MN- und die Pr_1/Pr_2 -Antigene auch biochemisch voneinander unterschieden werden.

MATERIAL UND METHODEN

Das MN- und Pr_1/Pr_2 -aktive Glykoprotein wurden durch Phenol-Wasser-Extraktion nach der Vorschrift von Klenk und Uhlenbruck [15] aus Erythrocytenstroma hergestellt.

Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (500 E/ml) wurde von den Behring Werken, Marburg, bezogen.

Nach der Methode von Ottensooser und Silberschmidt [16] wurde das Phythämagglutinin Anti- N_V aus dem Samen von *Vicia graminea* extrahiert.

96%iges Trifluoressigsäureanhydrid wurde von der EGA-Chemie, Steinheim, Essigsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid sowie alle anderen Reagentien von Merck, Darmstadt, bezogen. *N*-Acetylneuraminsäure wurde von Serva, Heidelberg, und Amino-Acylase von Calbiochem, Los Angeles/Kalifornien, bezogen.

Zum Nachweis der MN-Aktivität wurden ausschließlich MN-Antisera von Kaninchen verwendet. Die Herkunft der Pr_1 - und Pr_2 -Kälteantikörper ist bei Roelcke [17,18] beschrieben.

Für den serologischen Standard-Hemmtest wurden jeweils 1%ige Lösungen der Glykoproteine eingesetzt. Es wurde die Röhren-Standard-Methode verwendet. Die Anti-MN-Hemmtests wurden bei 37 °C, die Anti- Pr_1/Pr_2 -Hemmtests bei 0 °C durchgeführt. Anti-M (Titer 1/32) wurde in 4-facher, Anti-N (Titer 1/64) in 8-facher, Anti- Pr_1 (Titer 1/8000) in 500-facher und Anti- Pr_2 (Titer 1/4000) in 250-facher Verdünnung verwandt. Die Glykoproteine wurden 1 Std mit den Antikörpern inkubiert und darauf Testerythrocyten für 30 min zugegeben. Die Ablesung erfolgte makroskopisch nach Anzentrifugierung.

Die freien Aminogruppen wurden nach der Methode von Moore und Stein [19] mit Ninhydrin bestimmt. Die Acetyl- und Estergruppenbestimmungen wurden im Organisch-Chem. Institut der Universität Heidelberg durchgeführt. Alle Lösungsmittel und das Acetanhydrid waren frisch destilliert und wasserfrei.

Acylierung in wäßriger Phase

Zu einer 1%igen Lösung des Erythrocytenglykoproteins in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7, (KH_2PO_4 -

NaOH) wurde, bezogen auf die Proteineinwaage, die Hälfte an Säureanhydrid hinzugegeben und der pH-Wert während 1 Std mit 0,5 N NaOH auf pH 7 gehalten. Die Reaktionen wurden bei 0 °C durchgeführt. Bereits nach 15 min blieb der pH-Wert konstant. Essigsäureanhydrid wurde in methanolischer Lösung (1:1, v/v) eingesetzt. Bernsteinsäureanhydrid wurde in Substanz zugegeben. Nach Ablauf der Reaktion wurde unter mehrfachem Wechsel erschöpfend gegen den 1000fachen Überschuß an dest. H_2O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Acetylierung in organischer Phase

Das Glykoprotein wurde im Überschuß in einem Gemisch von Pyridin—Acetanhydrid (4:5, v/v) unter Feuchtigkeitsausschluß 30 min mit einem Reagensglasschüttler bei Raumtemperatur suspendiert. Nach Abschluß der Reaktion wurde im Verhältnis 1:1 unter Eiskühlung mit dest. H_2O verdünnt, erschöpfend ausdialysiert und gefriergetrocknet.

Bei den serologischen Untersuchungen wurden außerdem noch Kontrollansätze des Glykoproteins in Pyridin und Pyridiniumacetat mitgeführt.

Trifluoracetylierung

Das Glykoprotein wurde in Tetrahydrofuran (abs.) am Schüttelapparat homogenisiert und nach Abkühlung der Reaktanden in einer Eis-Kochsalzmischung mit einem Überschuß an Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Anschließend wurde unter Feuchtigkeitsausschluß 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde dann auf den 33-fachen Überschuß von 0,5 M KH_2PO_4 -Puffer, pH 7, (bei Raumtemperatur gemessen) gegossen, der zuvor unter starkem Schütteln auf ca. -5 °C abgekühlt worden war. Dabei trat eine Temperaturerhöhung auf ca. 0 °C und eine pH-Verschiebung von 7,12 (0 °C) auf 6,3 (0 °C) ein. Nach Einstellung auf pH 7 wurde erschöpfend dialysiert und gefriergetrocknet. Ansätze des Glykoproteins in Tetrahydrofuran für die serologischen Untersuchungen wurden mitgeführt.

Daneben wurde auch Glykoprotein direkt in Trifluoressigsäureanhydrid suspendiert. Die Reaktionsprodukte wurden an einem Mikrorotationsverdampfer (Fa. Büchi) entfernt (Badtemperatur unter 30 °C).

Acetylierung von *N*-Acetyl-Neuraminsäure

Jeweils 7 mg *N*-Acetylneuraminsäure wurden in 2 ml eines Gemisches von Acetanhydrid—Pyridin (5:4, v/v) unter Schütteln suspendiert. Nach ca. 15 min hatte sich die NS unter Umsetzung klar gelöst. Nach weiteren 33 min Stehen bei Raumtemperatur wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer (Bad max. 40 °C) zu einer glasigen Masse eingengt, die im Vakuum über P_4O_{10} und KOH getrocknet wurde.

Einwirkung von Acetanhydrid auf native Erythrocyten

6mal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschene MN-Erythrocyten wurden in 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer, pH 7, überführt, 2mal darin gewaschen und in 5%iger Suspension (v/v) mit Acetanhydrid in methanolischer Lösung bei 0 °C behandelt.

Zu je 10 ml der Erythrocytensuspension wurden 0,53, 5,3, 53, 530, 880, 1800 und 5400 μmol Acetanhydrid unter starkem Rühren hinzugegeben. Der pH-Wert von 7 wurde während der Inkubationszeit (15–60 min) mit 0,5 bzw. 2 N NaOH konstant gehalten. Für die Einwirkung oberhalb 530 μmol Acetanhydrid wurden die Erythrocyten in 0,15 M Phosphatpuffer, pH 7, suspendiert. Nach dem Abschluß der Reaktion wurden die Erythrocyten bei 1500 U/min zentrifugiert und gewaschen.

Deacetylierung

Es wurde versucht, die Modifikation der Glykoproteine durch Acetylierung mittels verschiedener Verfahren wieder rückgängig zu machen:

a) Eine 1%ige Lösung des Glykoproteins wurde mit 0,1 M Piperidin auf pH 11 eingestellt. Reaktionszeit: 24 Std bei 4 °C.

b) Zu einer 1%igen Lösung wurde Piperidin bis zu einer Endkonzentration von 1 M hinzugegeben. Reaktionsbedingungen: 30 min 0 °C.

c) Einwirkung von Ammoniak (Endkonz.: 1/2 konz.) über 30 min bei Raumtemperatur.

d) Reaktion während 48 Std bei Raumtemperatur in 1:10 verd. Ammoniak (pH 11,6).

e) Weiterhin wurde die enzymatische Abspaltung der Acetylgruppen mit Aminoacylase aus Schweineieren versucht: 0,5 ml einer 0,1%igen Lösung der Aminoacylase in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,16, wurden zu 0,5 ml einer 2%igen Lösung des acetylierten Glykoproteins (gelöst in 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,8) hinzugegeben. Inkubation: 18 Std bei 37 °C.

Bei jedem der beschriebenen Deacetylierungsverfahren wurde auch nicht acetyliertes Erythrocytenglykoprotein zur Kontrolle mitgeführt.

Veresterungsversuche

Veresterung mit Methanol. Das Glykoprotein wurde in Methanol (abs.) homogen suspendiert (2 mg/ml). Dazu wurde (mehrere Tage über P_4O_{10}) im Vakuum bei 70 °C getrocknetes Dowex WX4 (H^+ -Form) gegeben. Das Gewichtsverhältnis Protein—Dowex war 4:1. Die Reaktion wurde während 2 Std bei Raumtemperatur unter häufigerem Schütteln durchgeführt. Danach wurde mehrfach vom Austauscher eluiert und das Methanol vom Glykoprotein im Vakuum abgezogen.

Einwirkung von Diazomethan. Zur Veresterung mit Diazomethan wurde das Glykoprotein in Aceton homogen suspendiert (3 mg/ml). Hierzu wurde eine ätherische Lösung von Diazomethan im Überschuß gegeben. Nach 28 Std Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden das Diazomethan und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei max. 37 °C Badtemperatur abgezogen.

Umsetzung von N-Acetylneuraminsäure mit Diazomethan

5 mg NS wurden in 1 ml Aceton suspendiert und mit 2 ml ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Reaktionsbedingungen und Weiterbehandlung wie bei dem Glykoprotein.

Abspaltung von Neuraminsäure aus nativem und modifiziertem Glykoprotein

0,1%ige Lösungen der Glykoproteine (nativ und nach Modifizierung mit Dowex-Methanol oder Diazomethan und Acetylierung) in 0,5 M Acetatpuffer, pH 6,5 unter Zusatz von 10^{-3} M CaCl_2 , wurden mit Neuraminidase (50 E¹/mg Glykoprotein) aus *Vibrio cholerae* behandelt. Es wurde 2 Std bei 27 °C inkubiert und anschließend mit dest. H_2O bei mehrfacher Wechsel dialysiert, die Dialyseaußenlösungen am Rotationsverdampfer eingengt (Bad max. 37 °C) und dann gefriergetrocknet. Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung wurde in Methanol gelöst und, wie bei Blix [20] sowie Kuhn und Brossmer [21] beschrieben, extrahiert. Daneben wurde auch teilweise eine saure Hydrolyse unter den milden Bedingungen von Schauer und Faillard [22] durchgeführt.

Hitzebehandlung

0,5%ige Lösungen des Erythrocytenglykoproteins mit folgenden Puffern wurden hergestellt: 0,05 M Kaliumhydrogenphthalat, pH 4; 0,025 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7; 0,1 M Glycin-NaOH, pH 10. Die Glykoproteinlösungen wurden 2 Std im kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend erschöpfend dialysiert und gefriergetrocknet.

Bei den meisten Versuchen wurde saures α_1 -Glykoprotein zum Vergleich mitgeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie bereits Lisowska und Morawiecki [14] zeigten, konnten auch wir durch Acetylierung unter verschiedenen Versuchsbedingungen den Verlust der MN-Blutgruppeneigenschaften am isolierten Glykoprotein nachweisen. Die Aktivitätsverluste nach Acetylierung in der wäßrigen Phase unterschieden sich nicht wesentlich von denen nach Acetylierung in der organischen Phase (Tabelle 1).

¹ 1 E entspricht 1 μ NS, die innerhalb von 15 min bei 37 °C aus saurem α_1 -Glykoprotein abgespalten wird.

Tabelle 1. *Einfluß der Acetylierung auf die MN- und Pr₁/Pr₂-Aktivität eines MN-Glykoproteins*

Angegeben sind die noch hemmenden Verdünnungen der 1%igen Glykoproteine

Hemmung	Unbehandeltes Glykoprotein	Acetylierung in	
		wäßriger Phase	organischer Phase
Anti-Pr ₁	1/8	1/4	1/8
Anti-Pr ₂	1/4	1/2	1/2
Anti-M	1/32	0	0
Anti-N	1/8	0	0

Tabelle 2. *Einfluß der Acetylierung in organischem Milieu auf die M-, N-, N_V-, Pr₁- und Pr₂-Aktivität von M- und N-Glykoproteinen*

Angegeben sind die noch hemmenden Verdünnungen der 1%igen Glykoproteine

Hemmung	Unbehandeltes		Acetyliertes		Pyridinium-acetatkontrollen	
	M-Glp.	N-Glp.	M-Glp.	N-Glp.	M-Glp.	M-Glp.
Anti-Pr ₁	1/16	1/8	1/8	1/16	1/8	1/8
Anti-Pr ₂	1/32	1/64	1/64	1/64	1/32	1/32
Anti-M	1/32	—	0	—	1/128	—
Anti-N	—	1/256	—	0	—	1/256
Anti-N _V	—	1/256	—	1/512	—	1/256

Tabelle 3. *Einfluß der Succinylierung auf die MN- und Pr₁/Pr₂-Aktivität eines MN-Glykoproteins*

Angegeben sind die noch hemmenden Verdünnungen der 1%igen Glykoproteine

Hemmung	Unbehandeltes MN-Glykoprotein	Succinyliertes MN-Glykoprotein
Anti-Pr ₁	1/16	1/8
Anti-Pr ₂	1/2	1/4
Anti-M	1/16	0
Anti-N	1/32	0

Im Gegensatz hierzu zeigen die Tabellen 1 und 2 die unveränderte Aktivität der Kälteantikörperrezeptoren Pr₁/Pr₂ sowie des N_V-Antigens nach Acetylierung. Eine Bestimmung der freien Aminogruppen mit der Methode von Moore und Stein [19] zeigte, daß bei der Acetylierung in wäßriger Phase und bei der in organischer Phase nahezu die gleiche Anzahl von Aminogruppen umgesetzt wurden (5,2 bzw. 4,4 von 10,9 Aminogruppen der Kontrollen, bezogen auf ein Molgewicht des Glykoproteins von 30000). Entsprechend dem Verschwinden der freien Aminogruppen tauchen etwa 50% mehr Acetylgruppen als bei der Kontrolle auf.

Im Unterschied zur Acetylierung wurde bei der Succinylierung nur maximal eine Aminogruppe/30000 Molgew. umgesetzt, wobei die MN-Aktivität wiederum verlorenging, während auch hier die Pr₁- und Pr₂-Aktivitäten erhalten blieben (Tabelle 3).

Die Einwirkung von Acetanhydrid auf eine Suspension nativer Erythrocyten brachte über den untersuchten Konzentrationsbereich keinerlei Veränderung der MN- oder Pr-Aktivitäten. Oberhalb einer Acetanhydridkonzentration von $8,8 \times 10^{-2}$ mol/l agglutinierten die Erythrocyten spontan, so daß keine Beurteilung der biologischen Aktivitäten mehr erfolgen konnte. Wahrscheinlich ist der Überschuß anderer, nicht MN-spezifischer Aminogruppen auf den nativen Erythrocyten so groß, daß die verfügbare Acetanhydridmenge für die spezifischen Gruppen zu gering ist. Zudem können physiologische Salzkonzentrationen während der Modifikationen nicht eingehalten werden (Zugabe von NaOH zur Neutralisation der entstehenden Essigsäure), so daß dadurch andere topochemische Verhältnisse auf den Erythrocyten vorliegen könnten.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der durch saure bzw. enzymatische Abspaltung gewonnenen NS von acetyliertem Glykoprotein ergab keinen Unterschied zur Referenz-NS. Als Vergleich wurde außer NS ein Derivatgemisch verwandt, das durch Acetylierung von NS mit Acetanhydrid in Pyridin erhalten wurde. Dadurch wurden 5 verschiedene Derivate erhalten, die sich am besten auf Cellulose-Dünnschichtplatten in einem Gemisch von *n*-Butanol—Eisessig—Wasser (4:1:5, v/v/v) auftrennten. Die Derivate ergaben mit Bials-Reagens [27,28] eine positive Reaktion und ließen sich mit dem Reagens nach Warren [29] nicht darstellen.

Wenn durch die Acetylierung die MN-Blutgruppeneigenschaften des Glykoproteins verlorengingen, so sollte durch Deacetylierung eine Reaktivierung dieser Antigene erreichbar sein. Dazu wurde das acetylierte Glykoprotein einem alkalischen Milieu ausgesetzt und nach Inkubation und erschöpfender Dialyse auf den Gehalt an freien Aminogruppen untersucht. Danach wurden die Antigen-Aktivität und die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit geprüft. Ferner wurde eine Deacetylierung mit Aminoacylase versucht. Mit keiner der verwendeten Bedingungen (s. methodischer Teil) konnte eine Deacetylierung der acetylierten Aminogruppen und damit auch keine Reaktivierung der MN-Antigenität erzielt werden. Durch entsprechende Kontrollen konnte sichergestellt werden, daß die zur Deacetylierung verwendeten Bedingungen die biologischen Eigenschaften des Glykoproteins nicht veränderten. Entsprechend den anderen Ergebnissen (serologische Aktivität, freie Aminogruppen) blieb auch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit unverändert.

Um eine leichtere Abspaltbarkeit der Acetylgruppen zu erreichen, wurde versucht, Trifluoracetylreste einzuführen. Dazu wurde das Glykoprotein in Trifluoressigsäure oder einem Puffer suspendiert bzw. gelöst und das Trifluoracetanhydrid hinzugegeben. Außerdem wurde das Glykoprotein auch direkt in Trifluoressigsäureanhydrid suspendiert.

Tabelle 4. Einfluß der Veresterung mit Methanol und Dowex WX4 auf die serologische Aktivität eines MN-Erythrocyten-Glykoproteins

Angegeben sind die noch hemmenden Verdünnungen der 1^o/igen Glykoproteine

Hemmung	Unbehandeltes MN-Glykoprotein	MN-Glykoprotein nach Methanol-Behandlung
Anti-Pr ₁	1/16	1/8
Anti-Pr ₂	1/2	1/2
Anti-M	1/16	1/32
Anti-N	1/32	1/32

Bei der Bestimmung der freien Aminogruppen konnte keine Umsetzung nachgewiesen werden. Wurde aber das Glykoprotein unmittelbar nach Beendigung der Reaktion (nur bei Reaktion in wasserfreiem Milieu) auf Kieselgel aufgetragen und mit Ninhydrin besprüht, so zeigte sich keine oder nur eine schwach positive Färbung gegenüber der Kontrolle. Dieser Unterschied verschwand aber, sofern das modifizierte Glykoprotein auch nur für wenige Minuten mit Wasser inkubiert wurde. Daraus kann entnommen werden, daß die Aminogruppen zwar acetyliert jedoch sofort bei Inkubation mit Wasser wieder hydrolysiert werden. Sowohl bei der serologischen Aktivitätsbestimmung als auch bei der Bestimmung der freien Aminogruppen sind jedoch längere Inkubationszeiten in Wasser oder Puffer nicht zu vermeiden. Die Versuchsergebnisse können als Hinweis auf die Reversibilität der Aminogruppenblockierung gewertet werden. Diese Annahme wurde durch die serologischen Untersuchungen bestätigt: In keinem Fall waren Änderungen der MN- oder Pr₁/Pr₂-Aktivitäten gegenüber der Kontrolle festzustellen. Lisowska und ihrer Arbeitsgruppe ist es neuerdings ebenso gelungen, die Reversibilität des MN-Aktivitätsverlustes zu zeigen [23].

Die Vorstellung von Uhlenbruck [24] einer Beeinflussung der NS-Konformation durch benachbarte Aminogruppen im Falle der MN-Antigene veranlaßte uns zu folgender Überlegung: Die Möglichkeit der Ausbildung einer stabilisierenden Ionenbindung sollte nach Veresterung der Carboxylgruppe der Neuraminsäure erheblich vermindert sein. Deshalb wurde unter Bedingungen, die freie NS zu mehr als 75% in die Methylesterverbindung überführen (Blix [25] sowie Kuhn und Brossmer [26]), MN-Glykoprotein mit Diazomethan bzw. Methanol und Dowex WX4 umgesetzt. In keinem Fall wurde dadurch eine signifikante Änderung der MN- oder Pr-Aktivitäten festgestellt. Allerdings kann eine hydrolytische Spaltung der Esterverbindung während der Aktivitätsbestimmung nicht voll ausgeschlossen werden (Tab. 4).

Dieses Ergebnis kann also die Annahme einer speziellen, durch Ionenbindung stabilisierten Konformation der NS nicht unterstützen. Lisowska [23]

hat auch in einem Diskussionsbeitrag zu Uhlenbrucks Vorstellungen aufgezeigt, daß die Inaktivierung, zumindest bei dem M-Antigen/Anti-M-System offenbar auch von dem Antiserum abhängt.

Diese Arbeit zeigt erstmals, daß zur Antigenität der NS-determinierten Pr₁/Pr₂-Rezeptoren im Gegensatz zur Antigenität der MN-Antigene freie Aminogruppen nicht erforderlich sind.

Die Untersuchung der Hitzelabilität des Glykoproteins bei verschiedenen pH-Werten erbrachte keine Unterscheidung der MN-antigenwirksamen von der Pr₁-Pr₂-Neuraminsäure. Unter unseren Versuchsbedingungen waren die Aktivitäten der N-, N_V- und Pr-Rezeptoren bei pH 7 und 100 °C über 2 Std nicht verändert. Inkubation bei pH 4 ergab im Unterschied zu den Befunden von Springer [1] keine Erhöhung der N_V-Aktivität, aber völligen Verlust der N- und Pr-Aktivität. Dagegen waren bei pH 10 der Abfall der N_V-Aktivität und die Stabilität der Pr- und N-Rezeptoren (beim Nachweis mit Kaninchen-Anti-N) auffällig.

Wir danken Fr. G. Bierhalter, Fr. E. Kober und Fr. R. Ackermann für vorbildliche technische Mitarbeit.

LITERATUR

- Springer, G. F., Nagai, Y., und Tegtmeier, H., *Biochemistry*, 5 (1966) 3254.
- Lisowska, E., *Eur. J. Biochem.* 10 (1969) 574.
- Adamany, A. M., und Kathan, R. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 (1969) 171.
- Thomas, D. B., und Winzler, R. J., *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 5943.
- Springer, G. F., und Ansell, N. J., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958) 182.
- Roelcke, D., *Vox Sang.* 16 (1969) 76.
- Roelcke, D., und Uhlenbruck, G., *Z. Immun.-Forsch.* 137 (1969) 333.
- Roelcke, D., und Uhlenbruck, G., *Vox Sang.* 18 (1970) 478.
- Roelcke, D., Uhlenbruck, G., und Bauer, K., *Scand. J. Haemat.* 6 (1969) 280.
- Metaxas, M. N., Metaxas-Bühler, M., Romanski, Y., und Büttler, R., *Proc. 11th Congr. Int. Soc. Blood Transfusion, Sydney 1966*. Karger, Basel 1968, p. 399.
- Roelcke, D., Uhlenbruck, G., und Metaxas, M. N., *Z. Immun. Forsch.* 141 (1971) 141.
- Ebert, W., Metz, J., Weicker, H., und Roelcke, D., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (im Druck).
- Roelcke, D., Ebert, W., Metz, J., and Weicker, H., *Vox Sang.* (im Druck).
- Lisowska, E., und Morawiecki, A., *Eur. J. Biochem.* 3 (1967) 237.
- Klenk, E., und Uhlenbruck, G., *Z. Physiol. Chem.* 319 (1960) 151.
- Ottensmeyer, F., und Silberschmidt, K., *Nature (London)*, 172 (1953) 914.
- Roelcke, D., und Dorow, W., *Klin. Wschr.* 46 (1968) 126.
- Roelcke, D., und Jungfer, H., *Klin. Wschr.* 48 (1970) 914.
- Moore, S., und Stein, W. H., *J. Biol. Chem.* 211 (1954) 907.
- Blix, G., und Jeanloz, R. W., in *The Amino Sugars* (edited by R. W. Jeanloz), Academic Press, New York, London 1969, Vol. IA, p. 218.

21. Kuhn, R., und Brossmer, R., *Angew. Chem.* 89 (1956) 2013.
22. Schauer, R., und Faillard, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349 (1968) 961.
23. Lisowska, E., Diskussionsbeitrag in: Uhlenbruck, G., and Wintzer, G., *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York 1970, p. 289.
24. Uhlenbruck, G., und Wintzer, G., *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York 1970, p. 289.
25. Blix, G., und Jeanloz, R. W., in *The Amino Sugars* (edited by R. W. Jeanloz), Academic Press, New York, London 1969, Vol. IA, p. 240.
26. Kuhn, R., und Brossmer, R., *Angew. Chem.* 68 (1956) 211.
27. Svennerholm, L., *Arkiv Kemi*, 10 (1957) 577.
28. Svennerholm, L., *Biochem. Biophys. Acta*, 24 (1957) 604.
29. Warren, L., *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1971.

Gegenwärtige Adresse von W. Merz:
Institut für Biochemie II der Universität
BRD-6900 Heidelberg, Akademiestraße 5
Bundesrepublik Deutschland

D. Roelcke
Institut für Immunologie und Serologie der Universität
BRD-6900 Heidelberg, Voßstraße 2
Bundesrepublik Deutschland