

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 367—374, September 1971

Isolierung eines kleinmolekularen Erythrocytenmembran-Proteins durch Anti D-Immunsorption¹⁾

Von H. WEICKER und J. METZ

Aus der S. J. Thannhauser-Abteilung für Stoffwechseluntersuchungen
(Vorstand: Prof. Dr. H. Weicker) der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg

(Eingegangen am 6. Januar 1971)

Nach Hämolyse gewaschener Rh-positiver Erythrocyten und anschließender erschöpfender Dialyse gegen dest. Wasser wurde das Hämolyat lyophilisiert, homogenisiert und dialysiert. Aus diesem Diffusat konnte durch Sephadex-Gelfiltration über G 10 eine konstant reproduzierbare kleinmolekulare Proteinfraction isoliert werden. Durch Immunsorption an gereinigtem Anti D, gekoppelt mit PAB-Ionenaustauschercellulose wurde eine Substanz erhalten, deren Proteincharakter durch das IR-Spektrum und den Stickstoffgehalt von 14,6%, die Biuretprobe und die Amidoschwarzanfärbung bewiesen wurde. Das Molekulargewicht lag um 10000. Ein Kohlenhydratanteil konnte nicht nachgewiesen werden. Lecithin, Cholesterin und Triglyceride lagen nicht vor. Eine geringe Konzentration von Lipidphosphor war nachweisbar. In chromatographischen und elektrophoretischen Untersuchungen ergab sich ein einheitliches Protein; nach salzsaurer Hydrolyse waren 14 verschiedene Aminosäuren dünnstichtchromatographisch nachweisbar. Aufgrund der gaschromatographischen Aminosäureanalysen und Untersuchungen mit dem Aminosäureanalyser fanden wir, daß Lysin die höchste Konzentration der basischen, Asparaginsäure der sauren und Alanin der neutralen Aminosäure hatte. Es unterschied sich aufgrund seines Molekulargewichtes und seiner Aminosäurezusammensetzung bei hohem Lysingehalt von anderen bekannten Serum- und Erythrocytenmembranproteinen. Die Antigen-Charakterisierung wurde mit dem SCHULTZ-DALE-Test durchgeführt; über die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe soll in einer zweiten Mitteilung berichtet werden.

Isolation of a low molecular weight erythrocyte membrane protein by anti D immunoabsorption

Washed Rh-positive erythrocytes were haemolysed and the haemolysate was dialysed exhaustively against distilled water, followed by lyophilisation, homogenisation and dialysis. A constantly reproducible, low molecular weight protein fraction was isolated from the final dialysate by gel filtration on Sephadex G 10. Immunoabsorption on purified anti D, coupled with chromatography on PAB-ion exchange cellulose, gave a substance, which was shown to be a protein by its IR spectrum, nitrogen content of 14.6%, biuret test and amidoblack staining. The molecular weight was about 10000. There was no evidence for the presence of carbohydrate, lecithin, cholesterol or triglycerides. A very low concentration of lipid-bound phosphorus was detected. Chromatography and electrophoresis showed an homogeneous protein. After acid hydrolysis, 14 different amino acids were detected by thin layer chromatography. Amino acids analysis by gas liquid chromatography and on the amino acid analyser showed that lysine, aspartic acid and alanine had the highest concentration of the basic, acidic and neutral amino acids, respectively. On the basis of molecular weight and an amino acid composition with a high concentration of lysine, the protein differs from other known proteins from the serum and erythrocyte membrane. The SCHULTZ-DALE test was used for the antigen characterisation; the results from this series of experiments will be reported in a second communication.

Die zahlreichen Isolierungsversuche des Rh-Antigens, die im Anschluß an die serologische Charakterisierung des Rh-Faktors durch WIENER und LANDSTEINER 1940 ohne Erfolg vorgenommen wurden, zeigen, daß dieses Problem nicht einfach zu lösen ist. Sowohl die theoretisch zu erwartende minimale Antigen-Ausbeute als auch die Tatsache, daß bei den isolierten Substanzen durch Immunisierung im Tierversuch und immunologische Präzipitationsmethoden oder durch konventionelle serologische Verfahren keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden konnten, sind für diese unbefriedigenden Resultate mit verantwortlich zu machen. In den Untersuchungen, über die hier berichtet werden soll, erhielten wir ein kleinmolekulares Erythrocytenmembran-Protein, dessen Antigenfunktion nicht zerstört worden war. Da wir mit der SCHULTZ-DALE-Technik D-Antigeneigenschaften an dem Protein, isoliert von Rh-positiven Erythrocyten, nachweisen konnten und durch Anti D-Immunsorbens eine

spezifische Isolierung vornahmen, soll die Frage, ob es sich bei diesem Protein um das Rh-Antigen D handelt, hier zur Diskussion gestellt werden. In dieser Mitteilung wird über die angewandte Isolierungstechnik und die biochemischen Eigenschaften des Membranproteins berichtet. Die Antigen-Charakterisierung mit der SCHULTZ-DALE-Reaktion soll im Hinblick auf die zahlreichen methodischen Einzelheiten dieser Versuchsreihe in einer zweiten Mitteilung abgehandelt werden.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 180 Konserven zu je 500 ml gesondert aufgearbeitet. Die Konserven wurden uns von der Blutbank des Immunologischen und Serologischen Institutes der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Konserven wurden von dem Immunologischen und Serologischen Institut nach ihren A, B, 0, MN- und Rh-Eigenschaften charakterisiert.

Aufarbeitung

Von 500 ml Spenderblut wurden die Erythrocyten durch Zentrifugation bei 7000 g von dem Plasma getrennt und mit physiolog.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

NaCl-Lösung dreimal gewaschen. Nach diesem Waschvorgang war der Überstand in der immunoelektrophoretischen Untersuchung frei von Plasmaproteinen. 200 ml gepackte, gewaschene Erythrocyten wurden in 2 l dest. Wasser pH 6,4 suspendiert und 24 Stdn. bei 4° hämolysiert. Das Hämolysat wurde in Visking-Dialysierschläuchen (\varnothing 20 mm) 3—4 Tage in dest. Wasser bei 4° dialysiert, bis der Schlauchinhalt kein freies Na^+ , K^+ oder Ca^{++} mehr enthielt. Das Hämolysat wurde gefriergetrocknet, das Lyophilisat zu einer wäbr. 20proz. Suspension homogenisiert und erneut gegen dest. Wasser dialysiert. Nach 48stgd. Dialyse mit mehrfachem Wechsel der Dialyseflüssigkeit wurde das Diffusat (I) lyophilisiert. Von dem nichtdiffusiblen Material wurde nach 24stgd. Stehen bei 4° der Überstand durch Zentrifugation bei 7000 g vom Bodensatz getrennt. Der Überstand wurde gefriergetrocknet und nochmals 24 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert. Das lyophilisierte Diffusat (II) wurde mit dem Diffusat (I) vereinigt und über Sephadex G 10 gefiltriert. Säule 100 \times 0,8 cm, Auftragsmenge 150—200 mg, Diffusat I/II, gelöst in 0,5—0,8 ml dest. Wasser. Die Fraktionen wurden mit dest. Wasser bei einer Fließgeschwindigkeit von 60 ml/Std. in Einzelportionen von 1,5 ml eluiert und mit dem Uvicord bei 280 nm registriert. Die einzelnen Fraktionen, ermittelt nach der Registrierung bei 280 nm, wurden bei 20° im Vakuumrotationsverdampfer eingengt und anschließend lyophilisiert. Aus der Fraktion I, die die stärkste UV-Absorption zeigte, wurde durch Elution von Anti-D-Immunsorbens eine elektrophoretisch homogene Proteinkomponente isoliert (Abb. 1).

Immunsorptionsverfahren

Von den auf ihre Leistungsfähigkeit untersuchten Immunsorbensverfahren hat sich die Methode mit Anti D-Kopplung auf PAB-Ionenaustauscherzellulose durch Diazotierung (1) besser bewährt als die Diazotierung von Polyaminostyrol (2) oder die Glutaraldehydbehandlung (3) von DEAE-Cellulose. Hierzu wurden 2 g PAB-Cellulose in 50 ml 2N HCl, versetzt mit 10 ml 14proz. Natriumnitrit, suspendiert. Diese Suspension wurde 1 Std. bei 0° gerührt, das Reaktionsprodukt anschließend auf einem Büchnertrichter abfiltriert und mit 2 l dest. Wasser nachgewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurde die PAB-Cellulose in 200 ml 5proz. Natriumacetat-Harnstofflösung gerührt, abfiltriert und mit 2 l dest. Wasser nachgewaschen. Nach nochmaligem Filtrieren auf einem Büchnertrichter wurde die diazotierte PAB-Cellulose mit 2 ml gereinigtem Anti D in 10 ml physiolog. NaCl-Lösung, Titer 1:256 4 Stdn. bei 0° unter leichtem Rühren gekoppelt. Nach Zentrifugation war der Überstand Anti D-frei. Der Bodensatz wurde mehrfach mit physiolog. NaCl-Lösung nachgewaschen und in 1 l β -Naphthollösung suspendiert, (β -Naphthollösung: 1 g β -Naphthol wird in 1 l 0,1N NaOH gelöst, der pH-Wert wurde mit 8,5proz. Orthophosphorsäure auf pH 8 eingestellt, und nach 24 Stdn. bei + 4° filtriert), und über Nacht unter ständigem Rühren bei + 4° aufbewahrt. Dabei wird β -Naphthol an die nicht durch Anti D besetzten Diazogruppen gekoppelt. Anschließend wurde die überschüssige β -Naphthollösung entfernt und der Bodensatz mit 1 l physiolog. NaCl-Lösung nachgewaschen. Das Anti-D-Immunsorbens wurde 2 Tage gegen dest. Wasser bei + 4° dialysiert. Das Anti D-IgG-Serum wurde uns von dem Immunologischen und Serologischen Institut zur Verfügung gestellt. Es war durch das von ROELCKE und JUNGFER (4) ausgearbeitete Verfahren einer Hydroxylapatit-Säulenchromatographie hoch konzentriert. Nach dieser Vorbereitung des Immunsorbens wurde die Anti D-tragende PAB-Cellulose mit der Fraktion I des gefiltrierten Diffusates I/II unter leichtem Rühren 1 Std. bei 37° inkubiert. Danach wurde das inkubierte Immunsorbens in ein temperierbares Chromatographierohr eingefüllt und bei 37° zunächst so lange mit dest. Wasser gewaschen, bis keine UV-absorbierenden Substanzen mehr eluiert werden konnten. Das Eluat wurde mit dem Uvicord bei 280 nm registriert und im Fraktionssammler gesammelt; nach Einengung im Rotationsverdampfer bei 20° wurde es gegen dest. Wasser pH 6,4 dialysiert und das Diffusat gefriergetrocknet. Der Säulinhalt wurde mit 50 ml dest. Wasser nachgewaschen, anschließend bei 20° mit 0,1M Glycinpuffer bei pH 2,5 eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit

betrug 30 ml/Std. bei Einzelportionen von 1,0 ml. Die Registrierung erfolgte bei 280 nm. Die proteinhaltige Fraktion wurde gefriergetrocknet und das Protein vom Glycinpuffer über Sephadex G 10 abgetrennt. Die Identifizierung der glycinfreien Proteinfraction erfolgte mit der quantitativen Ninhydrin-Reaktion in den einzelnen Reagenzgläsern des Fraktionssammlers (Tab. 1).

Tab. 1

Isolierung des Anti D-hemmenden kleinstmolekularen Proteins

Abtrennung der Erythrocyten aus 500 ml Konservenblut durch Zentrifugation bei 7000 g
Waschen der Erythrocyten mit 0,9proz. NaCl-Lösung
Hämolysat von 180 ml gepackter Erythrocyten in 2 l dest. Wasser bei pH 6,4 für 24 Stdn. bei 4°
Dialyse des Hämolysates in Visking-Dialysierschläuchen 2/22 gegen dest. Wasser pH 6,4 für 3 Tage bei 4°
Gefrier Trocknung des dialysierten Hämolysates. Ausbeute: 50—60 g
Homogenisieren des lyophilisierten Hämolysates zu 20proz. wäbr. Suspension
Dialyse des Homogenisates gegen dest. Wasser pH 6,4 für 2 Tage bei 4°
Einengen des Diffusates I im Rotationsvakuumverdampfer bei 25° und Gefrier Trocknung. Ausbeute: 150 mg
Abtrennung des Stromas im nichtdiffusiblen Material nach 24stgd. Stehen bei 4° und Gefrier Trocknung
Dialyse des Überstandes nach Homogenisieren gegen dest. Wasser pH 6,4 24 Stdn. bei 4°
Einengen des Diffusates II im Rotationsvakuumverdampfer bei 25° Gefrier Trocknung. Ausbeute: 20—30 mg
Gelfiltration des Diffusates I und II an Sephadex G 10, Säulenlänge 1000 mm, Säulenweite 8 mm, Elution mit Wasser
Immunsorption der Fraktion I nach Sephadex-Gelfiltration an gereinigtem Anti D gekoppelt mit PAB-Cellulose durch Diazotierung. Abspregung mit 0,1M Glycinpuffer bei pH 2,5 nach vorausgegangener Elution des Immunsorbens mit Wasser bei 37°. Ausbeute: 3—4 mg/ l Blut.

Homogenitätsprüfung

Refiltration des Diffusates I/II über Sephadex-G 10-Säule 30 \times 0,8 cm, Elutionsgeschwindigkeit 60 ml/Std. in Einzelportionen zu 1,5 ml. Registrierung bei 280 nm. Die Fraktionen wurden gesammelt, eingengt und lyophilisiert.

Ionenaustauscher-Chromatographie des Diffusates I/II an DEAE-Cellulose, Säule 30 \times 0,8 cm, Arbeits-Kapazität 52 mVal, stufenweise Elution mit Trispuffer nach Äquilibrierung des Ionenaustauschers mit 0,01M Trispuffer. Die Zusammensetzung des 0,2M Tris-Stammpuffers pH 8,0 ist folgende: 6,057 g Tris + 134 ml 0,2N HCl ad 1 l dest. Wasser; bei konstantem Puffer-pH wurde mit 0,001, 0,01 und 0,1M Trispuffer eluiert.

Chromatographie des Diffusates I/II auf Cellulose-Dünnschichtplatten der Firma Merck 20 \times 20 cm. Trenntechnik *eindimensional* bei 17° Raumtemperatur. Laufmittel a) Butanol: Eisessig: Wasser = 120:30:50 (v/v/v), Laufmittel b) t-Butanol: Methyläthylketon: Ameisensäure: Wasser = 3:6:3:3 (v/v/v). Im Laufmittel b erfolgte zweimalige Entwicklung der Dünnschichtplatte.

Zweidimensionale Chromatographie auf Celluloseplatten 7,5 \times 7,5 cm. I. Dimension Butanol: Eisessig: Wasser = 120:30:5 (v/v/v); II. Dimension Phenol: Wasser: Ammoniak = 90:36:0,9 (v/v/v). Die Identifizierung erfolgte mit 0,25proz. Ninhydrin in Aceton und mit Chlor-Tolidinsprühareagenz für Peptide (5). Die eindimensionale Chromatographie für Lipidsubstanzen wurde auf Kieselgel H-Platten durchgeführt. Laufmittel Chloroform: Methanol: Wasser = 65:25:4 (v/v/v). Identifizierung der Phosphatide erfolgte mit dem Reagenz nach ZINZADZE (6). Cholesterin, Phosphatid- und Fettsäurenachweis wurde mit Joddampf oder mit Antimon-(V)-Chlorid-gesättigter Chloroformlösung vorgenommen.

Elektrophorese-Technik

a) Fingerprint auf Kieselgel H-Dünnschichtplatten 20 \times 20 cm, I. Dimension, Hochspannungselektrophorese (Gerät Fa. Hormuth). Puffersystem 1: Pyridin: Essigsäure: Wasser = 100:10:890 (v/v/v), pH 6,5. 90 Min. bei 0°, 1 kV, 36 mA. Puffersystem 2: Essigsäure: Ameisensäure: Wasser = 50:150:850 (v/v/v), pH 1,9. 90 Min. bei 1°, 960 Volt 43 mA. II. Dimension, Chromatographie: Lauf-

mittel Butanol:Eisessig:Wasser 4:1:5 (v/v/v), 14 Std. bei + 5°. Nachweis mit 0,25proz. Ninhydrin in Aceton und Chlor-Tolidin-sprühreagenz.

b) Cellulose-Acetatfolien-Elektrophorese auf Membranfolien der Fa. Schleicher & Schüll, Trennung bei 250 Volt, 3—4 mA. Natrium-Veronalpuffer pH 8,6 in der Beckman Mikroelektrophorese-Kammer, Anfärbung mit Ponceau-Rot oder Amidoschwarz B.

c) Disk-Elektrophorese auf 7,5proz. Polyacrylamid, pH 8,9, Sammel- und Trenngel-Technik (Gerät der Fa. Shandon) Tris-phosphatpuffer pH 8,9 Trennung bei 150 V, 3 mA pro Gelzylinder. Anfärbung mit Amidoschwarz B in 7proz. Essigsäure. Entfärbung mit 7proz. Essigsäure (7).

Kolorimetrische Untersuchungen

Kohlenhydrate

Die Hexosen wurden nach der Orcin-Methode (8), die Pentosen nach DISCHE und SHETTLES (9), die Neuraminsäure nach SVENNERHOLM (10) und WARREN (11), die Hexosamine nach CESSI und Mitarbeitern (12) bestimmt.

Lipide

Die Phosphatide wurden nach FISKE und SUBARROW (13) ermittelt. Diese Methode wurde modifiziert durch Erhitzen der Proben nach Farbentwicklung für 7 Min. bei 100°. Die Cholesterinbestimmung wurde nach PEARSON, STERN und Mitarbeitern (14) durchgeführt.

Proteine

Der Eiweißstickstoff wurde nach KJELDAHL (15) ermittelt, die Peptid- und Aminosäure-Bestimmung wurde mit der Biuret-Methode und der quantitativen Ninhydrin-Reaktion ausgeführt. Die Ninhydrin-Reaktion wurde folgendermaßen vorgenommen: Lösung a) 21,008 g Citronensäure wurden in 20 ml 1N NaOH gelöst und auf 50 ml mit dest. Wasser aufgefüllt, pH 5,0. Hierzu wurden 0,8 g Zinn-[II]-chlorid hinzugegeben.

Lösung b) 20 g Ninhydrin wurden in 50 ml Äthylenglykolmonomethyläther gelöst. Ausführung: Lösung a und b wurden vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt. 0,1 ml Probe und 1 ml Ninhydrin-Reagenzgebrauchslösung wurden 20 Min. bei 100° erhitzt. Anschließend wurden 5 ml Propanol:Wasser in einem Mischungsverhältnis 1:1 (v/v) hinzugesetzt, die Probe 20 Min. im Dunkeln aufbewahrt und die Extinktionen bei 570 nm gemessen.

Hydrolyse und Chromatographie

Aminosäuren

1 mg Substanz wurde in 2 ml 6N HCl 24 Std. bei 100° hydrolysiert. Die qualitative Aminosäurebestimmung wurde mit der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten 7,5 × 7,5 cm (s. S. 368) durchgeführt. Die quantitative Aminosäurebestimmung wurde gaschromatographisch nach der Methode von GEHRKE und Mitarbeitern (16, 17) vorgenommen. Hierbei wurde das trockene Hydrolysat nach Zugabe von 50 µg Myristinsäure als internem Standard in 1,25 mVal HCl in Methanol bei Raumtemperatur zu den Aminosäure-Methylesterderivatisiert, danach folgte die Umesterung zu den Aminosäure-Butylestern mit 1,25 mVal HCl in n-Butanol 150 Min. bei 100°. Die Trifluoracetylierung wurde mit 0,05 ml Trifluoacetanhydrid und 0,05 ml Methylenchlorid 150 Min. bei Raumtemperatur oder 5 Min. bei 150° durchgeführt. 1—2 ml wurden in den Gaschromatographen eingespritzt. Gaschromatographische Bedingungen: Glassäulen 180 × 0,3 cm, im Gerät Varian Aerograph 1800.

Säulenfüllung A) 1,5% OV 17 auf Chromosorb G-HP 100 bis 120 mesh, Ofentemperatur: Anfangstemperatur 95°, Endtemperatur 200°, Temperaturprogramm 10 Min. Isotherm, 2°/Min. bis Endtemperatur.

Säulenfüllung B) 0,625% EGA auf Chromosorb W/AW 80 bis 120 mesh, Ofentemperatur: Anfangstemperatur 80°, Endtemperatur 200°, Temperaturprogramm 4 Min. Isotherm 2°/Min. bis Endtemperatur, 20 Min. Isotherm bei Endtemperatur.

Kohlenhydrate

5 mg Substanz wurden in 2 ml 2N Schwefelsäure 4 Std. bei 100° hydrolysiert. Nach Entfernung der Schwefelsäure als Bariumsulfat durch Zentrifugation und Ionenaustauscher-Passage über Dowex 50 X 8 (Säule 10 × 0,8 cm in H⁺-Form) wurde die Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten wie oben (s. S. 368) vorgenommen. Die Identifizierung der Neutralzucker erfolgte mit Anilinphthalat-Sprühreagenz nach Erhitzen auf 100° für 5 Min. (18). Die quantitative Bestimmung der Neutralzucker und Hexosamine erfolgte nach der Methode von YANG und HAKOMORI (19): 1 mg Substanz wurde 16 Std. in 0,5 ml 0,5N Schwefelsäure in 90proz. Essigsäure hydrolysiert. Anschließend wurde 0,5 ml dest. Wasser zugegeben und erneut für 6 Std. bei 80° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde über 40 mg Dowex 1 X 8 in Acetatform passiert und der Ionenaustauscher mit 10 ml Methanol nachgewaschen. Einengung des Eluates unter Stickstoff und Extraktion des Rückstandes in 2 ml Wasser:Chloroform = 1:1 (v/v). Die Reduktion erfolgte in 8M wäfr. Natriumborhydridlösung, die Reaktionszeit betrug 2 Std. Danach wurde mit Essigsäure neutralisiert, und mit 3 ml Methanol:Eisessig = 200:1 (v/v) dreimal unter Stickstoff abgedampft und das Borat als Borsäure-Trimethylester vertrieben. Anschließend wurde das Präparat über Phosphorpentoxid im Exsikkator zur Trockene gebracht. 5 ml Essigsäureanhydrid wurde zugesetzt und 2 Std. bei 100° erhitzt. Nach Zugabe von 2 ml Toluol wurde unter Stickstoff mehrfach abgedampft, bis das Essigsäureanhydrid vollkommen vertrieben war. Nach Trocknung wurden 2 ml Chloroform:Wasser = 1:1 (v/v) zugesetzt, die Wasserphase wurde verworfen, die Chloroformphase auf 0,01 ml eingengt und ein Aliquot von 0,001 bis 0,002 ml zur Gaschromatographie verwandt. Die Chromatographie wurde auf einer 3proz. ECNSS-M-Säule 150 × 0,3 cm vorgenommen. Säulenfüllung: Gaschrom Q 100—120 mesh, Temperaturprogramm: Ofentemperatur 180° Isotherm 15 Min., danach 2°/Min. bis 210° Endtemperatur. Mit dieser Technik konnten Pentosen, Hexosen, Glucosamin und Galaktosamin aufgetrennt werden.

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde nach der Gelfiltrationsmethode unter Verwendung von Ribonuclease und Protaminsulfat als Referenz durchgeführt. Die IR-Spektren wurden von KBr-Preßlingen mit dem Gerät von Perkin-Elmer aufgenommen.

Antigen-Charakterisierung

Die technischen Einzelheiten der Antigen-Charakterisierung sollen in einer zweiten Mitteilung ausführlich dargestellt werden.

Ergebnisse

Die Isolierung kleinmolekularer Proteine aus der Erythrocytenmembran wurde durch Hämolyse in dest. Wasser bei pH 6,4, Gefriertrocknung, Homogenisierung und Dialyse unter Vermeidung aggressiver Stromaufspaltung vorgenommen und ergab bei 100 Vergleichsuntersuchungen gut reproduzierbare Werte (Tab. 1). Durch diese schonende Aufarbeitung wurde die Antigenfunktion des Proteins nicht zerstört. Die Gesamtausbeute des Diffusates I/II, gewonnen aus dem gefriergetrockneten und homogenisierten Hämolysat betrug 130—200 mg/200 ml gepackte Erythrocyten. Durch Dialyse des nativen Hämolysates, die vor der Gefriertrocknung durchgeführt worden war, konnten Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Aminosäuren und andere kleinmolekulare organische Substanzen der Erythrocytenmembran eliminiert werden (Abb. 1a). Durch Gelfiltration an Sephadex G 10 wurde das Diffusat I/II in mehrere Fraktionen aufgetrennt, von denen die erste aus kleinmolekularen Proteinen bestand (Abb. 2a). Wurde die Gelfiltration des Diffusates

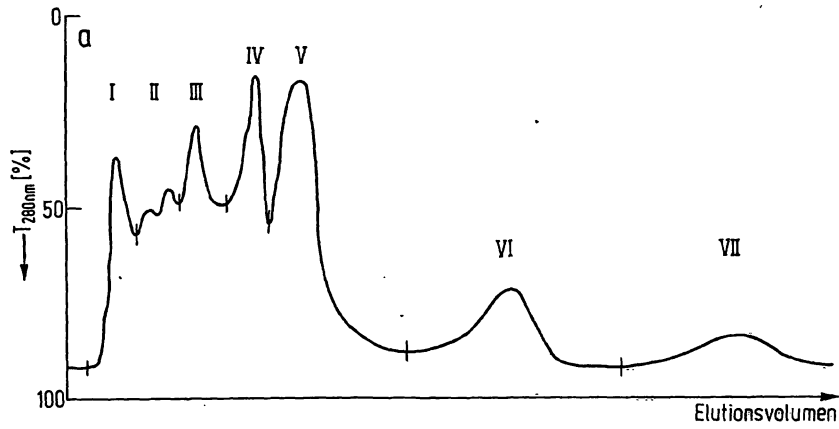
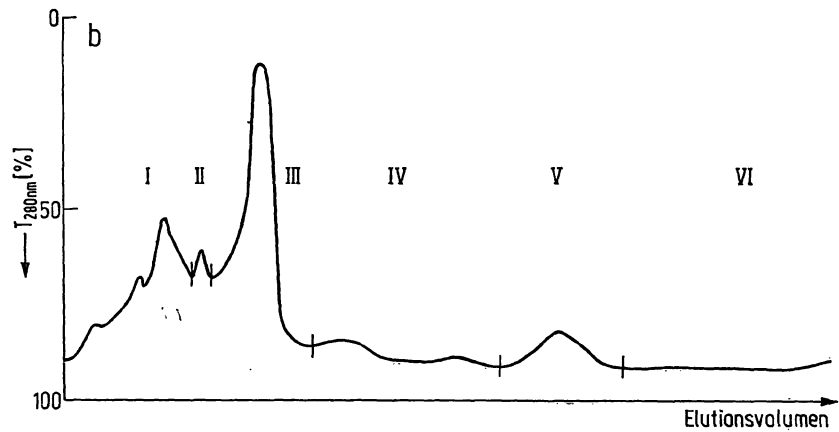


Abb. 1a und b

Gelfiltration über Sephadex-G 10-Säule 100 x 0,8 cm, Auftragsmenge 150 mg, gelöst in 0,5 ml dest. Wasser. Elution mit dest. Wasser 60 ml/Std. Registrierung Uvicord, $\lambda = 280 \text{ nm}$

a) Diffusat I/II des lyophilisierten und homogenisierten Hämolsates von Rh-positiven Erythrocyten vor Dialyse des nativen Hämolsates. Konserve 151, Blutgruppe 0 Rh +



b) Diffusat I/II des Hämolsates von Rh-positiven Erythrocyten, ohne Gefriertrocknung und Homogenisieren des dialysierten nativen Hämolsates. Konserve 142, Blutgruppe A Rh + MN

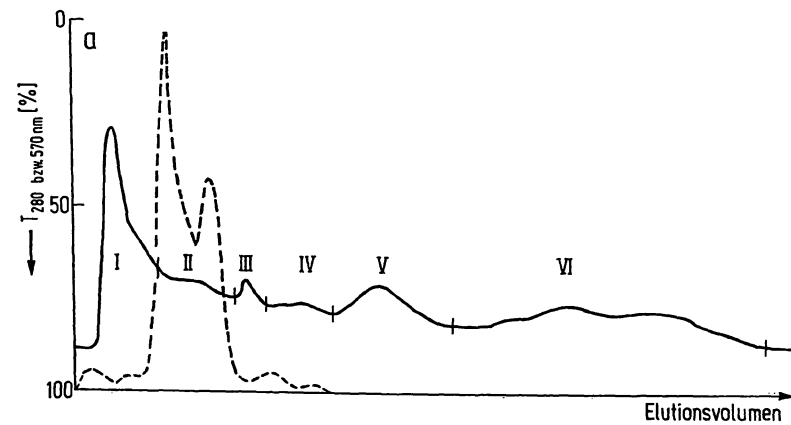
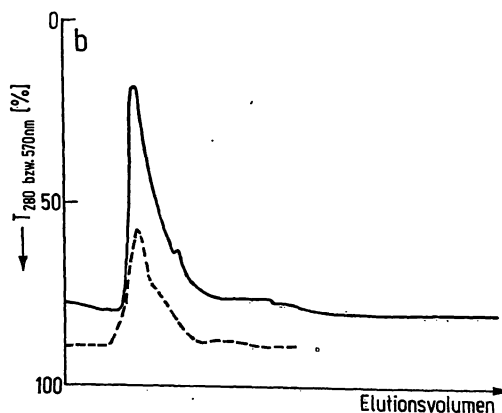


Abb. 2

Gelfiltration über Sephadex-G 10-Säule 100 x 0,8 cm, Auftragsmenge 150 mg, gelöst in 0,5 ml dest. Wasser. Elution mit dest. Wasser 60 ml/Std. Registrierung Uvicord, $\lambda = 280 \text{ nm}$ (—) und Ninhydrin-Reagenz, $\lambda = 570 \text{ nm}$ (---)

a) Diffusat I/II des lyophilisierten und homogenisierten Hämolsates von Rh-positiven Erythrocyten nach Vordialyse des nativen Hämolsates. Konserve 163, Blutgruppe 0 Rh + (ccDEe) MN



b) Rechromatographie der Fraktion I

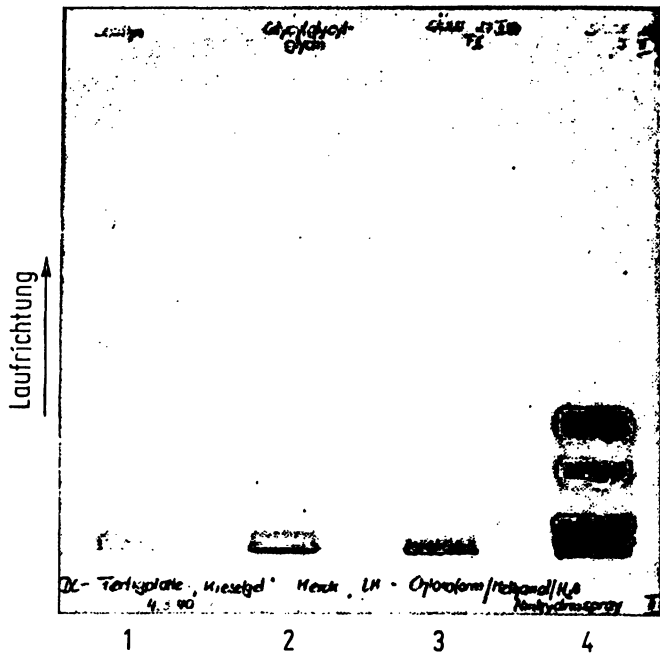


Abb. 3

Dünnschicht-Chromatographie auf Fertigplatten Merck 20 × 20 cm, Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser = 65:25:4 (v/v/v). 1. Leucithin, 2. Glycyl-Glycyl-Glycin, 3. Fraktion I, 4. Fraktion II nach Sephadex-G 10-Gelfiltration des Diffusates I/II. Identifizierung 0,25proz. Ninhydrin-Aceton-Sprühreagenz

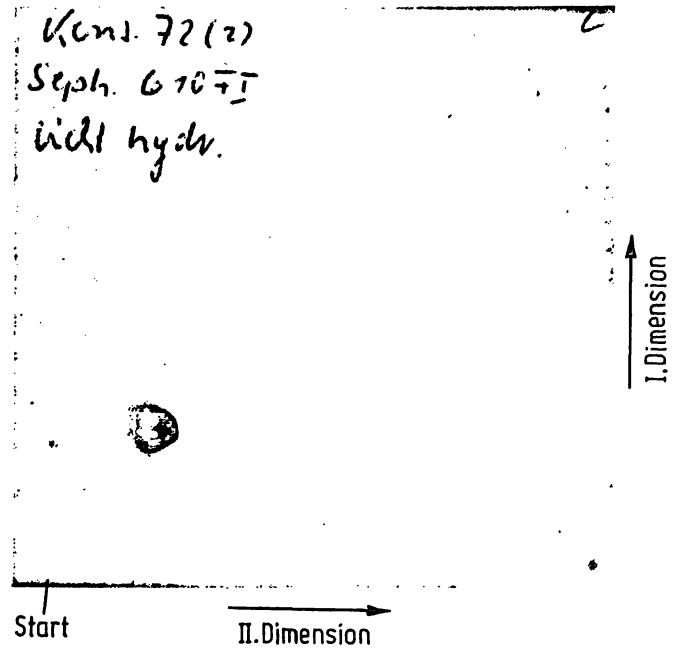


Abb. 4

Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie auf Fertigplatten 7,5 × 7,5 cm des Anti D-hemmenden Proteins. Laufmittel I. Dimension Butanol:Eisessig:Wasser = 12:3:5 (v/v/v). II. Dimension Phenol:Wasser:Ammoniak = 160:36:0,9 (v/v/v). Identifizierung mit 0,25proz. Ninhydrin-Aceton-Sprühreagenz

ohne vorausgegangene Gefriertrocknung und Homogenisierung des Hämolyrates durchgeführt, dann fehlte diese proteinhaltige Fraktion (Abb. 1b). Hieraus kann geschlossen werden, daß erst nach Entfernung der für die Membranstabilität wichtigen Mineralien und durch die nachfolgende physikalische Behandlung des Stromas diese Proteine aus dem Stromaverband freigesetzt wurden, so daß sie durch Dialyse isoliert werden konnten. Aus 200 mg diffusiblem Material erhielten wir nach Gelfiltration und Refiltration über Sephadex G 10 20–30 mg der kleinemolekularen proteinhaltigen Fraktion I (Abb. 2a, b, Tab. 1). In der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten war dieses Protein sowohl mit Ninhydrin als auch mit dem für Peptidnachweis verwendbaren Chlor-Tolidin-Sprühreagenz als eine Bande dargestellt. Die R_F -Werte dieser Bande betragen 0,05. In der zweidimensionalen Chromatographie war es in dem Laufmittel Butanol:Eisessig:Wasser und Phenol:Wasser:Ammoniak mit Ninhydrinsprühreagenz als ein Fleck zu identifizieren. Dieser Fleck zeigte ebenfalls nur eine geringe chromatographische Mobilität (Abb. 3, 4). Auf Celluloseacetat-Folien und Polyacrylamid konnten nach Sephadex-G 10-Refiltration elektrophoretisch noch 3 bzw. 6 Banden dargestellt werden. In dem Fingerprint-Verfahren zeigte diese Substanz nach hochspannungselektrophoretischer Trennung bei 1000 Volt ebenfalls noch 3 Flecke, die in der nachfolgenden dünn-schichtchromatographischen Untersuchung jedoch keine Mobilität mehr aufwiesen.

Der Proteincharakter konnte mit der quantitativen Ninhydrin-Reaktion, die gegenüber dem gewichtsgleichen Aminosäurestandard eine vielfach geringere

Intensität ergab, sowie durch die stark positive Biuret-Reaktion und Amidoschwarzfärbung wahrscheinlich gemacht werden. Das IR-Spektrum zeigte für Peptide charakteristische Banden. Der Stickstoffgehalt betrug 14,5%. Der Proteingehalt lag um 90%; Hexosen, Pentosen, Hexosamine und Neuraminsäure waren weder durch die oben erwähnten kolorimetrischen Methoden, durch die Dünnschichtchromatographie noch durch die gaschromatographischen Untersuchungen nach vorausgegangener Hydrolyse und nachfolgender Reduktion durch Natriumborhydrid und Acetylierung nachweisbar. Mit der modifizierten Lipid-Phosphor-Bestimmung nach FISKE und SUBARROW fanden wir 0,5–1% Lipidphosphor. Cholesterin oder Neutralfette waren nicht faßbar, flammenphotometrisch lagen die Na^+ , K^+ - und Ca^{++} -Werte unter 0,01%. Da die proteinhaltige Fraktion nach Gelfiltration an Sephadex G 10 elektrophoretisch noch in mehrere Banden aufgetrennt werden konnte, führten wir eine Immunadsorption mit gereinigtem Anti D, gekoppelt an PAB-Cellulose, durch. Mit dest. Wasser eluierten wir eine Substanz, die keine SCHULTZ-DALE-Reaktion zeigte. Durch Abspaltung mit 0,1M Glycinpuffer bei pH 2,5 erhielten wir das an Anti D absorbierte Protein, das wir durch Sephadex-G 10-Passage von dem Glycinpuffer abtrennten. Koppelten wir Anti D-freies IgG anstelle von IgG Anti D mit PAB-Cellulose, dann wurde bereits mit dest. Wasser das gesamte Ausgangsprodukt eluiert. Die aus rh-negativen Erythrocyten isolierten kleinemolekularen Proteine konnten mit Anti D-PAB-Cellulose nicht adsorbiert werden. Die Gesamtausbeute des durch das Immunadsorbens isolierte und mit dem Glycinpuffer wieder abgetrennte Protein betrug nach

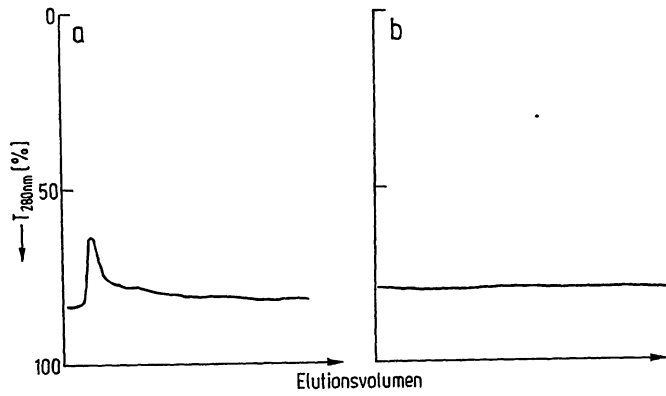


Abb. 5

Immunadsorption nach Kopplung von gereinigtem Anti D an PAB-Cellulose durch Diazotierung. Säule 30 x 1 cm. Elution mit Wasser bei 37° anschließend Elution mit 0,1M Glycinpuffer pH 2,5. Elutionsgeschwindigkeit 60 ml/Std. Registrierung: Uvicord $\lambda = 280$ nm

- a) Fraktion I des Diffusates I/II aus dem Hämolyat Rh-positiver Erythrocyten nach Sephadex-Gelfiltration über G 10. Konserve 162, Blutgruppe 0 Rh+ (CcDee) M
- b) Fraktion I des Diffusates I/II aus dem Hämolyat rh-negativer Erythrocyten. Konserve 161, Blutgruppe A rh- (ccdee)

Entsalzen an Sephadex G 10 2–3 mg, gewonnen aus 200 ml gepackter Rh-positiver Erythrocyten (Abb. 5). Dieses Protein war sowohl auf Acetatcellulose-Folie als auch in der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese und in dem Fingerprint-Verfahren einheitlich (Abb. 6, 7). Der Stickstoffgehalt betrug 14,6%. Das IR-Spektrum war für Peptide spezifisch (Abb. 8). Das Molekulargewicht des diffusiblen Proteins lag nach Gelfiltration mit Vergleichssubstanzen Protaminsulfat (MG 5–6000) und Ribonuclease (13–14000) um 10000. Nach Hydrolyse des Proteins mit 6N Salzsäure 24 Stdn. bei 110° wurden dünn-schichtchromatographisch 14 Aminosäuren nachgewiesen, unter denen die Flecken für Alanin, Asparaginsäure und Lysin am intensivsten waren (Abb. 9). Das Ergebnis dieser zweidimensionalen Aminosäurechromatographie konnte durch die quantitative Aminosäurebestimmung mit gaschromatographischer Trennung der Trifluoracetyl-Aminosäurebutylester und durch die Aminosäure-Analyser-Untersuchungen bestätigt werden. Die Aminosäure-Untersuchungen zeigten, daß Alanin die höchste

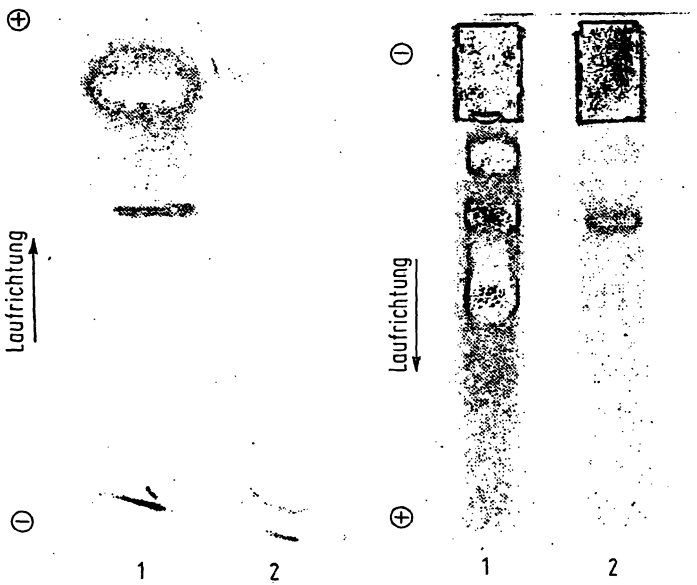


Abb. 6

Abb. 6

Abb. 7

Cellulose-Acetat-Elektrophorese. Puffersystem: Natrium-Veronal-Salzsäure pH 8,6 Laufzeit 120 Min. Stromstärke 3–5 mA.
1. Fraktion I vor Anti D-Immunadsorption, 2. Fraktion I nach Anti D-Immunadsorption

Abb. 7

Polyacrylamidelektrophorese mit 7,5proz. Trenngel. Trispuffer pH 8,2 Laufzeit 90 Min. Stromstärke 3 mA pro Gelzylinder.
1. Fraktion I vor Anti D-Immunadsorption, 2. Fraktion I nach Anti D-Immunadsorption

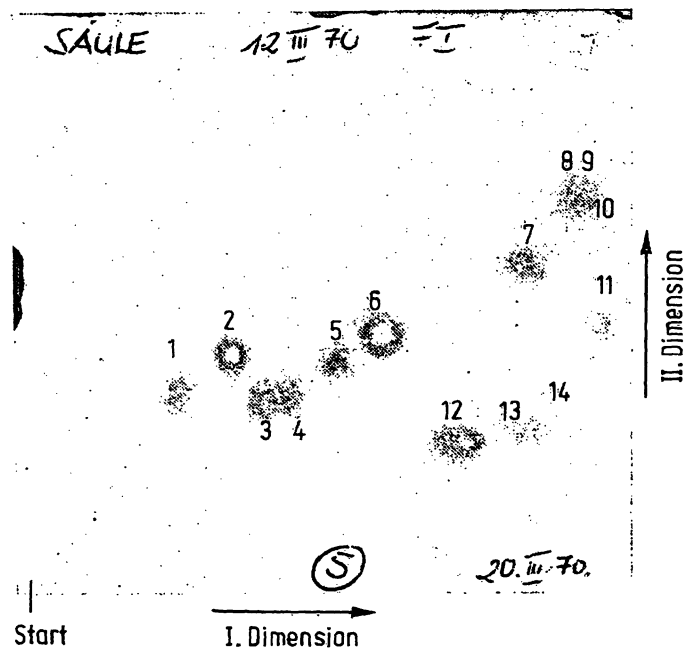
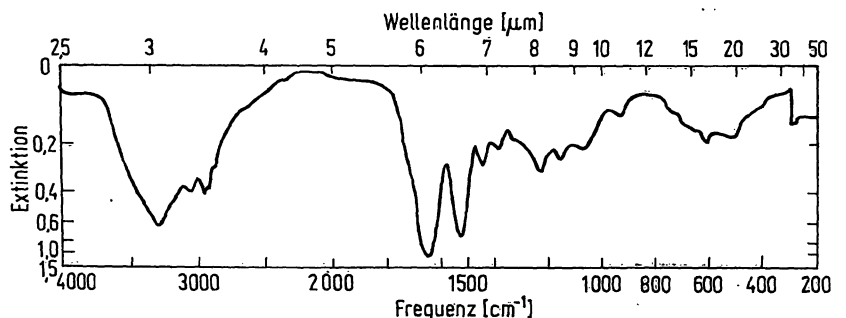


Abb. 9

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf 7,5 x 7,5 cm Platten nach Hydrolyse des Anti D-hemmenden Proteins 24 Stdn. bei 120° in 6N HCl. Laufmittel: I. Dimension Butanol: Eisessig: Wasser = 12:3:5 (v/v/v). II. Dimension Phenol: Wasser: Ammoniak = 160:36:0,9 (v/v/v)

- 1. Asp, 2. Glu, 3. Ser, 4. Gly, 5. Thr, 6. Ala, 7. Val, 8. Leu, 9. Ile, 10. Phe, 11. Pro, 12. Lys, 13. Arg, 14. His

Abb. 8
IR-Spektrum des Anti D-hemmenden Proteins, aufgenommen als KBr-Preßling mit dem Gerät von Perkin Elmer



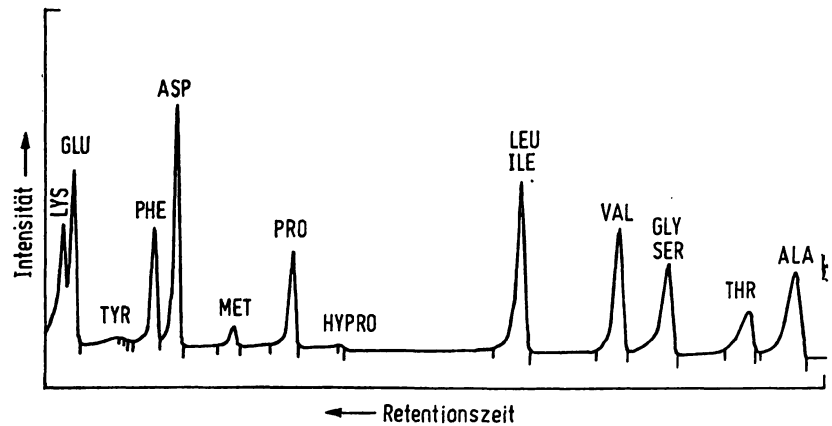


Abb. 10

Gaschromatographie der Trifluoracetyl-Aminosäure-Butylester nach Hydrolyse des Anti D-hemmenden Proteins (24 Std., 120°) in 6N HCl. Glassäule 180 x 0,3 cm, 1,5proz. OV 17 Chromosorb G-HP 100—120 mesh

Tab. 2

Aminosäureverteilung in Mol% der Fraktion I des Diffusates I/II von Rh-positiven und rh-negativen Erythrocyten

Methode Phänotyp	Gaschromatographie CcDee (Rh+)	Aminoacid-analyse ccDee (Rh+)	Gaschromatographie ccdee (rh-)	Aminoacid-analyse ccdee (rh-)
Ala	15,0	14,1	14,3	14,8
Thr	7,09	5,71	5,06	4,73
Gly	7,73	9,05	7,42	10,3
Ser	9,2	4,00	7,52	3,87
Val	9,2	9,42	8,64	9,24
Leu	11,27	8,76	11,42	8,17
Ile	—	2,00	—	0,82
Cys	—	—	—	—
Hypro	—	—	—	—
Pro	6,54	4,95	5,26	5,05
Met	—	1,05	1,31	1,46
Asp	7,34	8,95	7,08	8,49
Phe	6,44	2,47	6,2	3,02
Tyr	0,7	1,52	2,7	1,86
Glu	6,37	8,74	8,88	8,06
Lys	8,31	10,00	9,35	10,4
His	3,71*	3,71*	5,16*	5,16*
Arg	2,67*	2,67*	2,04*	2,04*

* Histidin und Arginin konnten gaschromatographisch nicht untersucht werden, da keine quantitative Derivat-Bildung stattfand.

Konzentration unter den neutralen, Asparaginsäure unter den sauren und Lysin unter den basischen Aminosäuren besitzt (Abb. 10). Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß Leucin bei den Proteinen von Rh-positiven Erythrocyten erhöht und Histidin vermindert ist gegenüber den Proteinen, erhalten von rh-negativen Erythrocyten.

Die quantitative Ausbeute der proteinhaltigen Sephadex-Fraktion differierte bei Erythrocyten verschiedener Rh-Phänotypen und entsprach den quantitativen Differenzen der D-Rezeptoren-Anzahl, die von ROCHNA und HUGHES-JONES (20) mit markiertem γ -Globulin bei den einzelnen Rh-Phänotypen ermittelt worden war (Tab. 3).

Detaillierte Darstellung der Antigen-Charakterisierung durch den SCHULTZ-DALE-Test nach aktiver und passiver Immunisierung von Meerschweinchen soll in einer zweiten Mitteilung abgehandelt werden.

Diskussion

Da seit der serologischen Charakterisierung des Rh-Systems zahlreiche chemisch unterschiedliche Bestandteile der Erythrocytenmembran als Rh-Rezeptor beschrieben worden waren, deren Antigen-Eigenschaften nicht sicher bewiesen werden konnten, erschien es uns für die Antigen-Isolierungstechnik und den Antigen-Nachweis notwendig, eine neue Versuchskonstellation zu wählen. Der Hämagglutinations-Hemmtest zum D-Antigen-Nachweis kann durch eine Reihe von Faktoren unspezifisch beeinflusst werden, so daß z. B. durch Lecithin oder durch Mineralien in hoher Konzentration — Substanzen, die bei der Erythrocytenaufarbeitung in beträchtlicher Konzentration anfallen — eine Anti D-Hemmung vorgetäuscht werden kann. In der oben geschilderten Versuchsanordnung gelang es uns, nach Hämolyse des Erythrocyten und durch erschöpfende Dialyse des nativen Hämolysates und Gelfiltration des Diffusates die aus den Erythrocyten freigesetzten Mineralien und kleinmolekularen organischen Substanzen zu entfernen. Nach Gefrier-trocknung, Homogenisieren und Eliminierung der Mineralien war die Stabilität des Stromaverbandes reduziert, so daß ein kleinmolekulares Protein durch erneute Dialyse aus dem Stroma isoliert werden konnte. Da wir bei Kühlraumtemperatur arbeiteten und nach der Dialyse dieses Proteins sofort gefriergetrocknet

Tab. 3

Ausbeute der kleinmolekularen Proteinfraction in mg pro 100 mg Diffusat I/II nach Sephadex-G 10-Gelfiltration bei verschiedenen Rh-Phänotypen im Vergleich zu der D-Rezeptorenanzahl pro Erythrocyt bei verschiedenen Rh-Phänotypen

Phänotyp	Genotyp	Anzahl der Proben n	Kleinmolekulare Protein-fraction des Hämolysates in mg/100 mg Diffusat \pm 5 %	Rezeptorenanzahl pro Erythrocyt*
CcDee	CDe/cde(R ₁ ,r)	11	6,7	9900—14600
ccDee	cDe/cde(R ₀ ,r)	5	16	12000—20000
ccDEe	cDE/cde(R ₁ ,r)	2	8,1	14000—16000
CCDee	CDE/CDe(R ₁ ,R ₁)	2	16,2	14500—19300
CcDEe	CDe/cDE(R ₁ ,R ₂)	4	23	23000—31000
ccDEE	cDE/cDE(R ₁ ,R ₂)	2	17	15800—33000

* Ermittelt von E. ROCHNA und N. C. HUGHES-JONES (20).

wurde, ist ein Spaltprodukt durch proteolytische Membran- oder Bakterienenzyme unwahrscheinlich, um so mehr, da wir bei 100 Vergleichsuntersuchungen sowohl in bezug auf die quantitative Ausbeute als auch auf die chemische Zusammensetzung gut reproduzierbare Isolierungsprodukte erhielten. Die D-Antigen-Eigenschaften dieses Proteins wurden in dem SCHULTZ-DALE-Test nach aktiver und passiver Immunisierung mit Anti D in einer großen Versuchsreihe geprüft. Obwohl dieses Protein nach Gelfiltration an Sephadex und Ionenaustauscherchromatographie einheitlich erschien, konnte es durch Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese noch in mehrere Fraktionen getrennt werden. Wir führten deshalb zur spezifischen Isolierung der für die Antigeneigenschaften verantwortlichen Protein-komponente eine Anti D-Immunsorption durch. Nach Kopplung von gereinigtem Anti D mit PAB-Cellulose durch Diazotierung konnten wir ein Protein absorbieren, das von dem Antikörper durch 0,1M Glycinpuffer bei pH 2,5 freigesetzt wurde. Dieses Protein hatte ein Molekulargewicht um 10000. Der Proteincharakter konnte bei einem Stickstoffgehalt von 14,6% durch die stark positive Biuret-Reaktion bei geringer Chromogenbildung mit Ninhydrin-Reagenz und vor allem durch das IR-Spektrum bewiesen werden. Da es bei den Untersuchungen mit Fingerprint, Diskelektrophorese und zweidimensionale Chromatographie einheitlich war, kann ein weitgehend homogenes Protein angenommen werden. Nach saurer Hydrolyse fanden wir mit der Dünnschichtchromatographie, der Gaschromatographie, der Trifluoracetyl-Aminosäurebutylester und mit dem Aminosäure-Analyser 14 Aminosäuren. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes um 10000 und des hohen Gehaltes an Lysin (etwa 10%) unterscheidet es sich von anderen bekannten Serum- und Erythrocytenmembranproteinen. Kolorimetrische und gaschromatographische Untersuchungen ergaben keinen Anhalt für einen Kohlenhydratanteil. Cholesterin oder Triglyceride waren nicht-

nachweisbar. Lecithin konnte chromatographisch ausgeschlossen werden. Die Deutung des geringen Lipidphosphorgehaltes von 0,1–0,2% ist noch Gegenstand der z. Z. laufenden Untersuchungen. Die Ausbeute des Proteins von 2–3 mg/l Blut entspricht unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 10000 der Menge, die aufgrund der Anzahl von D-Rezeptoren, ermittelt durch die Anti D-Markierung an Erythrocyten, zu erwarten war (21). Dieser Befund gewinnt an Bedeutung, da auch die unterschiedlich große Protein-ausbeute bei Erythrocyten mit verschiedenen Rh-Phänotypen mit den von ROCHNA und HUGHES-JONES (20) ermittelten Differenzen in der Rh-Rezeptorenanzahl bei den einzelnen Phänotypen eine gute Korrelation zeigte. Auch die unterschiedliche Aminosäure-relation der durch Gelfiltration isolierten Fraktion bei rh-negativen und Rh-positiven Erythrocyten könnte auf eine proteinabhängige Antigen-Spezifität hinweisen. Die Charakterisierung der D-Antigen-Eigenschaften wurde mit der SCHULTZ-DALE-Reaktion nach aktiver und passiver Immunisierung durchgeführt und soll in einer gesonderten Mitteilung dargestellt werden. Unabhängig von der hier erwähnten D-Antigenfunktion dürfte diesem kleinemolekularen Protein jedoch auch eine Bedeutung in der Struktur der Erythrocytenmembran zukommen.

Danksagung

Herrn Dr. ROELCKE, Immunologisches und Serologisches Institut der Universität Heidelberg, danken wir für die Durchführung der zahlreichen serologischen Untersuchungen und seine wertvolle Beratung. Herrn Dr. K. WALSH, Department für Biochemie, Seattle/USA, möchten wir für die Durchführung der Aminosäuren-Analysen mit dem Aminosäure-Analysator danken, Herrn Dr. W. OTTING, Max Planck-Institut Heidelberg, für die Anfertigung und Beurteilung der IR-Spektren, Herrn Dr. A. KLUGE sind wir für die großzügige Überlassung der 180 Spenderkonserven zu großem Dank verpflichtet. Fräulein G. JENSSEN und Fräulein G. SOMMER danken wir besonders für die gewissenhafte Durchführung der zahlreichen Untersuchungen.

Literatur

- BROWN, G. L. und A. K. BROWN, Symp. Soc. Exp. Biol. XII, 6, Univ. Press, Cambridge (1958). — 2. GRUBHOFER, N. und L. SCHLEITH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 108 (1954). — 3. AVRAMEAS, ST., B. TAUDOU und S. CHUILON, Immunochemistry 6, 67 (1969). — 4. ROELCKE, D. und H. JUNGFER, Klin. Wschr. 48, 752 (1970). — 5. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 6. ZINZADZE, C., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 27, 24 (1935). — 7. MAURER, H. R., Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968). — 8. WINZLER, R. J., Meth. Biochem. Analysis 2, 279 (1955). — 9. DISCHE, Z. und L. B. SHETTLES, J. biol. Chemistry 175, 595 (1948). — 10. SVENNERHOLM, L., Biochim. biophysic Acta (Amsterdam) 24, 604 (1957). — 11. WARREN, L., J. biol. Chemistry 234, 1971 (1959). — 12. CESSI, C. und F. PILIEGO, Biochem. J. 77, 508 (1960). — 13. FISKE, C. H. und Y. SUBARROW, J. biol. Chemistry 66, 375 (1925). — 14. PEARSON, S., S. STERN und T. H. MCGAVACK, Analytic. Chem. 25, 813 (1953). — 15. BRADSTREET, R. B., Analytic. Chem. 26, 185 (1954). — 16. GEHRKE C. W. und L. D. STALLING, Separation Science 2/11101 (1967). — 17. METZ, J., F. W. EBERT und H. WEICKER, im Druck. — 18. GRÄSSLIN, D. und H. WEICKER, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 21, 15 (1968). — 19. YANG, I. und S. HAKOMORI, J. biol. Chemistry, im Druck. — 20. ROCHNA, E. und N. C. HUGHES-JONES, Vox Sang. 10, 675 (1965). — 21. ROSENFELD, R. E. und S. KOCHWA, J. Immunol., Baltimore 92, 693 (1964).

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