

Determination of free fatty acids in plasma under diverse conditions

1. Following an intravenous injection of 250 μg adrenaline over a period of 2 min., a steep increase in the free fatty acid content of both arterial and venous blood was observed within 10 min. The arteriovenous difference, which before the injection of adrenaline is very small, increased to a maximum after 10 min., and returned to the original value after 20 min. The arterial blood was sampled from the *A. brachialis dextra*, and the venous sample was obtained by inserting an approximately 20 cm long catheter deeply into the muscle tissue of the left forearm (Fig. 6).

2. Arterio-coronary-venous difference in patients suffering from cardiac insufficiency were subjected to extreme strain on a bicycle ergometer. As already reported for athletes who go in for top-strain sports (8, 9), the con-

centration of free fatty acids in their blood is seen to increase during the physical exertions. The concentration of free fatty acids is at its greatest after 3 min. of maximum exertion. Obviously, the arterio-coronary-venous difference during maximum exertion becomes greater as a result of an increasing extraction of free fatty acids by the heart muscle (Fig. 7).

3. The determination of free fatty acids in the plasma of horses in rest and after a training of 20 min. was made and the results are given in table 4.

Tab. 4
Free fatty acids (μ equiv./ml) in the plasma of horses in rest and after training of 20 min.

horses	rest	after exercise
P.	0.048	0.178
D.	0.117	0.176
P. W.	0.078	0.261
R.	0.048	0.245

References

1. DOLE, V. P., *J. Clin. Invest.* 35, 150 (1956). — 2. GORDON, R. S. jr., and A. CHERKES, *J. Clin. Invest.* 36, 810 (1957). — 3. NELSON, G. H., *Amer. J. Obstetr. Gynec.* 92, 202 (1965). — 4. KELLEY, T. F., *Analytic. Chem.* 37, 1078 (1965). — 5. DOLE, V. P. and H. MEINERTZ, *J. biol. Chemistry* 235, 2595 (1960). — 6. TROUT, D. L., E. H. ESTES, jr., and S. J. FRIEDBERG, *J. Lipid Res.* 1, 199 (1960). — 7. LINNET, N., Automatic titration of free

fatty acids in plasma, ST 48, Radiometer, Copenhagen, Denmark. — 8. FREDRICKSON, D. S. and R. S. GORDON, *Physiol. Rev.* 38, 585 (1958). — 9. KEUL, J., E. DOLL, H. STEIM, H. HOMBURGER, H. KERN and H. REINDELL, *Pflügers Arch. Physiol.* 282, 1 (1965). — 10. KEUL, J., E. DOLL, H. STEIM, H. HOMBURGER, H. KERN and H. REINDELL, *Zschr. Kreisl.forsch.* 55, 190 (1966).

Doz. Dr. J. Keul
Medizinische Univ. Klinik
78 Freiburg
Hugstetterstr. 55

Isolierung eines Xylose-haltigen Glykoproteids aus dem Erythrocyten-Stroma¹⁾

VON H. WEICKER

Aus der Abteilung für Stoffwechselforschung (Leiter: Prof. Dr. H. Weicker) der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Plügge)

(Eingegangen am 27. März 1968)

Aus dem Erythrocyten-Stroma von 25 Blutspenderkonserven, die nach den Blutgruppeneigenschaften A, B, 0, MN, Rh und nach der Länge der Lagerungszeit der Konserven klassifiziert worden waren, wurden mit dem Phenol-Wasser-System nach der Methode von WESTPHAL und Mitarbeitern, modifiziert von UHLENBRUCK und Mitarbeitern, zwei chemisch und serologisch unterschiedliche Glykoproteide dargestellt.

Das Glykoprotein (W), isoliert aus der Wasser-Phase, enthält MN-Antigen und Virus-Rezeptoren. Wir konnten im wesentlichen die in der Literatur beschriebenen chemischen Eigenschaften dieser Substanz bestätigen, fanden jedoch, daß die Ausbeute von den Blutgruppeneigenschaften und der Lagerungszeit der Konserven abhängig war. Bei 0- und AB-Erythrocyten war die Ausbeute am höchsten und zeigte auch die geringste Beeinflussung durch längere Lagerungszeit. Entgegen den Befunden anderer Autoren fanden wir bei den M-Erythrocyten den höchsten Neuraminsäuregehalt, der bei 22–24% lag und zu 85–90% enzymatisch abspaltbar war. Die Kohlenhydrat-Komponenten des Glykoproteids (W) waren Galaktose, Mannose, Fucose in einer Verteilung von 4:2:1 sowie Galaktosamin, Glucosamin in einer Verteilung von 5:3. Der Gesamtkohlenhydratgehalt betrug 37–41%. Insgesamt waren 16 Aminosäuren chromatographisch zu identifizieren.

Das bis jetzt noch nicht beschriebene Glykoprotein (P) wurde aus der Phenol-Phase nach Entfernung der Lipide isoliert und enthielt Xylose in einer Konzentration von 3–3,5%. Es hatte einen geringeren Neuraminsäuregehalt (8–10%) als das Glykoprotein (W). Die Neuraminsäure war nur zu 60–70% abspaltbar. Seine Kohlenhydrat-Komponenten waren Galaktose, Mannose, Fucose, Xylose, Glucose in einer Verteilung von 4:2:1:3:1 und Galaktosamin, Glucosamin in einer Verteilung von 3:2 bei einem Gesamtkohlenhydratgehalt von 20–25%. Die Aminosäure-Zusammensetzung zeigte keine wesentlichen Unterschiede zu dem Glykoprotein (W). Das Glykoprotein (P) besaß keine MN-Antigen-Eigenschaften und hemmte die Virus-Hämagglutination nur geringfügig.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

The isolation of a xylose-containing glycoprotein from erythrocyte stroma

We isolated two glycoproteins from the stroma of erythrocytes using the phenol-water-system of WESTPHAL and coworkers, modified by UHLENBRUCK and coworkers.

The glycoprotein (W) with MN antigens and virus receptor properties was derived from the water phase. It has already been characterised by many investigators.

The second, xylose-containing glycoprotein (P), described here for the first time, was isolated from the phenol phase after the lipids and glycolipids had been removed by extraction with organic solvents. The investigations were carried out with the stroma of erythrocytes derived from 25 different blood donors. Each stroma preparation was specified according to the A, B, O, MN and Rh blood group properties, and the different storage time of the blood.

We were able to confirm in general the chemical and serological properties of glycoprotein (W) containing MN antigens and virus receptors described by other authors. However, we found in addition that the yield depended strongly in the ABO blood group properties and the storage time of the blood. The highest yield was found with AB and O erythrocytes, which were influenced less by the storage time than A and B erythrocytes. The glycoprotein with M properties had the highest content of sialic acid (22—24%), of which up to 85—90% could be liberated by neuraminidase. The carbohydrate components are galactose, mannose and fucose in a ratio of 4:2:1, and galactosamine and glucosamine in a ratio of 5:3. The total amount of carbohydrates was 37—41%. 16 amino acids were identified chromatographically.

The second glycoprotein (P), isolated from the phenol phase after the lipids and glycolipids had been removed, contains 3—3.5% xylose and has no MN antigens and less virus receptor properties. The sialic acid content (8—10%) is lower than that of the glycoprotein (W). The sialic acid can be liberated enzymically only up to 60—70%. The carbohydrate components are galactose, mannose, fucose, xylose and glucose in a ratio of 4:2:1:3:1. The galactosamine:glucosamine ratio is 3:2. The total carbohydrate amount was 20—25%.

Die Glykoproteide des Erythrocyten-Stromas sind für die physiko-chemischen Eigenschaften und die Rezeptor-Funktionen der Erythrocyten-Oberfläche von großer Bedeutung. Als Träger der MN-Blutgruppen-Antigene und der Virus-Rezeptoren sind diese Stroma-Glykoproteide durch eingehende serologische und chemische Untersuchungen recht gut charakterisiert (1—24). Zur Isolierung des Glykoproteids aus dem Stroma hat sich die von WESTPHAL und Mitarbeitern (25) ausgearbeitete und von UHLENBRUCK und SCHMID (15) modifizierte Darstellungsmethode mit einem Phenol-Wasser-NaCl-System gut bewährt. Bei dem Vergleich der mitgeteilten Untersuchungsergebnisse fällt jedoch auf, daß bei der schon theoretisch zu erwartenden geringen Glykoprotein-Ausbeute die Schwankungsbreite des Gesamtkohlenhydratgehaltes und der prozentualen Verteilung der einzelnen Kohlenhydratkomponenten des Glykoproteids relativ groß ist (2, 3, 4, 12, 15, 19, 20). Dies dürfte in erster Linie darauf zurückzuführen sein, daß bei der kleinen Glykoprotein-Ausbeute weitere Reinigungsverfahren nur bedingt möglich sind und zur Durchführung von Einzelanalysen nur geringe Einsatzmengen zur Verfügung stehen.

Von den meisten Untersuchern wurde deshalb die Isolierung des Glykoproteids aus gepooltem Spenderblut ohne Klassifizierung der Einzelproben nach verschiedenen Blutgruppen-Systemen vorgenommen. Die Ergebnisse wurden vorwiegend bei O-Erythrocyten gewonnen, da hierbei die höchste Glykoprotein-Ausbeute zu erzielen war. Weiterhin wurde in der Aufarbeitung der Erythrocyten weder die Lagerungszeit der Blutkonserven berücksichtigt, noch wurden Vergleichsuntersuchungen zwischen dem Neuraminsäuregehalt des isolierten Glykoproteids und dem Neuraminsäuregehalt der Nativ-Erythrocyten durchgeführt.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte klassifizierten wir unser Untersuchungsmaterial sowohl nach ABO-, MN- und Rh-Eigenschaften als auch nach der unterschiedlichen Lagerungszeit der Blutkonserven. Das isolierte Stroma-Glykoprotein wurde durch Ionenaus-

tauscher-Chromatographie einer weiteren Reinigung unterzogen. Nach Modifikation einzelner Analysemethoden war es möglich, die chemische und serologische Charakterisierung der Substanz bei einer Gesamtmenge von 16—18 mg mit gut reproduzierbaren Werten vorzunehmen.

Da wir außer dem Glykoprotein (W) mit MN-Antigen- und Virus-Rezeptor-Eigenschaften noch ein Xylosehaltiges Glykoprotein (P) ohne diese serologischen Merkmale erstmalig in dem Stroma nachweisen konnten, war die Gegenüberstellung dieser beiden Glykoproteide recht aufschlußreich.

Material und Methoden

Die Glykoprotein-Isolierung wurde aus 25 Blutspenderkonserven von 450 bis 500 ml Blut vorgenommen, die neben den Blutgruppeneigenschaften MN, Rh, ABO auch nach der Lagerungszeit der Konserven in Gruppen von 1—5 Tagen, 5—20 Tagen und älter als 20 Tagen eingeteilt worden waren. Im Einzel-Untersuchungsansatz wurden 220 bis 250 ml gewaschene sedimentierte Erythrocyten verwandt.

Das MN-Antigen-haltige Glykoprotein (W) wurde aus der NaCl-haltigen wäßr. Phase nach WESTPHAL und Mitarbeitern (25), modifiziert nach UHLENBRUCK und SCHMID (15) isoliert.

Die Darstellung eines bis jetzt noch nicht beschriebenen Glykoproteids (P) der Erythrocyten-Membran wurde wie folgt vorgenommen: Nach 2-tägiger Dialyse der Phenolphase gegen fließendes Wasser wurde 2 Tage gegen dest. Wasser dialysiert. Der Dialyserückstand wurde gefriergetrocknet und nach Pulverisierung des Lyophilisates mit Methanol und anschließend mit Chloroform:Methanol = 2:1 (v/v) am Rückfluß jeweils 8 Stdn. bei 50—60° extrahiert. Nach Extraktion der Lipide wurde der trockene Rückstand in Wasser suspendiert und nach mehrfachem Zentrifugieren und wiederholtem Aufschwimmen des Zentrifugates der wäßr. Überstand, in dem sich das Xylose-haltige Glykoprotein befand, dialysiert und gefriergetrocknet (Abb. 1).

Reinigung der Glykoproteide

Die Glykoproteide (W) und (P) des Stromas wurden 1proz. in Wasser gelöst und die wasserunlöslichen Verunreinigungen durch Zentrifugation bei 17 000 U./Min. abgetrennt. Der Überstand wurde nach Dialyse gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in wäßr. Lösung über Sephadex G 150 gefiltriert oder an einer Ionenaustauschersäule Amberlite CG 50 II, H⁺-Form 100—200 mesh, chromatographiert. Die Verwendung des Ionenaustauschers

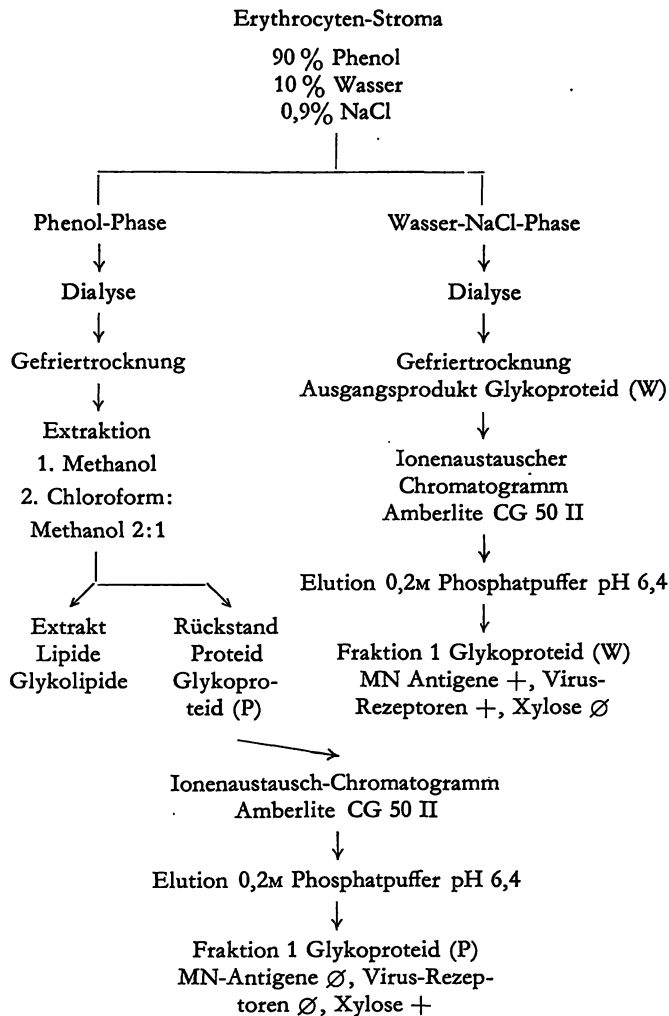


Abb. 1

Schema der Darstellung von Stroma-Glykoprotein (W) und (P)

machte folgende Vorbereitung erforderlich: 24-stdg. Waschen des Amberlite CG 50 II in dest. Wasser, Entfernung des dest. Wassers durch Abnutschen, 4-stdg. Waschen in Aceton, Entfernen des Acetons durch Abnutschen und Nachwaschen mit dest. Wasser. Die Überführung in die H⁺-Form erfolgte durch 4-stdg. Waschen des Austauschers mit 4N HCl. Nach Entfernung der HCl mit dest. Wasser wurde der Austauscher in 0,2M Natrium-Phosphatpuffer pH 6,4 gebracht. Nach 8 Stdn. Füllen der Säule (Ø 0,8 cm, Länge 30 cm) und Spülen der Säule mit Phosphatpuffer bis ein konstanter pH-Wert von 6,4 erreicht war. Bei der feinen Korngröße muß die Aufschwemmung des Ionenaustauschers in den einzelnen Präparationsstufen unter ständigem Rühren vorgenommen werden. Nach Auftragen von 30—50 mg Glykoprotein-Ausgangssubstanz in Phosphatpuffer-Lösung (1 g/100 ml) erfolgt die stufenweise Elution mit

1. 0,2M Phosphatpuffer pH 6,4
2. Puffergradient mit fallender Ionenstärke
3. 0,1N HCl und
4. 1proz. Ammoniak.

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 1—2 ml pro 5 Min. Die Registrierung der Fraktionen erfolgte mit dem LKB-Uvicord bei 254 nm und kolorimetrischer Bestimmung der Neuraminsäure in den einzelnen Fraktionen nach der Methode von SVENNERHOLM (29).

Folgende Einzeluntersuchungen wurden durchgeführt:

N-Bestimmung nach KJELDAHL,
Ermittlung der Gesamthexosen mit der Orcin- und Anthron-Methode, bezogen auf einen Galaktose-Standard (26, 27),
Fucose-Bestimmung nach DISCHE und SHETTLES (28),

Neuraminsäure-Bestimmung mit der Resorcin-Methode von SVENNERHOLM (29),

Bestimmung der enzymatisch freigesetzten Neuraminsäure nach der Methode von WARREN (30),

Neuraminidase-Abbau mit 1 mg (500 IE) kristalliner Neuraminidase (aus *Vibrio cholerae*) (1 Ampulle), Behring-Werke, Marburg. Eingesetzt wurden 2 mg Glykoprotein,

Bestimmung der Neuraminsäure an den Nativ-Erythrocyten nach der Methode von TISCHER und PETERS (31),

Glucuronsäure-Bestimmung nach DISCHE und SHETTLES, modifiziert von GREGORY (32, 33),

Xylose-Bestimmung mit der kolorimetrischen Methode von ROE und RICE (34), nach Hydrolyse des Glykoproteids mit 2N Schwefelsäure, anschließender Neutralisation der Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd bei 50° und Entfernung des restlichen Bariums an Dowex 50 X 8 (200—400 mesh), H⁺-Form,

Hexosamin-Bestimmung nach Hydrolyse des Glykoproteids mit 8N HCl (3 Stdn. 100°) mit der Methode von CESSI (35). Der Neutralzucker-Verlust durch Hydrolyse wurde durch die Quote des Hydrolyse-Verlustes der Reinsubstanz korrigiert.

Chromatographische Untersuchungen

Zur Chromatographie der Neutralzucker wurden 2 mg Glykoprotein mit 1 ml 2N Schwefelsäure bei 100° 4 Stdn. hydrolysiert, und die Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd neutralisiert. Das Hydrolysat wurde auf ein kleines Volumen eingengt und in Streifen auf Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen. Als bestes Lösungsmittel-System bewährte sich das von VOMHOF und TUCKER (36) beschriebene Lösungsmittel tert. Butanol/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser = 8:6:3:3 (v/v) bei zweimaligem Entwickeln der Platte. Die Zucker wurden mit Anilinphthalat sichtbar gemacht. Die quantitative Zuckerbestimmung wurde nach chromatographischer Trennung auf Papier mit 2proz. Triphenyltetrazoliumchloridlösung in 0,5N NaOH (37) vorgenommen, die eine Fehlerbreite von 5—8% hat. Die Nachweisgrenze lag bei 15—20 µg der einzelnen Zuckerkomponenten. Die Untersuchungen mit verschiedenen Hydrolyse-Methoden (80proz. Ameisensäure, 50proz. Trichloressigsäure, Ionenaustauscher Dowex und Amberlite in H-Form) zeigten, daß diese der Technik mit 2N Schwefelsäure nicht überlegen waren. Vergleichende chromatographische Untersuchungen auf verschiedenen Cellulose-Sorbentien und Papier zeigten keine besseren Trennergebnisse als diejenigen, die wir auf Cellulose-Fertigplatten (Merck) erhalten hatten.

Die chromatographische Neuraminsäure-Identifizierung wurde nach enzymatischer Hydrolyse mit Neuraminidase (1 mg (500 IE), Neuraminidase Behring-Werke Marburg), Dialyse der Neuraminsäure und Entsalzung des Dialysates über Ionenaustauscher Dowex-H⁺ 50 X 8 (200—400 mesh) auf Cellulose-Dünnschichtplatten im Laufmittel nButanol/nPropanol/0,1N HCl = 1:2:1 (v/v) durchgeführt (15). Der Nachweis erfolgte mit alkalischem Silbernitrat und BIALS-Regenz.

Die Aminos Zucker wurden nach Hydrolyse des Glykoproteids mit 8N HCl (3 Stdn. bei 100°) nach Entfernung der HCl durch Stickstoff zur Trockene gebracht und chromatographisch auf Papier in dem Lösungsmittelsystem von FISCHER und NEBEL (38) nach 18-stdg. Chromatographie mit alkalischem Silbernitrat nachgewiesen. Diese Identifizierung der Aminos Zucker wurde durch den Ninhydrin-Abbau des Galaktosamins zu Lyxose und des Glucosamins zu Arabinose chromatographisch auf Cellulose-Dünnschichtplatten in dem Laufmittel von VOMHOF und TUCKER (36) bestätigt. Die Chromatogramme der Aminosäuren wurden auf Cellulose-Dünnschichtplatten im Kleinformat 7,4 × 7,4 cm in Schieferdecker-Färbeküvetten, die in Kammern von 10 × 10 × 15 cm gebracht wurden, angefertigt. Hierzu wurde 1 mg Glykoprotein in 1 ml 6N HCl 24 Stdn. hydrolysiert, die Salzsäure mit Stickstoff vertrieben, das trockene Hydrolysat in 0,01 ml Wasser aufgenommen und 0,001 ml aufgetragen. Das Lösungsmittel-System bestand aus nButanol/Eisessig/Wasser = 12:3:5 (v/v) für die 1. Dimension und Phenol/Ammoniak/Wasser = 640:3,4:144 (v/v) für die 2. Dimension. Die Aminosäuren wurden mit 0,2proz. Ninhydrin-Lösung in Aceton bei 100° dargestellt.

Die Überprüfung des *Reinheitsgrades der Glykoproteide* erfolgt mit Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folien in 0,2M Veronal-Puffer pH 8,2 und der Disk-Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel in einem Tris-Puffer-System pH 8,9 und 6,9. Die Darstellung erfolgte mit Amidoschwarz.

Ergebnisse

Das MN-Antigen-haltige Stroma-Glykoprotein (W) wurde nach der Methode von WESTPHAL und Mitarbeitern (25), modifiziert von UHLENBRUCK und SCHMID (15) aus der NaCl-haltigen wäßr. Phase isoliert. Das Glykoprotein (P), das sich in seinen chemischen und serologischen Eigenschaften von dem Glykoprotein (W) eindeutig unterscheidet, konnte aus der Phenolphase der Stroma-Präparation dargestellt werden, nachdem die Lipide mit organischen Lösungsmitteln extrahiert worden waren. Das Glykoprotein (P) wurde aus dem trockenen lipidfreien Extraktückstand mit Wasser ausgezogen. Die Glykoproteide (W) und (P) wurden durch Ionenaustauscher-Chromatographie an einer Amberlite-Säule CG 50 II durch stufenweise Elution mit Phosphatpuffer pH 6,4 und Phosphatpuffer-Gradienten in fallender Ionenstärke gereinigt. Diese Technik war der Reinigung durch Sephadex-Gel-Filtration überlegen, bei der wir mehrere Fraktionen erhielten, die sich in ihrer Zusammensetzung jedoch nur geringfügig unterschieden (Abb. 2, 3). Bei der Ionenaustauscher-Säulenchromatographie wurde das neuraminsäurereiche Glykoprotein (W) und das Xylose-haltige Glykoprotein (P) in getrennten Läufen jeweils in der Hauptfraktion, die mit 0,2M Phosphatpuffer eluiert worden war, dargestellt. Die Ausbeute an gereinigtem Glykoprotein betrug 60–65% des Ausgangsmaterials. Sie war jedoch ebenso wie die an Erythrocyten-Stroma von den AB0-Eigenschaften der Erythrocyten und der Lagerungszeit der Blutkonserven abhängig. Bei 0-Erythrocyten war die Ausbeute an Glykoprotein am größten, wir fanden

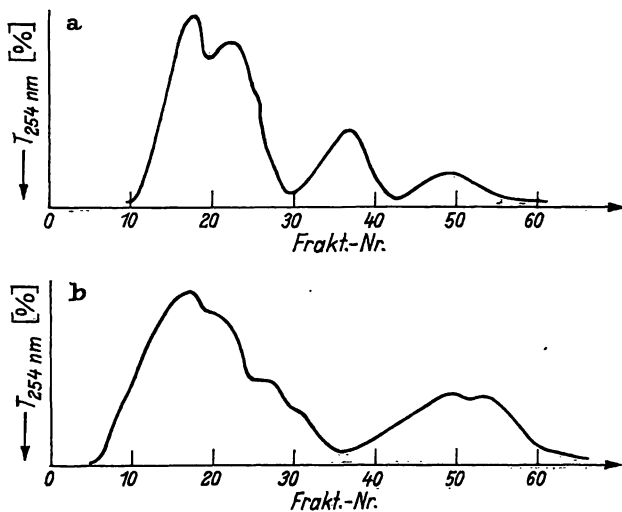


Abb. 2

Fraktionierung des MN-haltigen Stroma-Glykoproteids (W) an Sephadex Gel G 75. Elutionsmittel: Wasser; Elutionsgeschwindigkeit: 1 ml/Min. Säulenlänge 40 cm, Ø 2,5 cm.

- a) 140 mg Glykoprotein aus gepoolten Konserven verschiedener Blutgruppen
b) 150 mg Glykoprotein aus einer Konserve Blutgruppe 0

2,5–4,0%, berechnet auf die Stromamenge. Die Stroma-Ausbeute, bezogen auf das Erythrocyten-Trockengewicht, betrug 2–3%. Längere Lagerung der Blutkonserven bedingte eine erhebliche Reduktion dieser Ausbeute, die für Stroma und Glykoprotein bei Lagerungszeiten über 20 Tage 40–50% ausmachen konnte (Tab. 1). Die quantitative Ausbeute bei AB-Erythrocyten unterschied sich nicht wesentlich von derjenigen bei 0-Erythrocyten. Bei A- und B-Blutgruppeneigenschaften hingegen war auch bei kurzfristiger Lagerungszeit die Glykoprotein-Menge erheblich herabgesetzt und wurde besonders bei den B-Erythrocyten durch Lagerungszeiten über 20 Tage noch stärker reduziert (Tab. 1, 2). Die MN-Eigenschaften hatten keinen Einfluß auf die Glykoprotein-Ausbeute, waren jedoch für die quantitative Kohlenhydrat-Zusammensetzung und besonders für den Neuraminsäure-Gehalt des Glykoproteids (W) bedeutungsvoll. Rh-Eigenschaften beeinflussten die Ausbeute und die Kohlenhydratzusammensetzung des Glykoproteids (W) nicht. Im Gegensatz zu dem Glykoprotein (W) wurde die Menge des Glykoproteids (P) von den AB0-Eigenschaften der Erythrocyten und der Lagerungszeit kaum beeinflusst. Hier fanden wir jedoch eine Abhängigkeit der prozentualen Kohlenhydrat-Zusammensetzung von dem AB0-System. Hingegen hatten die MN-Eigenschaften keinen Einfluß auf den

Tab. 1
Ausbeute des MN-Antigen-haltigen Glykoproteids (W) bei verschieden langer Lagerungszeit der Konserven

Lagerungszeit in Tagen n	1–5 5	5–15 5	20 10
Erythrocyten eingesetzt (g)	63	65	50
Stroma-Glykoprotein (W) in mg	54	36	16
Glykoprotein (W) in % des Erythrocyten-Gewichts	0,08	0,06	0,03
Neuraminsäure des Glykoproteids (W) in mg	10,6	7,3	3,3
Neuraminsäure des Nativ-Erythrocyten in mg	45,2	56,3	35,4
Neuraminsäure in % des Glykoproteids (W)	0,016	0,011	0,006
Neuraminsäure in % der Nativ-Erythrocyten	0,07	0,085	0,07

Kohlenhydratgehalt und die Verteilung der Kohlenhydrat-Komponenten (Tab. 3, 4).

Die immunologischen Untersuchungen mit Immundoppel-Diffusion und Immun-Elektrophorese sowie die Reinheitsprüfung der Glykoproteide auf Cellulose-Acetat-Folien und mit der Disk-Elektrophorese zeigten nach Reinigung der Ausgangssubstanz keine Beimengung von Serum-Proteinen (Abb. 4). In der Disk-Elektrophorese allerdings konnten wir sowohl bei Glykoprotein (W) und (P) noch 2 Banden mit Amidoschwarz darstellen, ein Befund, der jedoch bei dieser Technik nicht als sicheres Zeichen von chemischer Heterogenität zu deuten ist, da wir auch bei immunologisch reinen Serum-Proteinen oft mit der Disk-Technik noch mehrere Fraktionen beobachten konnten. Dies erklärt sich wahrscheinlich durch Proteinaggregatbildung immunologisch identischer Proteine, die aufgrund der unterschiedlichen Aggregatgrößen durch den Siebeffekt des Acrylamid-Gels getrennt werden.

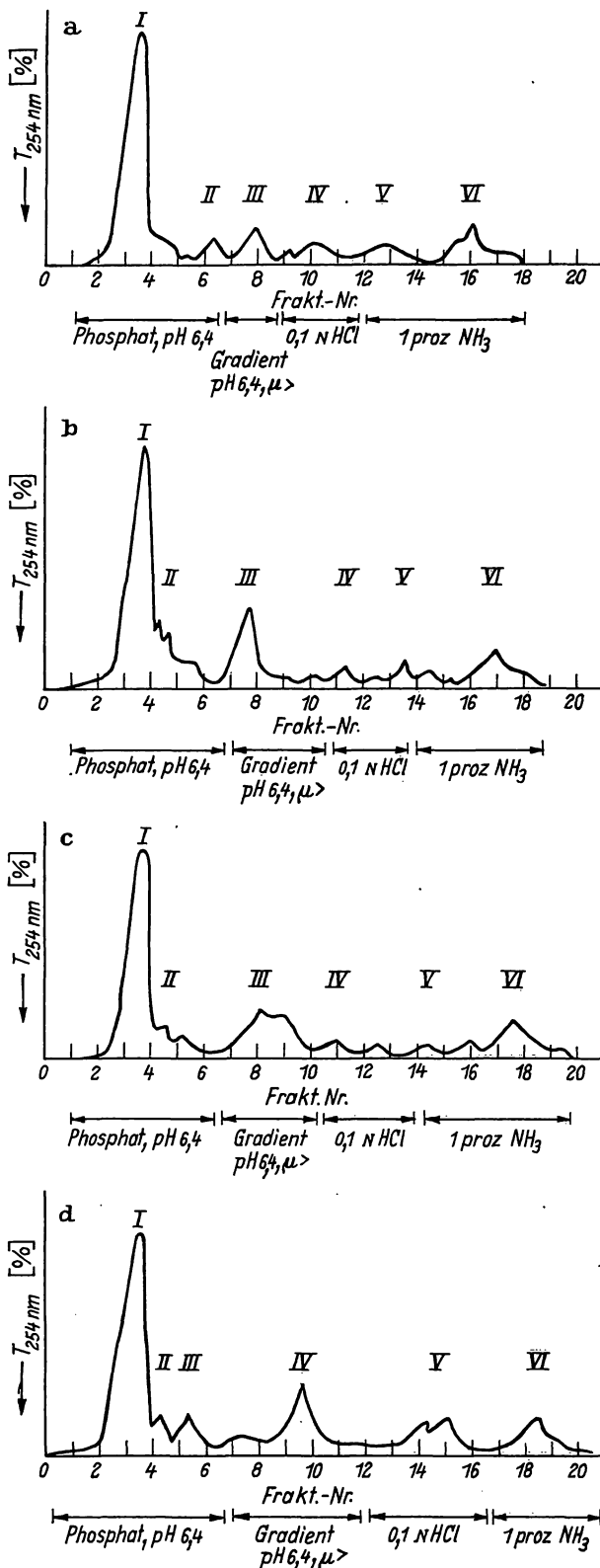


Abb. 3

Elutionsdiagramme von Stromaglykoproteiden

a)–c) Glykoprotein (W)

d) Glykoprotein (P)

Passage an Ionenaustauscher Amberlite CG 50 II. Säule 30 cm lang, Ø 0,8 cm. Elutionsgeschwindigkeit 2 ml/5 Min.

Elutionsmittel:

1. 0,2M Phosphatpuffer, pH 6,4
2. Phosphatpuffergradient pH 6,4 fallender Ionenstärke, Anfangskonzentration 0,2M
3. 0,1N HCl
4. 1proz. Ammoniak

Es wurden folgende Konserven untersucht:

a) Konserve 14 (W) Blutgruppe 0 Rh (+) N, S (+)

Fraktion	I	II	III	IV	V	VI
Ausbeute in mg	24	1	2	0,6	0,4	2
MN Antigen	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
Virusrezeptor	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
N-Acetyl-Neuraminsäure	++	+	(+)	Ø	Ø	Ø

b) Konserve 9 (W) Blutgruppe 0 Rh (+) MN, S (–)

Ausbeute in mg	15	4	6	2	0,6	2
MN Antigen	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
Virusrezeptor	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
N-Acetyl-Neuraminsäure	++	+	(+)	Ø	Ø	Ø

c) Konserve 13 (W) Blutgruppe 0 Rh (+) M, S (–)

Ausbeute in mg	22,5	2,5	2,4	0,1	0,4	2,5
MN Antigen	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
Virusrezeptor	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø
N-Acetyl-Neuraminsäure	++	+	Ø	Ø	Ø	Ø

d) Konserve 13 (P) Blutgruppe 0 Rh (+) M, S (–)

Ausbeute in mg	19	0,7	7,0	7,0	0,5	0,2
MN Antigen	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Virusrezeptor	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
N-Acetyl-Neuraminsäure	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø

Tab. 2

A bhängigkeit der Glykoprotein-Ausbeute und des Neuraminsäuregehaltes von Glykoprotein und Nativ-Erythrocyten von AB0-Blutgruppeneigenschaften und unterschiedlich langer Lagerungszeit der Blutkonserven

Blutgruppe	Lagerungsdauer	Stroma-Glykoprotein in % des Erythrocytengewichts	Neuraminsäure	
			in % des Stroma-Glykoproteids	in % der Nativ-Erythrocyten
AB	1–5 Tage	0,09	0,018	0,08
A		0,05	0,01	0,06
B		0,05	0,01	0,06
0	über 20 Tage	0,074	0,015	0,07
AB		0,04	0,008	0,1
A		0,032	0,007	0,06
B		0,015	0,063	0,03
B		0,05	0,010	0,08
0				

Tab. 3

Prozentualer Anteil der Kohlenhydrat-Komponenten und des Proteinanteils von Fraktion 1 des Glykoproteids (W) mit verschiedenen MN-Antigen-Eigenschaften nach Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie an Amberlite CG 50 II. Glykoprotein (W) isoliert aus Erythrocyten der Blutgruppe 0, M, Rh (+); 0, MN, Rh (+); 0, N, Rh (+); AB, N, Rh (+) und AB, N, rh (-).

	0, M Rh (+)	0, MN Rh (+)	0, N Rh (+)	AB, N Rh (+)	AB, N rh (-)
Neuraminsäure	23,0	19,0	18,0	17,0	17,0
Hexosen	10,3	14,5	14,0	16,0	14,0
Hexosamin	8,2	6,8	9,0	8,3	8,0
Fucose	1,5	0,5	0,6	0,6	0,6
Glucuronsäure	0,5	1,0	1,5	1,6	1,0
Gesamtkohlenhydrate	43,5	41,8	43,1	43,5	40,6
Proteinanteil	47,0	44,0	46,0	51,0	50,0

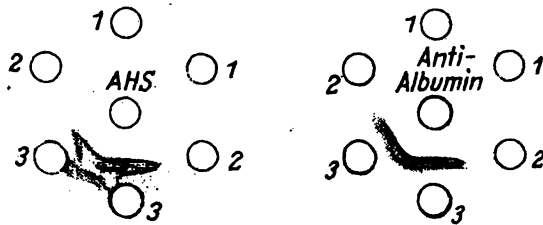


Abb. 4

Immunodiffusion nach OUCHTERLONY des Glykoproteids (W) vor (3) und nach (1, 2) Ionenaustauscher-Säulenpassage, links polyvalentes Human-Antiserum, rechts Antialbumin

Tab. 4

Vergleich der prozentualen Anteile der Kohlenhydrat-Komponenten des MN-Antigen-haltigen Glykoproteids (W) und des Xylose-haltigen Glykoproteids (P), isoliert von 0, M, Rh (+)-Erythrocyten. Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie an Amberlite CG 50 II

	Glykoprotein (W)	Glykoprotein (P)
Neuraminsäure	23,0	11,0
Hexosen	10,3	13,0
Hexosamin	8,2	6,0
Fucose	1,5	0,5
Glucuronsäure	0,5	1,0
Xylose	nicht nachweisbar	3,5
Gesamtkohlenhydrate	43,5	35,0
Proteinanteil	47,0	59,0

Die mit kolorimetrischen und chromatographischen Methoden ermittelten Kohlenhydratkomponenten hatten bei dem gereinigten Glykoprotein (W) einen Gesamtgehalt von 37—41%, der um etwa 3—4% höher lag als bei der Ausgangssubstanz. Chromatographisch war auf Cellulose-Dünnschichtplatten Galaktose, Mannose und Fucose in einer Verteilung von 4:2:1 zu identifizieren (Abb. 5). Die Neuraminsäure, die für MN-Antigene und Virus-Rezeptoren des Glykoproteids (W) die determinierende Kohlenhydratkomponente ist, hatte in dem gereinigten Glykoprotein (W) eine Konzentration von 17—23% gegenüber 14—18% in der Ausgangssubstanz. Sie war mit Neuraminidase zu 85—90% abspaltbar und konnte chromatographisch als N-Acetyl-Neuraminsäure identifiziert werden. Bei Erythrocyten mit M-Eigenschaften fanden wir die höchsten Neuraminsäure-Konzentrationen, wie aus Vergleichsuntersuchungen von 0-Erythrocyten mit verschiedenen M-, N- und MN-Antigenen zu ersehen war (Tab. 3). Hingegen war bei Erythrocyten mit M-Antigenen die Hexosekonzentration etwas niedriger, die Fucose zeigte bei verschiedenen MN-Fractionen keine Differenz. Die Hexosamin-Bestimmung wurde nach der Methode von CESSI (35) durchgeführt, da mit dieser Technik die Aminozuckerchromogen-Bildung

durch farbgleiche Chromogene aus Hexosen in Gegenwart von Aminosäure oder Ammoniak vermieden wird. Der Hexosamingehalt lag um 6—8% und war bei Erythrocyten mit MN-Eigenschaften etwas niedriger als bei M- und N-Erythrocyten. Durch die Faktoren des AB0-Systems wurde er in seiner Konzentration nicht beeinflusst (Tab. 3). Nach der chromatographischen Trennung der aus den Glykoproteiden (W) durch Hydrolyse freigesetzten Hexosamine konnten wir papierchromatographisch eine Verteilung von Galaktosamin: Glucosamin = 5:3 feststellen. Durch den Ninhydrin-Abbau (39) der Aminozucker zu den entsprechenden Pentosen Lyxose bzw. Arabinose wurde dieser Befund bestätigt. Die Glucuronsäure-Konzentration war bei allen Erythrocyten etwa gleich hoch, und lag zwischen 1—1,5%.

In dem Virus-Hämagglutinations-Test und bei der serologischen Bestimmung der MN-Antigene konnten die Virus-Rezeptor- und die MN-Antigen-Eigenschaften bei der Glykoprotein-Ausgangssubstanz und dem gereinigten Glykoprotein (W) nachgewiesen werden. Nach enzymatischer Hydrolyse der Neuraminsäure mit kristal-

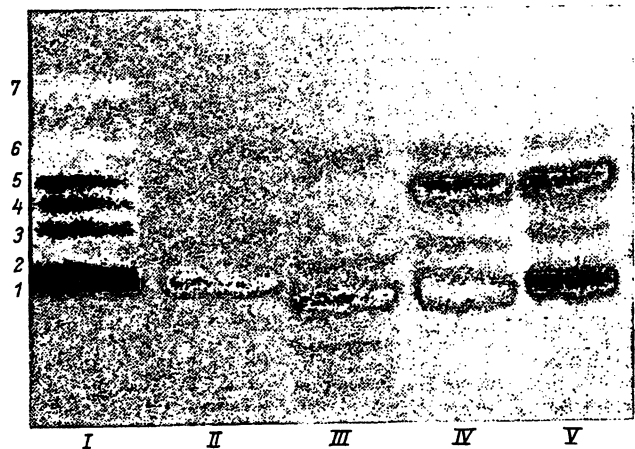


Abb. 5

Cellulose-Dünnschicht-Chromatographie des MN-Antigen-haltigen Glykoprotein (W)- und des Xylose-haltigen Glykoprotein (P)-Hydrolysates.

Laufmittel: tert. Butanol/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser = 8:6:3:3 (v/v), zweimaliges Entwickeln derselben Platte, Darstellung mit Anilinphthalat bei 100° 10 Min.

I. Standard: 1. Galaktose, 2. Glucose, 3. Mannose, 4. Arabinose, 5. Xylose, 6. Fucose, 7. Rhamnose. — II. Glykoprotein (W) Ausgangssubstanz. — III. Glykoprotein (W) nach Reinigung über Ionenaustauscher Amberlite CG 50 II. — IV. Glykoprotein (P) Ausgangssubstanz. — V. Glykoprotein (P) nach Reinigung über Ionenaustauscher Amberlite CG 50 II.

liner Neuraminidase war sowohl die Virus-Hämagglutinations-Hemmung als auch die M-Antigen-Eigenschaft aufgehoben. Mit der zweidimensionalen Chromatographie auf Cellulose-Dünnschicht-Platten, die bei der Mikro-Methode zahlreiche Paralleluntersuchungen in verschiedenen Lösungsmittel-Systemen und mit verschiedenen Nachweisverfahren erlaubte, konnten in dem Glykoprotein (W) 16 Aminosäuren identifiziert werden (Abb. 6). In der Ausgangssubstanz fanden wir Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Alanin, Threonin, Tyrosin, Valin, Isoleucin, Leucin, Prolin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Arginin und Cystein. In dem gereinigten Glykoprotein (W) war Cystein nicht mehr nachweisbar. Serin zeigte den intensivsten Ninhydrin-Fleck und konnte auch bei Verwendung von Ninhydrin-Zinnchlorid-Spray, der vergleichbare Ninhydrin-Intensitäten bei verschiedenen Aminosäuren ergibt, als die Aminosäure bestätigt werden, die in höchster Konzentration vorliegt.

driger als in dem Glykoprotein (W), bei AB- und A, B-Erythrocyten lag der Gesamthexosegehalt etwas höher, so daß die Differenzen in dem Gesamtkohlenhydratgehalt bei diesen Blutgruppen gegenüber dem Glykoprotein (W) weniger zum Ausdruck kamen. Neben Xylose war Galaktose, Mannose, Fucose deutlich und Glucose in Spuren nachweisbar. Die Zucker hatten eine Verteilung von Galaktose:Mannose:Fucose:Xylose:Glucose = 4:2:1:3:1 (Abb. 5). Das Galaktosamin:Glucosamin-Verhältnis des Glykoproteids (P) betrug bei 0-Erythrocyten 3:2. Diese Aminosäuren konnten durch den Ninhydrin-Abbau zu Lyxose bzw. Arabinose bestätigt werden. Die Neuraminsäure, deren Konzentration unabhängig von dem AB0- und MN-System bei dem Glykoprotein (P) niedriger lag als bei dem Glykoprotein (W), war ebenfalls als N-Acetyl-Neuraminsäure zu identifizieren. Sie konnte jedoch nur partiell zu 60–70% abgespalten werden. Die Aminosäure-Zusammensetzung des Glykoproteids (P) zeigte in der qualita-

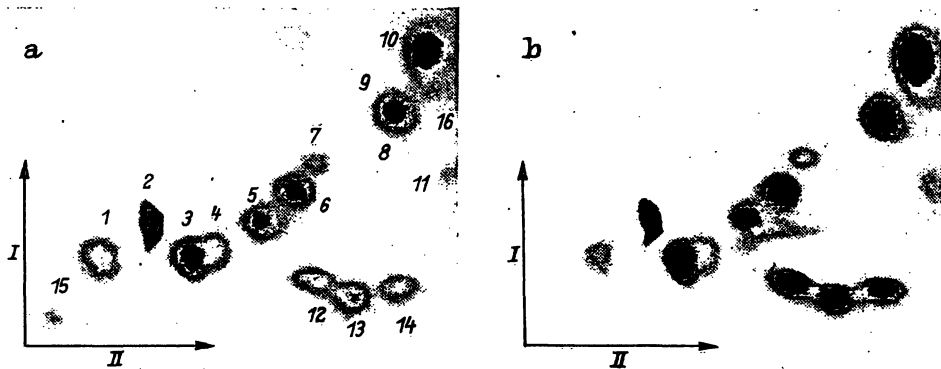


Abb. 6

Zweidimensionales Aminosäure-Chromatogramm des Glykoproteid (W)-Hydrolysates auf Cellulose-Dünnschichtplatten. a) Ausgangssubstanz, b) nach Reinigung durch Ionenaustauscherpassage, Laufmittel: 1. Dimension: nButanol/Eisessig/Wasser = 12:3:5 (v/v), 2. Dimension: Phenol/Ammoniak/Wasser = 640:3,4:144 (v/v). Darstellung mit 0,2proz. Ninhydrin in Aceton. — 1. Asparaginsäure, 2. Glutaminsäure, 3. Serin, 4. Glycin, 5. Threonin, 6. Alanin, 7. Tyrosin, 8. Valin, 9. Leucin, 10. Phenylalanin, 11. Prolin, 12. Histidin, 13. Lysin, 14. Arginin, 15. Cystein, 16. Isoleucin.

Das Xylose-haltige Glykoprotein (P) aus der Phenolphase besaß keine MN-Antigen-Eigenschaften und die Virus-Hämagglutination wurde durch das Glykoprotein (P) weniger gehemmt als durch Glykoprotein (W). Die Ausbeute an Glykoprotein (P) war um 20–25% geringer als bei Glykoprotein (W). Die Löslichkeitsverhältnisse waren gleich und die Reinigung durch Ionenaustauscher-Chromatographie entsprach der von Glykoprotein (W). Bei 0,M-Erythrocyten war der Gesamtkohlenhydratgehalt mit 26–30% etwas niedriger und der Peptidgehalt höher als bei dem Glykoprotein (W) (Tab. 3). Der wesentlichste chemische Unterschied war jedoch durch den Nachweis von Xylose gegeben, die in einer Konzentration von 3–3,5% vorlag. Diese Pentose konnte durch Cellulose-, Dünnschicht-, Papier- und gaschromatographische Untersuchungen des Tri-Methylsilyl-Derivates identifiziert werden und mit Bromanilin nach der Methode von ROE und RICE (34) kolorimetrisch bestimmt werden. Die Neuraminsäure- und Hexosamin-Konzentration lag bei 0-Erythrocyten nie-



Abb. 7

Zweidimensionales Aminosäure-Chromatogramm des Glykoproteid (P)-Hydrolysates auf Cellulose-Dünnschichtplatten. Technik, Lösungsmittel und Aminosäure-Verteilung s. Abb. 6

tiven chromatographischen Untersuchung keine sicheren Unterschiede gegenüber der Aminosäure-Zusammensetzung von Glykoprotein (W) (Abb. 7).

Immunologisch war nach Reinigung der Ausgangssubstanz keine Präzipitation mit Antihuman-Serum feststellbar. Bei einheitlichen Banden an der Cellulose-Acetat-Folie waren auch bei dem Glykoprotein (P) in der Disk-Elektrophorese zwei Banden mit Amid-schwarz darzustellen. Aufgrund der geringeren Konzentration endständiger Neuraminsäure und der geringeren enzymatisch abspaltbaren Neuraminsäure-Quote zeigte das Glykoprotein (P) eine geringere Hemmung der Virus-Hämagglutination als Glykoprotein (W).

Diskussion

Die Isolierung des MN-haltigen Glykoproteids (W) der Erythrocyten-Membran hat gezeigt, daß die Ausbeute dieses Glykoproteids sowohl von AB0-Eigenschaften als auch von der Lagerungszeit der Blutkonserven abhängig ist. Die Glykoprotein-Ausbeute war bei 0- und AB-Erythrocyten am höchsten und zeigte auch bei diesen Blutgruppen die geringste Reduktion nach langer Lagerungszeit. Diese Beobachtung ist für die Beurteilung der Funktionstüchtigkeit infundierter Erythrocyten von Bedeutung, da sie erkennen läßt, daß schon vor Ablauf der durch Chrommarkierung ermittelten Überlebenszeit der Erythrocyten blutgruppenabhängige strukturelle Veränderungen an der Membran ablaufen, die bei 0- und AB-Erythrocyten am geringsten sind. Da wir auch in Paralleluntersuchungen zu dem Neuraminsäuregehalt des Nativ-Erythrocyten fanden, daß nicht nur die isolierte Glykoproteinmenge, sondern auch der Neuraminsäuregehalt des Nativ-Erythrocyten von AB0-Eigenschaften und der Zeitdauer der Konservenlagerung abhängig ist, haben diese Befunde praktische Bedeutung. Bei Bluttransfusionen mit dem Ziel der Erythrocyten-Substitution sollte man deshalb bei Konserven mit der Blutgruppe A und B möglichst kurze Lagerungszeiten der Blutkonserven anstreben.

Entgegen anderen Autoren (23) fanden wir bei M-Erythrocyten einen höheren Neuraminsäuregehalt als bei MN- und N-Erythrocyten. Diese Werte erscheinen glaubhaft, da M-Erythrocyten auch N-Antigene enthalten, die durch partielle enzymatische Neuraminsäure-Abspaltung wie in den Untersuchungen von SPRINGER, NAGAI und STALDER (21, 22) gezeigt wurde, freigelegt werden können. Diese Autoren fanden ebenfalls bei M-Erythrocyten einen höheren Neuraminsäure-Wert (21). Die Reinigung der Glykoprotein (W)-Ausgangssubstanz durch Ionenaustauscher-Chromatographie liefert ein Untersuchungsmaterial, bei dem reproduzierbare Analysen-Daten der Neuraminsäure, Hexosen, Fucose, Hexosamin, Aminosäuren und der prozentualen Verteilung der Hexosen und Pentosen zu erhalten waren. Trotz immunologischer Homogenität fanden wir in der Disk-Elektrophorese noch die Auftrennung in zwei Banden, so daß der theoretische Homogenitätsanspruch noch nicht vollkommen erfüllt zu sein scheint. Neben

der Galaktose als Hauptkomponente der Neutralzucker fanden wir Mannose und Fucose, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde. Das Vorkommen von zwei Hexosaminen, bei denen in dem Glykoprotein (W) das Galaktosamin überwiegt, konnte chromatographisch nachgewiesen und durch den Ninhydrin-Abbau zu den korrespondierenden Pentosen bestätigt werden. Die von allen Autoren übereinstimmend als N-Acetyl-Neuraminsäure identifizierte Neuraminsäure bei Menschen-Erythrocyten, die für die MN-Antigen- und Virus-Rezeptor-Eigenschaften die entscheidende Kohlenhydratgruppe darstellt, konnte nach enzymatischer Freisetzung auch in unseren Untersuchungen chromatographisch bestätigt werden. Ihre 85% ige Abspaltung bei dem Glykoprotein (W) konnte sowohl durch die Neuraminsäure-Bestimmung nach erfolgter Freisetzung der Neuraminsäure durch Neuraminidase mit der Warren-Methode als auch durch die Bestimmung der gebundenen Neuraminsäure nach SVENNERHOLM in dem enzymatisch vorbehandelten Glykoprotein gesichert werden. Die von SPRINGER und STALDER (22), KLENK und UHLENBRUCK (4, 7, 22, 23), WINZLER und KATHAN (10) mitgeteilte Beeinflussung der MN- und Virus-Rezeptor-Eigenschaften durch enzymatische Neuraminsäure-Abspaltung fanden wir ebenfalls in unseren Untersuchungen. Gegenüber KLENK (7), UHLENBRUCK (7, 23) und BARANOWSKI und Mitarbeitern (20) konnten wir anstelle von 14 Aminosäuren entsprechend den Befunden von KATHAN und WINZLER (10) 16 Aminosäuren nachweisen, von denen Serin am stärksten vertreten war. Der wichtigste Befund dieser Untersuchungsergebnisse ist jedoch die Isolierung eines Xylose-haltigen Glykoproteids aus dem Erythrocyten-Stroma. Dieses erstmalig beschriebene Glykoprotein unterscheidet sich chemisch, serologisch und in dem Virus-Hämagglutinations-Test von dem Glykoprotein (W) mit MN-Antigen-Eigenschaften. Da es aus der Phenolphase mit der Stroma-Präparation nach WESTPHAL (25) und UHLENBRUCK (15) isoliert wurde, in der auch die AB- Eigenschaften lokalisiert sind, in der jedoch keine MN-Antigen-haltigen Glykoproteide vorkommen, ist es auch in seiner Erythrocyten-Membran-Lokalisation von dem Glykoprotein (W) zu unterscheiden. Das Glykoprotein (P) konnte erst nach Extraktion der Lipide und Glykolipide freigesetzt werden. Da der Extraktionsrückstand, aus dem wir diese Substanz isolierten, bis jetzt noch nicht aufgearbeitet wurde, erscheint es nicht erstaunlich, daß das Glykoprotein (P) noch nicht beschrieben worden war. Bei einem Xylose-Gehalt von 3,0—3,5% und dem gleichzeitigen Vorliegen von Galaktose, Mannose, Fucose, Galaktosamin, Glucosamin und einer nur partiell abspaltbaren Neuraminsäure ist es schon aufgrund seiner chemischen Eigenschaften eine untersuchenswerte Substanz. Da eine Xylose-Konzentration in der Höhe von 3—3,5% bei Glykoproteiden des menschlichen Organismus bis jetzt noch nicht beschrieben wurde, ist eine bei alkalischer Hydrolyse labile Kohlenhydrat-Peptid-Bindung über Xylose-Serin zu diskutieren. Die Xylose-Serin-Verbindung, die bei den Mucopolysacchariden Heparin und

Chondroitinsulfat von LINDAHL und RODÈN (40, 41) bewiesen wurde, könnte auch für das Glykoprotein (P) in Frage kommen, da einmal ein hoher Xylose-Gehalt gefunden wurde und Serin die Aminosäure war, die die höchste Konzentration aufwies. Da das Glykoprotein (P) eine niedrigere Neuraminsäure-Konzentration besitzt als das Glykoprotein (W), keine MN-Antigen-Eigenschaften hat, nur geringe Virus-Rezeptor-Fähigkeiten besitzt und die Neuraminsäure nur partiell enzymatisch abspaltbar ist, unterscheidet es sich chemisch

und funktionell von dem bis jetzt beschriebenen MN-Antigen-haltigen Glykoprotein (W).

Herrn Dr. D. ROELCKE, Serologisches Institut der Universität Heidelberg, danke ich für die Durchführung der serologischen Untersuchungen und Herrn Dr. A. KLUGE, Serologisches Institut der Universität Heidelberg, für die großzügige Zurverfügungstellung der notwendigen Blutkonserven. Fräulein G. JENSSEN, Medizinische Universitäts-Poliklinik Heidelberg, danke ich für ihre wertvolle Mithilfe bei allen biochemischen Untersuchungen.

Literatur

1. HOWE, C., J. Immunol., Baltimore 66, 9 (1951). — 2. HOHORST, H.-J., Zschr. Hyg. Berlin 139, 561 (1954). — 3. LISOWSKA, E., Archwim. Immun. Terap. dóswiad. 8, 235 (1960). — 4. KLENK, E. und H. LEMPFERID, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 278 (1957). — 5. KLENK, E., H. FAILLARD und H. LEMPFERID, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 235 (1955). — 6. MORGAN, W. T. J., Naturwissenschaften 46, 183 (1959). — 7. KLENK, E. und G. UHLENBRUCK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 151 (1960). — 8. UHLENBRUCK, G., Zschr. Immunit.forsch., Jena, 121, 420 (1961). — 9. EYLAR, E. W., M. A. MADOFF, O. V. BRODY und J. L. ONCLEY, J. biol. Chemistry 237, 1992 (1962). — 10. KATHAN, R. H. und R. J. WINZLER, J. biol. Chemistry 238, 21 (1963). — 11. KATHAN, R. H., R. J. WINZLER und C. A. JOHNSON, J. Exper. Med., New York 113, 37 (1960). — 12. UHLENBRUCK, G., Vox Sang. 9, 377 (1964). — 13. COOK, G. M. W. und E. H. EYLAR, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 101, 57 (1963). — 14. GRAMLICH, F., Die Rezeptorfunktion der Erythrocyten. S. 3, S. Karger Basel-New York (1966). — 15. UHLENBRUCK, G. und D. O. SCHMID, Zschr. Immunit.forsch., Jena 123, 466 (1962). — 16. KABAT, E. A., Blood group substances. Academic Press Inc., New York (1956). — 17. MÄKELÄ, O. und K. CANTELL, Ann. med. exper. biol. Fenniae, 36, 366 (1958). — 18. SPRINGER, G. F. und N. J. ANSELL HAHN, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 44, 182 (1958). — 19. ROMANOWSKA, E., Archwim. Immun. Terap. dóswiad. 7, 759 (1959). — 20. BARANOWSKI, T., E. LISOWSKA, A. MORAWIECKI, E. ROMANOWSKA und K. STROZECKA, Archwim. Immun. Terap. dóswiad. 7, 15 (1959). — 21. NAGAI, Y. und G. F. SPRINGER, Federation Proc. 21, 67 (1962). — 22. STALDER, K. und G. F. SPRINGER, Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Haematol. Wien 1961, Karger, Basel-New York (1962). — 23. PROKOP, O. und G. UHLENBRUCK, Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen, Edition Leipzig (1963). — 24. BISHOP, CH. und D. M. SURGENOR, The red blood cell. Acad. Press New York-London (1964). — 25. WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und F. BISTER, Z. Naturforsch. 7b, 148 (1952). — 26. YEMM, E. W. und A. J. WILLIS, Biochem. J. 57, 508 (1954). — 27. WINZLER, R. J. in D. GLICK, Methods of Biochemical Analysis, Bd. 2, S. 279, Interscience Publ. Inc., New York (1955). — 28. DISCHE, Z. und L. B. SHETTLES, J. biol. Chemistry 175, 595 (1948). — 29. SVENNERHOLM, L., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 24, 604 (1957). — 30. WARREN, L., J. biol. Chemistry 234, 1971 (1959). — 31. TISCHLER, I. und D. PETERS, Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 195, 408 (1965). — 32. KUHN, D., D. GRÄSSLIN und H. WEICKER, Klin. Wschr. 45, 1029 (1967). — 33. GREGORY, J. D., Arch. Biochem. Biophysics 89, 157 (1960). — 34. ROE, J. H. und E. W. RICE, J. biol. Chemistry 173, 507 (1948). — 35. CESSI, C. und F. PILIEGO, Biochem. J. 77, 508 (1960). — 36. VOMHOF, D. W. und T. C. TUCKER, J. Chromatogr. 17, 300 (1965). — 37. WALLENFELS, K., E. BERNT und G. LIMBERG, Angew. Chem. 23, 581 (1953). — 38. FISCHER, F. G. und H. J. NEBEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 302, 10 (1955). — 39. GARDELL, S., F. HEJJKENSKJÖLD und A. ROCH-NORLUND, Acta chem. scand. 4, 970 (1950). — 40. LINDAHL, U. und L. RODÈN, J. biol. Chemistry 240, 2821 (1965). — 41. LINDAHL, U. und L. RODÈN, J. biol. Chemistry 241, 2113 (1966).

Prof. Dr. H. Weicker
69 Heidelberg
Hospitalstr. 3