

## Über Mucoide von Zelloberflächen\*

Von G. UHLENBRUCK

Abteilung für Immunbiologie der Medizinischen Universitätsklinik Köln-Lindenthal

### Definition

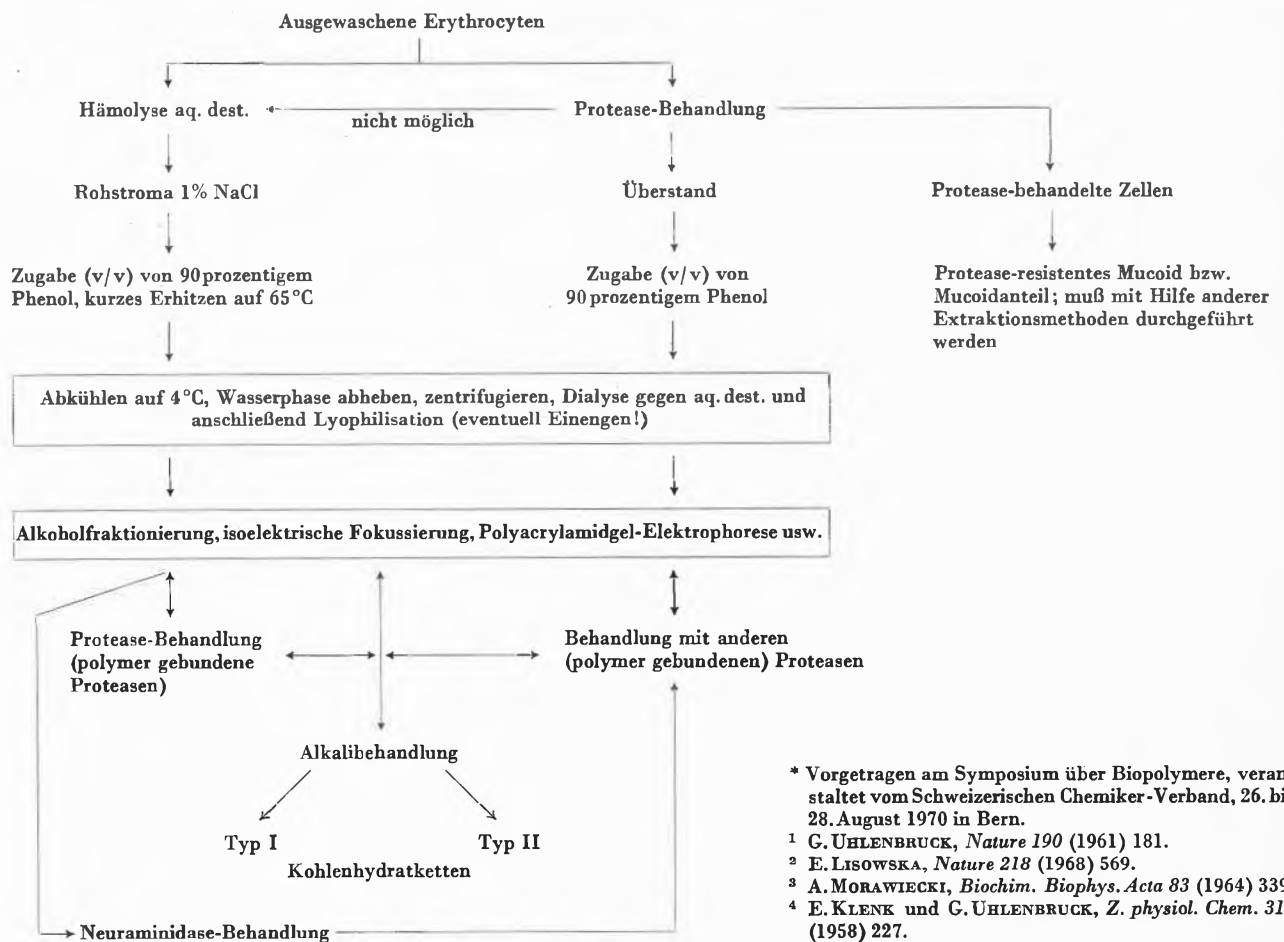
Unter Mucoiden von Zelloberflächen versteht man eine Gruppe von kohlenhydratreichen Glykoproteinen, welche auf der äußeren Oberfläche von Zellmembranen verankert sind und die zur Gruppe der neuraminsäure (NS)-haltigen Glykoproteine zählen. Sie zeichnen sich besonders dadurch aus, daß sie aus einem hydrophilen, nach außen igelförmig gerichteten kohlenhydratreichen Anteil bestehen, der größtenteils durch proteolytische Enzyme abtrennbar ist<sup>1</sup>, und einem mehr lipophilen, kohlenhydratärmeren, sogar Fettsäuren enthaltenden Anteil<sup>2</sup>, mit dem sie in die Membran eingepflanzt sind<sup>3</sup>. Letzterer ist proteaseresistent. Der Aufbau dieser Mucoide ist demnach heteropolar, wodurch sie sich von anderen, löslichen und sezernierten NS-haltigen Glykoproteinen und Mucoiden differenter Herkunft unterscheiden. Erstmals beschrieben wurden sie im Jahre 1958<sup>4</sup>.

Ihre Klassifizierung und Einordnung innerhalb der Glykoproteine kann folgendermaßen vorgenommen werden (Abb. 1):

Abb. 1. Einteilungsmöglichkeit für Glykoproteine

- 
- I. Funktionelle: Mucine, Enzyme usw.
  - II. Strukturelle: Kollagen u. a.
  - III. Membranintegrierte:
    1. Blutzellen
      - a) kernlose Erythrocyten
      - b) kernhaltige Erythrocyten
      - c) Lymphocyten, Leukocyten
      - d) Thrombocyten
    2. Organtyp
      - a) verschiedene Organzellen
      - b) Tumorzellen
    3. Membranglykoproteine subzellulärer Strukturen
      - a) Nucleus
      - b) andere subzelluläre Partikel
- 

Abb. 2. Darstellungsmethode für Erythrocytenmucoide und Mucopptide



\* Vorgetragen am Symposium über Biopolymere, veranstaltet vom Schweizerischen Chemiker-Verband, 26. bis 28. August 1970 in Bern.

<sup>1</sup> G. UHLENBRUCK, *Nature* 190 (1961) 181.

<sup>2</sup> E. LISOWSKA, *Nature* 218 (1968) 569.

<sup>3</sup> A. MORAWIECKI, *Biochim. Biophys. Acta* 83 (1964) 339.

<sup>4</sup> E. KLENK und G. UHLENBRUCK, *Z. physiol. Chem.* 311 (1958) 227.

Abb. 3. Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils von genuinen Erythrocytenmucoiden und den durch Pronase von intakten Zellen abgelösten Mucopeptiden (in Klammern)

Erythrocytenmucoide von	Gesamtreduktionswert in %	Neuraminsäure in % (ber. Methylglykosid)	Hexosamin in %
Mensch (Thr, Ser, Glu)*	15-20 (35-40) Galaktose, Mannose, Fucose Xylose	15-20 (20-25) N-Acetyl-NS	6-12 (10-15) N-Acetyl-Galaktosamin N-Acetyl-Glucosamin
Rind (Thr, Glu, Pro)	40-50 (50-55) Galaktose, Mannose	15-20 (15-20) N-Glykolyd-NS N-Acetyl-NS	15-20 (15-20) N-Acetyl-Glucosamin N-Acetyl-Galaktosamin
Pferd (Pro, Ala, Thr)	15-20 (20-25) Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose	15-20 (15-20) N-Glykolyd-NS N-Acetyl-NS	5-6 (5-6) N-Acetyl-Galaktosamin N-Acetyl-Glucosamin
Schwein	20-25 (25-30) Galaktose, Glucose, Fucose, Mannose	5-10 (5-10) N-Glykolyd-NS N-Acetyl-NS	10-15 (10-15) N-Acetyl-Galaktosamin N-Acetyl-Glucosamin

\* = Hauptaminosäuren.

Mucoide von Zelloberflächen sind Biopolymere, d.h. aufgrund ihres heteropolaren Aufbaus aggregieren sie leicht in wäßriger Lösung. Auf diese Weise kann ihr Molekulargewicht bis zu 500 000 bis 1 Million betragen.

#### Darstellung und Charakterisierung

Als Darstellungsverfahren (Abb. 2) haben wir seinerzeit das Phenol/Wasser-Extraktionsverfahren von WESTPHAL angegeben<sup>4</sup>. Hierbei geht man vom Rohstroma aus oder aber löst die kohlenhydratreichen äußeren Mucopeptide mit Hilfe von verschiedenen Proteasen ab. Auf derart protease-behandelte Zellen läßt sich das Phenol/Kochsalz-Verfahren leider nicht mehr anwenden, da die auf der Zelloberfläche verbleibenden Glykoproteinanteile lipophil sind und in der Phenolphase verbleiben; wir sind daher zur Isolierung dieser Strukturen auf andere Darstellungsverfahren angewiesen, wie sie insbesondere auch ZÄHLER<sup>5</sup> in seiner ausgezeichneten Übersicht zu diesem Thema angegeben hat, wie beispielsweise die von BLUMENFELD<sup>6</sup>, MARCHESI<sup>7</sup> oder MADDY<sup>8</sup>, POULIK<sup>9</sup>, um nur einige zu nennen. Als Methoden der Wahl zur weiteren Charakterisierung, insbesondere zum Aufzeigen der Heterogenität, haben sich das «Isoelectric Focusing»-

sowie das Polyacrylamidgel-Elektrophoreseverfahren<sup>9</sup> erwiesen. Die Rohmucoide zeigen die in Abb. 3 zusammengestellten Analysen, wobei wiederum bemerkenswert ist, daß die durch Pronase von intakten Zellen abgelösten Anteile kohlenhydratreicher sind. Unsere Untersuchungen über die Einwirkung polymer an Träger gebundene Proteasen (Abb. 2) sind noch im Anfangsstadium, versprechen aber weitere Möglichkeiten zum Abbau und zur strukturellen Untersuchung dieser Glykoproteine.

Die in Abb. 2 angegebene Alkalibehandlung unterteilt die prosthetischen Kohlenhydratgruppen dieser Mucoide in zwei Typen ein, deren besondere Charakteristika in Abb. 4 wiedergegeben sind. Man erkennt, daß manche Rezeptoren, beispielsweise die Blutgruppenantigene M und N, dem einen, der Phytagglutininrezeptor PHA (Phaseolus-vulgaris-Agglutinin) dem anderen Typ angehören. So spricht das Fehlen von N-Acetyl-Galaktosamin für eine alkalistabile Bindung der Oligosaccharidketten an das Protein. Dies konnte vor allem von PEPPER und JAMIESON<sup>10</sup> gezeigt werden, welche mit Hilfe von zwei verschiedenen Enzymen, Trypsin und Pronase, zwei vor allem in ihrem Molekulargewicht deutlich unterschiedene Glykopeptide von Thrombocyten abspalten

Abb. 4. Bindungstypen der Kohlenhydratketten in Zelloberflächen-Glykoproteinen

Typ I alkalilabil	Typ II alkalistabil	Verhalten gegen Alkali
N-Ac-Galm Threonin, Serin O-glykosidisch Menscherythrocytenmucoide M, N	N-Ac-Glum Asparagin N-glykosidisch Rindererythrocytenmucoide PHA	Partner Kohlenhydratseite Partner Proteinseite Bindungstyp hauptsächlich Vorkommen Rezeptoren

<sup>5</sup> P. ZÄHLER, *Experientia* 25 (1969) 449.<sup>6</sup> O. O. BLUMENFELD, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30 (1968) 200.<sup>7</sup> V. T. MARCHESI und E. STEERS, *Science* 159 (1968) 203.<sup>8</sup> A. H. MADDY, *Biochim. Biophys. Acta* 117 (1966) 193.<sup>9</sup> M. D. POULIK und P. K. LAUF, *Nature* 208 (1965) 874.<sup>10</sup> D. S. PEPPER und G. A. JAMIESON, *Biochemistry*, im Druck.

Abb. 5. Chemische Zusammensetzung einiger durch Proteasen von Thrombocyten abgetrennten Mucopeptide (JAMIESON)

Mucopeptid	Enzym	NS-Gehalt %	Gal %	GNAc %	GalNAc %	Besonderheiten	MW
GP I	Trypsin	22	16	15	15*	6% Pro, 5% Thr, Ser	120 000
GP III	Pronase	18	15	33**	0	10% Mannose, PHA	5 000

\* alkalilabil, \*\* alkalistabil

konnten (Abb. 5, GP I und GP III). Insbesondere das GP III ist interessant, da es als Träger des von uns auf Thrombocyten nachgewiesenen PHA-Rezeptors in Frage kommt. Etwa die Hälfte der Kohlenhydratgruppen im GP I sind alkalilabil. Ähnliche «Makroglykopeptide» erhält man nach eigenen Versuchen auch aus kernhaltigen Erythrocyten.

#### Oberflächenmucoide und proteolytische Enzyme

Für unsere Versuche benutzen wir vier Gruppen von Proteasen, die wir auf die Zelloberfläche einwirken lassen:

- I. Tierische Proteasen (Trypsin, Chymotrypsine, Elastase 1)
- II. Pflanzliche Proteasen (Papain, Bromelin, Ficin)
- III. Pilzproteasen (*Tritirachium album* LIMBÉR)
- IV. Bakterienproteasen (Pronase, Subtilisin, Thermolysin)

Sie alle wirken in unterschiedlicher Weise, was die Menge der abgetrennten Mucopeptide anbetrifft, auf die Oberflächenglykoproteine verschiedener Zellen<sup>11</sup>. Besonders

Abb. 6. Einige wesentliche Merkmale protease-behandelter Zellen

1. Reduktion des NS-Gehaltes<sup>12</sup>.
2. Verringerung der elektrophoretischen Beweglichkeit (Ausnahmen!)<sup>12</sup>.
3. Ähnlichkeit mit bestimmten Zellen mit Oberflächenanomalien, die den Glykoproteinanteil betreffen: Blutgruppenantigene En(a-), M<sup>F</sup> des Menschen (Erythrocyten)<sup>13</sup>, Zellen bei der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) (Erythrocyten und Thrombocyten).
4. Agglutination durch «inkomplette» Antikörper (d. h. solche, die aufgrund der topographischen Tiefenlage des betreffenden Rezeptors, wegen der Dicke der äußeren Glykoproteinschicht der Zelle, wegen des hohen Zetapotentials der Zellmembran oder wegen ihrer eigenen Molekülgröße normalerweise nicht agglutinieren können) tierischer (z. B. Anti-Glykolipoid Seren) sowie pflanzlicher (*Soja hispida* u. a.) Herkunft<sup>14, 15</sup>.
5. Abschwächung bestimmter Antigene des M-, N- oder HD-Blutgruppensystems bei (menschlichen) Erythrocyten<sup>16</sup> oder auch des Thrombocytenantigensystems<sup>10</sup>.
6. Ähnliches serologisches Verhalten wie Tumorzellen, vor allem was die Topographie der Tumorzellmembran anbetrifft (beispielsweise bei den durch Tumoviren transformierten Zellen<sup>17, 18, 19</sup>).

<sup>11</sup> G. UHLENBRUCK und G. WINTZER, in *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York 1970, S. 289.

Abb. 7. Verschiedene Aspekte der Topographie von Rezeptoren auf der Zelloberfläche

#### I. Die Areal-Topographie: Verteilung verschiedener Rezeptoren in verschiedenen Arealen der Zelloberfläche.

Nachweismethoden:

- a) Der «Blocking»-Test. Die Besetzung eines Antigens mit einem Antikörper blockiert die Besetzung eines engbenachbarten Antigens mit einem Antikörper<sup>20</sup>.
- b) Mit Hilfe ferritin-markierter Antikörper, wodurch in dem elektronenmikroskopischen Bild die Verteilung der Rezeptoren sichtbar wird<sup>21</sup>.

#### II. Die Cryptantigen-Topographie: Verteilung verschiedener Rezeptoren in verschiedenen Tiefenschichten der Membran<sup>22</sup>.

##### 1. Cryptantigene 1. Ordnung.

- a) Vor Pronase-Behandlung: Nachweis durch Agglutination direkt nicht möglich, jedoch Absorption, und damit Blockierung des Antigens möglich.
- b) Nach Pronase-Behandlung: Nachweis direkt durch Agglutination.

##### 2. Cryptantigene 2. Ordnung.

- a) Vor Pronase-Behandlung: Nachweis nicht möglich.
- b) Nach Pronase-Behandlung: Nachweis serologisch jetzt möglich.

interessant dabei ist, daß die so behandelten Zellen eine gewisse, oft erstaunliche Ähnlichkeit mit Zellen aufweisen, die entweder eine erworbene oder erbliche Oberflächenanomalie haben oder aber maligne entartet sind. Die in der folgenden Zusammenstellung (Abb. 6) aufgeführten wesentlichen Punkte 1, 2, 4 und 5 gelten daher sowohl für protease-behandelte Zellen als auch für Tumorzellen und bestimmte Blutzellen (Erythrocyten, Thrombocyten) mit Oberflächenanomalien.

Die Proteasebehandlung von Zellen greift somit tief in die Oberflächenglykoproteinstruktur ein. Wichtig ist,

<sup>12</sup> G. V. F. SEAMAN und G. UHLENBRUCK, *Arch. Biochem.* 100 (1963) 493.

<sup>13</sup> S. NORDLING, R. SANGER, J. GAVIN, U. FURUHJELM, G. MYLLYLÄ und M. N. METAXAS, *Vox sang.* 17 (1969) 300.

<sup>14</sup> J. KOSCIELAK, S. HAKOMORI und R. W. JEANLOZ, *Immunochemistry* 5 (1968) 441.

<sup>15</sup> G. UHLENBRUCK und O. PROKOP, *Dtsch. Med. Wschr.* 92 (1967) 940.

<sup>16</sup> D. ROELCKE und G. UHLENBRUCK, *Z. Immunforsch.* 138 (1969) 273.

<sup>17</sup> M. M. BURGER, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62 (1969) 994.

<sup>18</sup> M. INBAR und L. SACHS, *Nature* 223 (1969) 710.

<sup>19</sup> P. HÄYRY und V. DEFENDI, *Virology* 41 (1970) 22.

<sup>20</sup> E. A. BOYSE, L. J. OLD und E. STOCKERT, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60 (1968) 886.

<sup>21</sup> T. AOKI, U. HÄMMERLING, E. DE HARVEN, E. A. BOYSE und L. J. OLD, *J. Exper. Med.* 130 (1969) 979.

<sup>22</sup> G. UHLENBRUCK, *Naturwiss. Rdsch.* 23 (1970) 361.

Abb. 8. Drei Blutzelltypen (Erythrocyten) im Hinblick auf ihre Ladung (Zetapotential)

Blutkörperchen	Änderung der elektro-phoretischen Beweglichkeit nach Pronase-Behandlung	Neuraminidase-Behandlung
Mensch	- 50%	- 80%
Rind	- 0%	- 70%
Katze	+ 30%	- 60%

Abb. 9. Der NS-Gehalt von Tumorzellen und sein Einfluß auf das Zetapotential

NS-Gehalt der Zellmembran	Zetapotential	Mögliche Interpretationen
I. Normal oder erniedrigt	erhöht	a) Mehr NS kommt an die Oberfläche b) Verschwinden kationischer Gruppen c) beides
II. Normal oder erhöht	erniedrigt	a) NS verschwindet in Crypten der Oberfläche b) Vermehrung kationischer Gruppen c) beides

daß man dabei unterscheiden muß, daß ein Teil der Glykoproteinketten – und das gilt sowohl für NS-haltige als auch für «neutrale» nicht-NS-haltige Glykoproteine der Zelloberfläche und ihrer glykoproteingebundenen Antigene (MN) – abgelöst wird, ein anderer jedoch auf der Zelloberfläche verbleibt; aber es scheint auch hier Ausnahmen zu geben<sup>10</sup>. Auf diese Weise wird auch die Topographie von Rezeptoren der Zelloberfläche entscheidend beeinflußt, wie aus der nächsten Abbildung (Abb. 7) ersichtlich ist. Man erkennt leicht, daß die hier aufgezeigten Cryptantigene 1. Ordnung durch die oben schon erwähnten «inkompletten» Antikörper erfaßt werden.

«Inkomplette» Antikörper (z. B. Rh-Antikörper) bei menschlichen Erythrocyten können agglutinierend wirken, wenn die Ladung durch Protease- oder Neuraminidasebehandlung der Zellen herabgesetzt ist<sup>23</sup>. Dies spielt aber weniger bei tierischen Blutkörperchen eine Rolle, hier ist oft entscheidend, daß wesentliche Mengen des meist stärker ausgebildeten Glykoproteinmantels abgetragen werden. Besonders auffällig ist dies beim Rind, wo durch Pronasebehandlung die Ladung nicht absinkt – trotz der Abspaltung NS-haltiger Mucopptide –, aber die Agglutination durch vorher nicht-agglutinierende («inkomplette») Antikörper ermöglicht wird. Bemerkenswert sind die Ladungsverhältnisse bei Katzenerythrocyten: Hier steigt die Ladung aufgrund der in der Tiefe gelegenen Gangliosidstrukturen nach Pronasebehandlung sogar an, weil die tiefergelegenen sauren Glykolipoidgruppen nunmehr an die Oberfläche kommen und elektrokinetisch aktiv werden, wie wir an einem Modellbild ausführlich erklärt haben<sup>11</sup>.

#### Tumorzellmembran und äußere Glykoproteinschicht

Diese drei Ladungstypen sind in der folgenden Abbildung (8) noch einmal zusammengefaßt. Neuraminidase senkt in der Regel bei Blutzellen immer das Zetapotential (z. B. auch bei Thrombocyten), aber es gibt wichtige

Ausnahmen, beispielsweise Leberzellen, bei denen zwar durch Neuraminidase NS abgetrennt wird, jedoch keine Änderung des Zetapotentials stattfindet. Wir stellen uns vor<sup>11</sup> (siehe dort auch ausführliche Literaturhinweise und Abbildungen), daß vorher elektrokinetisch inaktive NS erst dann elektrokinetisch zur Geltung kommt, wenn sie, die Leberzelle, zur Tumorzelle wird. Jetzt steigt die Ladung auf Kosten des Nach-oben-Kommens dieser vor der malignen Umwandlung tiefergelegenen NS-Gruppen an, wir haben mithin ein ähnliches Phänomen wie bei den Katzenerythrocyten nach Pronase-Behandlung<sup>11</sup>. Neuraminidase-Behandlung kann diese «Überschußladung» wieder reduzieren.

Um diese Phänomene, insbesondere bei Tumorzellen, zu deuten, muß man sich vor allem über den Begriff des Zetapotentials klarwerden und auch den Einfluß kationischer Gruppen mitberücksichtigen<sup>23</sup>. Aufgrund unserer eigenen Konzeption und der von WALLACH<sup>24</sup> sowie der Befunde anderer Autoren<sup>25</sup> möchten wir die Ladungsverhältnisse an Tumorzellmembranen, an denen die äußeren Glykoproteinstrukturen maßgeblich beteiligt sind, wie folgt (Abb. 9) interpretieren.

Neben diesen topographischen «Verwerfungen» auf der Tumorzelloberfläche, wodurch die Deletion, also das Verschwinden eines Antigens, nur vorgetäuscht werden kann, gibt es aber auch echte Deletionen und Antigen-Neuerwerbungen, die übrigens ebenfalls durch topochemische Ursachen vorgetäuscht werden können. Viele von ihnen, wie die PHA, A-like oder die MN-Rezeptoren, sind wiederum in der äußeren Glykoproteinfraktion vorhanden. Eine Zusammenstellung der uns aus der Literatur bekannten Befunde, wobei vor allem das Auftreten fucosehaltiger Glykolipoide mit Blutgruppenaktivitäten

<sup>23</sup> W. POLLACK und R. P. RECKEL, *Int. Arch. Allergy* 38 (1970) 482.

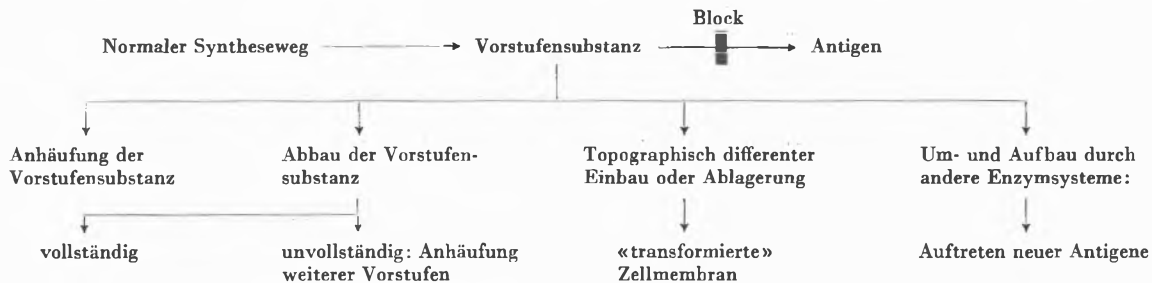
<sup>24</sup> D. F. H. WALLACH, in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 47, Verlag Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1969, S. 152.

<sup>25</sup> G. M. W. COOK und W. JACOBSON, *Biochem. J.* 107 (1969) 549.

Abb. 10. Serologische Veränderungen hinsichtlich der Blutgruppenrezeptoren von Tumorzellen

Zellen	Deletion	Neuerwerb	Vorstufen, Cryptantigene
Erythrocyten (Leukämie)	A, B, H, D, E, M, C, I	i	XIV, H
Lymphocyten (Leukämie)	A, B, H, PHA, Leukozyten-spezifische	M, N	
Carcinom (Magen-, Cervix-) (Adeno- usw.)	A, B, H	Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup> Le <sup>x</sup>	H, Forssman A-like

Abb. 11. Beziehungen zwischen Tumorantigenen und Zellmembran



Le<sup>a</sup>-, Le<sup>b</sup>- oder Le<sup>x</sup>-Spezifität beachtenswert ist<sup>26</sup>, gibt die nächste Abbildung (10). Auch Thrombocyten sind von diesen Veränderungen betroffen, wie von tschechischen Autoren<sup>27</sup>, die großen Anteil an diesen Forschungen haben, festgestellt werden konnte. Wie man sich nun derartige Veränderungen erklären kann, dafür haben wir bereits an anderer Stelle Vorstellungen entwickelt<sup>28</sup>, die wir in veränderter und erweiterter Form in Abb. 11 präsentieren.

Es ist durchaus denkbar, daß derartige Störungen normaler Synthesewege indirekt mit zur veränderten Oberflächenstruktur der Tumorzelle beitragen.

#### «Inkomplette» Antikörper und «Dicke» der äußeren Glykoproteinschicht

Wie schon ausgeführt worden ist, besteht bei vielen Zellen eine Beziehung zwischen der Dicke der äußeren Glykoproteinschicht und der Bindung von Antikörpern ohne Agglutinationsphänomen. Nach Abtragen eines Teils dieser Glykoproteinschicht durch proteolytische Enzyme ist die Agglutination – meist aus sterischen, seltener aus Ladungsursachen – möglich. Derartige Crypten der Zelloberfläche werden mithin durch die strauchartig angeordneten Glykoproteine verursacht, während am Boden dieser «Täler» meist Lipoid- oder Glykolipoidstrukturen mosaikartig angeordnet sind. Dieser Sachverhalt hat außerdem zu einer Reihe von weiteren serologischen Phänomenen geführt, die nun kurz diskutiert werden sollen. Alle diese Phänomene werden durch Behandlung der Zellen mit Proteasen naturgemäß aufgehoben.

<sup>26</sup> S. HAKOMORI und H. D. ANDREWS, *Biochim. Biophys. Acta* 202 (1970) 225.

<sup>27</sup> A. MAJSKY und J. JAKOUBKOVA, *Blut* 15 (1967) 201.

<sup>28</sup> G. UHLENBRUCK und W. GIELEN, *Fortschr. Neurol.* 38 (1970) 202.

1. Als erstes ist hier das «Mischzell-Agglutinationsphänomen» von NORDMAN *et al.*<sup>29</sup> mit dem schon erwähnten PHA-Agglutinin zu erwähnen. Das Phänomen beruht darauf, daß dieses Agglutinin «inkomplett» an Leukozyten gebunden wird, sie aber nicht agglutiniert. Zusatz von Erythrocyten bringt «gemischte» Agglutinate, weil die aus den Leukozyten noch herausragenden *combining sites* des Agglutinins mit dem mehr oberflächlich gelegenen Erythrocytenrezeptor reagieren. Ähnliche Experimente konnten wir mit anderen Zellen und verschiedenen «inkomplett» reagierenden Agglutininen machen, wobei sogar die beiden Rezeptoren, die sich beteiligen, nicht völlig identisch zu sein brauchen, wenn sie nur von dem Agglutinin erfaßt werden (kreuzreagierende Mischzellagglutination).

2. Das zweite ist die «mixed antigen agglutination»<sup>30</sup>: dem Vorgang liegt zugrunde, daß Zellen mit «inkomplett» gebundenen Antikörpern nach Zusatz einer löslichen, den betreffenden Rezeptor tragenden Verbindung zur Agglutination gebracht werden können. Auch hierbei spielen Kreuzreaktionen eine beträchtliche Rolle sowie eine ausgewogene Affinität des Agglutinins zu zellulärem und gelöstem Rezeptor, die übrigens beide auf verschiedenen Trägermolekülen sitzen können (Glykolipoid-Glykoprotein usw.).

Der Test wurde von uns und anderen Autoren<sup>31</sup> auch mit Lektinen durchgeführt (*Soja hispida* bzw. Concanavalin A) und findet in modifizierter Form auch bei Leukozyten zum Nachweis anaphylaktischer Antikörper (Typ IgE, sogenannte Reagine) Anwendung<sup>32</sup>.

<sup>29</sup> C. T. NORDMAN, A. DE LA CHAPELLE und R. GRÄSBECK, *Acta Med. Scand., Suppl.* 412 (1964) 49.

<sup>30</sup> O. PROKOP und G. UHLENBRUCK, *Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen*, VEB Thieme, Leipzig 1966.

<sup>31</sup> M. A. LEON und N. M. YOUNG, *J. Immunol.* 104 (1970) 1556.

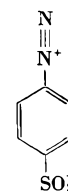
<sup>32</sup> R. AUGUSTIN, in *Handbook of Experimental Immunology* (Ed. D. M. WEIR), Blackwell Scientific, Oxford 1967, S. 1076.

3. Der «*red cell linked antigen*»-Test nach COOMBS<sup>33</sup>. Dieser Test beruht ebenfalls auf dem «Verschwinden» von Antigen-Antikörper-Komplexen in den Glykoproteinschichten der Zellmembran. Er basiert darauf, daß ein «inkomplett» gebundener Antikörper als Trägermolekül für ein Antigen dient. Dieses wird somit auf die Zellmembran gebracht und kann durch nachfolgende Addition des spezifischen Antikörpers, je nach Dicke der Glykoproteinschicht, direkt oder erst nach Zugabe von Anti-Globulin (Anti-Antikörper) bzw. Anti-Globulin-Globulin-Brücken (sogenannte Sandwich-Technik) durch Agglutination nachgewiesen werden. Der Vorteil des Anti-Globulin-Zusatzes ist der, daß man auf diese Weise gleichzeitig auch die Natur des betreffenden Antikörpers aufzeigen kann, je nachdem, ob man ein Anti-IgG, Anti-IgM oder Anti-IgA usw. zugibt. Auch Zusatz des Antigens könnte gelegentlich, wie bei dem vorhergehenden Test, zur Agglutination führen. Als Trägermolekül eignen sich auch Lektine (Phyttagglutinine) aus Pflanzen<sup>34</sup>.

In diese Gruppe gehört nicht nur die klassische Antiglobulin-Reaktion zum Nachweis «inkompletter» Antikörper, sondern auch verschiedene Variationen in Form der «*mixed antiglobulin*»-Reaktion, bei der zwei Zellen mit «inkomplett» gebundenen Antikörpern, unabhängig von der Natur des erfaßten Antigens, miteinander verbunden werden, sowie die «*mixed conglutination*», bei der das von den «inkompletten» Antikörpern gebundene Komplement durch ein Anti-Komplement (Conglutinin) erfaßt wird und – wiederum unabhängig von der Art des durch die Antikörper entdeckten Antigens – zur Brückenbildung, oft zwischen zwei verschiedenen Zellen, führt (Übersicht bei COOMBS und FRANKS<sup>35</sup>).

4. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) können sich, sehr wahrscheinlich mit Hilfe ihrer Lipoidkomponente, auf Erythrocyten auflagern, etwa 10 000 bis 100 000 Moleküle pro Zelle. Zusatz von den korrespondierenden anti-bakteriellen Antikörpern führt dann zur Agglutination<sup>36</sup>. Benutzt man jedoch Alligator-Erythrocyten zu diesem Test, so bleibt die Agglutination aus<sup>36</sup>, weil sich die betreffenden Antikörper «inkomplett» verhalten. Behandlung mit Proteasen hebt das Phänomen auf<sup>36</sup>; hierbei werden, wie wir feststellen konnten, größere Mengen NS-haltiger Mucopptide entfernt. Wahrscheinlich können sich auch bestimmte Glykolipoide in dieser Weise «inkomplett» aufladen. Die LPS eignen sich auch als Carrier für den unter 3. beschriebenen Testansatz<sup>34</sup>.

5. HOYER<sup>37</sup> fand, daß, wenn man Sulfanilsäure an Erythrocyten kuppelt, sich die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Zellen nicht ändert und dies, obgleich



bis zu 2 Millionen dieser sauren Gruppen pro Zelle aufgeladen worden waren. Dies demonstriert, daß solche Gruppen in tieferen Crypten oder Tälern der Membran gebunden werden. Die künstlichen Rezeptoren konnten durch Antikörper direkt nachgewiesen werden, befinden sich aber offenbar nicht in Nähe der dort auch gelegenen Glykolipoidstrukturen, da der Titer von Anti-B (Blutgruppenantigen B ist ein Glykolipoid) beispielsweise nicht beeinflusst wurde<sup>37</sup>.

Wir möchten dennoch annehmen, daß nach Protease-Behandlung derart beladener Zellen die elektrophoretische Beweglichkeit stark ansteigt (ähnlich derjenigen der schon erwähnten Katzenerythrocyten) und daß auch der Aggregationstiter dieser Zellen mit basischen Polymeren (Polylysin, Polybren, Protamin u. a.) weit über den Titer normaler Zellen hinausgeht<sup>38</sup>. Diese basischen Polymere erfassen oft auch tiefergelegene saure Gruppen mit (und nicht nur NS), so daß ihr Titer keineswegs immer parallel mit dem Zetapotential und seiner Änderung, insbesondere nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen proteolytischen Enzymen, einhergeht<sup>38</sup>. Die Anlagerung basischer Polymere, in der Regel nach Neuraminidase-Behandlung reduziert<sup>38</sup>, spielt eine besondere Rolle bei Tumorzellen und bei dem nun im folgenden zu besprechenden Phänomen<sup>39, 40</sup>.

6. Basische Polymere können nämlich auch, vor allem bei niedrigerem Molekulargewicht, «inkomplett» an Zellen angelagert werden, d. h. sie führen nicht zur Aggregation, oft auch nicht zur Reduktion des Zetapotentials, und lassen sich nur durch Antikörper gegen sie oder durch saure Polymere indirekt unter dem Bilde der Agglutination bzw. Aggregation (durch Heparin beispielsweise) nachweisen<sup>41</sup>.

Alle Phänomene 1 bis 6 werden durch teilweise (proteolytische) Abtrennung der äußeren Zellglykoproteine aufgehoben, man kann sie aber künstlich wieder induzieren, wenn man an Stelle des Glykoproteinmantels oder zusätzlich einen entsprechenden «coat» aus Bakterienpolysacchariden (Vi-Antigen) aufbaut<sup>42</sup>. Eine dicke äußere Glykoproteinschicht kann auf diese Weise sogar noch durch eine noch dickere Polysaccharidschicht übertroffen werden, so daß fast alle Antikörper «inkomplett» reagieren und für derartige Tests zu gebrauchen sind<sup>42</sup>.

<sup>33</sup> R. R. A. COOMBS, in *Immunological Methods*, Blackwell Scientific, Oxford 1964, S. 397.

<sup>34</sup> C. J. SANDERSON, *Immunology* 18 (1970) 353.

<sup>35</sup> R. R. A. COOMBS und D. FRANKS, *Progr. Allergy* 13 (1969) 174.

<sup>36</sup> E. NETER, E. COHEN, O. WESTPHAL und O. LÜDERITZ, *J. Immunol.* 82 (1958) 85.

<sup>37</sup> L. W. HOYER und N. C. TRABOLD, *J. Clin. Investig.* 49 (1970) 87.

<sup>38</sup> G. UHLENBRUCK, G. WINTZER und R. WERSDÖRFER, *Z. Klin. Chem.* 5 (1967) 281.

<sup>39</sup> J. N. MEHRISHI, *Europ. J. Cancer* 5 (1969) 427.

<sup>40</sup> M. M. YARNELL und E. J. AMBROSE, *Europ. J. Cancer* 5 (1969) 255.

<sup>41</sup> R. VOIGTMANN und G. UHLENBRUCK, noch unveröffentlicht.

<sup>42</sup> R. CEPPELLINI und M. LANDY, *J. Exper. Med.* 117 (1963) 321.

### Die Bedeutung glykoproteingebundener Neuraminsäure

Auf den Einfluß der NS bezüglich des Zetapotentials haben wir – auch im Hinblick auf den Nachweis «in-kompletter» Antikörper – schon hingewiesen. In diesem Zusammenhang erscheint es vielleicht angebracht, kurz eine mögliche Einteilung der NS der Zelloberfläche zusammenzustellen.

Abb. 12. Einteilungsmöglichkeiten der Zelloberflächen-NS

Serologisch aktiv (faßbar)	Serologisch inaktiv
Elektrokinetisch wirksam	Unwirksam
Enzymatisch abtrennbar (Neuraminidase)	Nicht abspaltbar (sterische Gründe)
N-Acetyl-NS (Mensch, Vögel)	N-Glykoly-NS (pK etwas saurer als N-Acetyl-NS)
Glykoproteingebunden	Glykolipoidgebunden
Protease-stabil	Protease-labil

Eine ähnliche Einteilung gilt natürlich für die NS-haltigen Rezeptoren bzw. Antigene, d.h. solche, welche durch Neuraminidase-Einwirkung in ihrer Rezeptor- oder Antigen-Eigenschaft inaktiviert werden. Diese NS-haltigen Rezeptoren könnte man allgemein auch als Klenk-Rezeptoren bezeichnen, da von KLENK und seiner Schule wesentliche Beiträge nicht nur zur Entdeckung, sondern auch zur Biologie der NS geleistet worden sind. Demgegenüber würden die Friedenreich-Rezeptoren bzw. Antigene stehen<sup>22</sup>, also alle diejenigen Strukturen, welche nach Neuraminidase-Behandlung vermehrt oder *de novo* als subterminale Bauelemente eines NS-haltigen Rezeptors auftreten. Zur ersten Gruppe gehören die MN-Blutgruppenantigene des Menschen<sup>42</sup>, die HD<sub>1</sub>/HD<sub>2</sub>-Kälteagglutininrezeptoren<sup>16</sup>, der *Limulus-polyphemus*-Rezeptor<sup>43\*</sup>, Myxovirus- und Mononucleosis-infectiosa-Rezeptoren<sup>44</sup> sowie der Rezeptor des (Nicht-

A-Agglutinins) Agglutinins aus dem Sexualapparat (Eiweißdrüse) der Gartenschnecke<sup>45</sup>.

Nach Abspaltung der NS kommen in der Regel nur zwei subterminale Strukturen direkt in endständige Position (siehe auch Abb. 13): einmal solche mit nicht-reduzierend gebundener D-Galaktose, zum anderen N-Acetyl-D-Galaktosamin-haltige, hier ist vor allem der

durch das Agglutinin der Weinbergschnecke faßbare zu nennen<sup>45</sup>. Dieses heterophile Agglutinin reagiert sowohl mit dem endständig  $\alpha$ -glykosidisch gebundenem Hexosamin, daher die ursprüngliche Bezeichnung «Anti-A», als auch mit dem  $\beta$ -Anomeren<sup>45,46</sup>. Und gerade dieses letztere ist es, welches als Bestandteil der äußeren Glykoproteinschicht für die Reaktion vieler neuraminidase-behandelter Blut- und Organzellen mit dem «Anti-A<sub>HP</sub>» (wie es auch nach *Helix pomatia* genannt wird) verantwortlich ist<sup>45,46</sup>.

Diese « $\beta$ -» oder «Anti- $\beta$ -GalNAc»-Spezifität war umstritten, weil man nur A-Erythrocyten als Testzellen für die Feststellung der Inhibitorwirkung benutzte<sup>47</sup>. Wir konnten aber eindeutig zeigen, daß die Affinität des Agglutinins zu dem  $\alpha$ -Anomeren viel stärker ist, ja so ausgeprägt, daß bei Verwendung von A-Zellen immer diese das Agglutinin an sich reißen<sup>46</sup>. Beinahe noch stär-

Abb. 13. Verschiedene Folgen von Neuraminidase-Einwirkung

Zerstörung von Rezeptoren M, N, HD <sub>1</sub> , HD <sub>2</sub> , <i>Limulus-polyphemus</i> - Myxovirus, Mononucleosis <i>Cepaea hortensis</i> (Gartenschnecke)	Pseudoinaktivierung von Rezeptoren Sterische oder Ladungswechselwirkung führt zu optimaler Konformation von Antigen  <i>Triticum-vulgaris</i> -Rezeptor (BURGER)
Rezeptoren, verstärkt oder <i>de novo</i> (Friedenreich-Antigene) a) mit terminaler D-Galaktose: <i>Vicia graminea</i> <i>Arachis hypogoea</i> <i>Ricinus-communis</i> -Rezeptor b) mit terminalem N-acetyl-D-Galaktosamin: <i>Helix-pomatia</i> -Rezeptor	«Pseudo-Friedenreich-Antigene»: Agglutination <i>de novo</i> oder verstärkt (CURRIE und Mitarbeiter), weil a) Reduktion der negativen Ladung (Abstoßung von Agglutinin reduziert) b) Entfernung von sterisch hemmenden Gruppen

\* Gemeint ist das Agglutinin aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses bzw. dessen Rezeptor.

<sup>42</sup> G. F. SPRINGER und N. J. ANSELL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958) 182.

<sup>43</sup> E. COHEN, *Transact. N. Y. Acad. Sci.* 30 (1968) 427.

<sup>44</sup> G. F. SPRINGER, *Bact. Rev.* 27 (1963) 191.

<sup>45</sup> G. UHLENBRUCK, G. I. PARDOE und O. PROKOP, in *Fortschritte der Hämatologie*, Band I, Barth, Leipzig 1970, S. 71.

<sup>46</sup> G. UHLENBRUCK und W. GIELEN, *Z. physiol. Chem.* 384 (1967) 1693.

<sup>47</sup> S. HAMMARSTRÖM und E. A. KABAT, *Biochemistry* 8 (1969) 2696.

ker ist lösliche A-Blutgruppen-Substanz (aus Pepton oder Ovarcysten). Folglich kann man die Hemmwirkung des  $\beta$ -Anomeren (Hexosamins) nicht mit Hilfe von A-Zellen, wohl hingegen aber mit neuraminidase- (RDE)-behandelten Erythrocyten, z.B. der Gruppe O, nachweisen. In diesem System hemmt natürlich auch die A-Substanz sehr gut. Außerdem kann der Test sogar dazu benutzt werden, um bei einer unbekanntem Substanz zu eruieren, ob das  $\alpha$ - oder das  $\beta$ -Anomere dieses Aminozuckers terminal vorliegt: hemmt sie mit beiden Zellarten gut, liegt das  $\alpha$ -Anomere vor, verläuft der Hemmtest dagegen mit A-Zellen sehr schlecht, so haben wir es wahrscheinlich mit dem  $\beta$ -Anomeren zu tun. Hinzu kommt, daß man das Anti-A aus der Gartenschnecke (nicht mit dem in Abb.13 angeführten Rezeptor identisch) oder aus der Pflanze *Dolichos biflorus* als zusätzliches Diagnostikum heranziehen kann. Das Ganze ist in Abb.14 noch einmal veranschaulicht.

Abb. 14. Kompetitive Hämagglutinationshemmteste mit dem Anti-A aus *Helix promatia*

Erklärung siehe Text

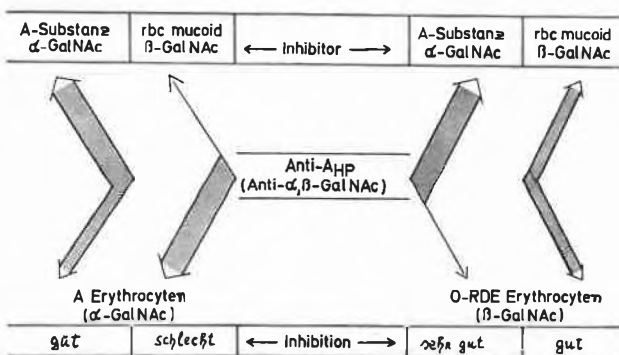
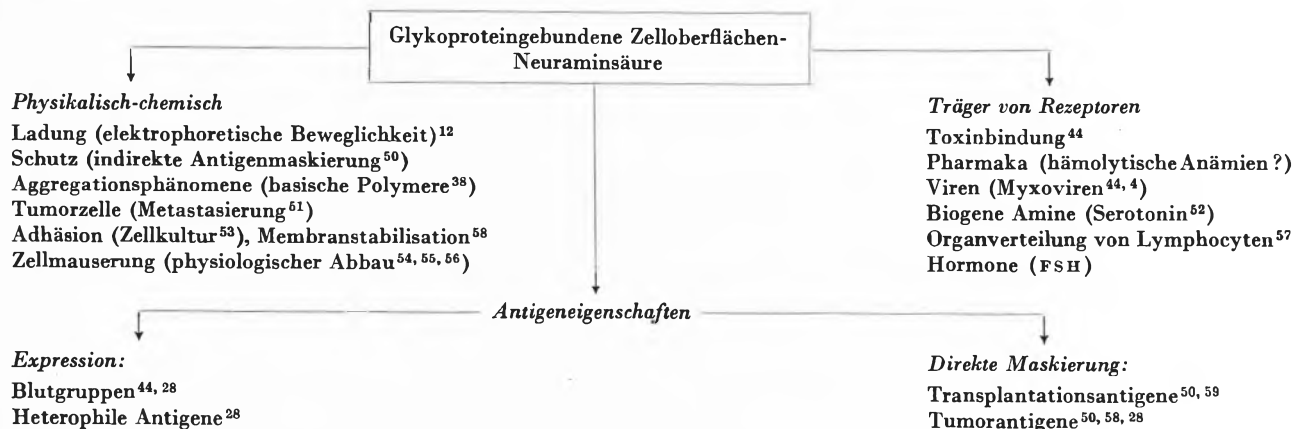


Abb. 15. Biologische Bedeutung der Zelloberflächen-Neuraminsäure



<sup>48</sup> G. UHLENBRUCK, G. I. PARDOE und G. W. G. BIRD, *Z. Immun. Forsch.* 138 (1969) 423.

<sup>49</sup> M. M. BURGER, in *Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane*, The Wistar Institute Monograph Nr. 8, Ed. L. A. MANSON, The Wistar Institute, Philadelphia (Pa.) 1968, S. 78.

<sup>50</sup> G. A. CURRIE und K. D. BAGSHAW, *Brit. J. Cancer* 22 (1968) 588, 843, 23 (1969) 141.

<sup>51</sup> G. GASIC und T. GASIC, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46 (1962) 1172, und P. STRÄULI, persönliche Mitteilung.

Friedenreich-Rezeptoren mit terminaler D-Galaktose, die praktisch immer als  $\beta$ -anomere Form vorliegt, scheint es mehrere zu geben (Abb.13). Dies liegt einmal an der vielleicht stärkeren Variationsmöglichkeit der Galaktose, was die weitere Bindung an den nächsten Zucker anbelangt, kann aber auch darin begründet liegen, daß wir diese Rezeptoren in der Hauptsache mit Antiseren (Anti-N-Acetyl-Lactosamin, Anti-Pneumokokken-Typ-XIX-Antiseren u. a.) oder Lektinen nachweisen können, die einen breiteren Bereich dieser galaktosehaltigen Rezeptorareale erfassen. Bemerkenswert ist, daß fast alle neuraminidase-behandelten Erythrocyten, gleich welcher Herkunft, mit dem Agglutinin aus der Erdnuß (*Arachis hypogaea*) reagieren<sup>48</sup>. Auch die Agglutinine aus *Ricinus communis*, *Vicia graminea* oder *Bauhinia purpurea* reagieren vermehrt oder *de novo* mit vielen derart enzymierten roten Blutkörperchen, Reaktionen, welche alle durch D-Galaktose oder manche Derivate  $\beta$ -anomer gebundener Galaktose zu inhibieren sind<sup>49</sup>.

Fehlinterpretationen der Neuraminidase-Wirkung können durch eine Pseudoinaktivierung von Rezeptoren zustande kommen, weil die NS nur indirekt, z. B. durch Beeinflussung der Konformation einer benachbarten antigenen Struktur, am Aufbau eines Rezeptors beteiligt ist, wie das für Agglutinogen des tumorcharakteristischen Lektins aus Weizensamen (*Triticum vulgare*) gezeigt werden konnte<sup>49</sup>. Entsprechend müssen wir auch mit dem Auftreten von Pseudo-Friedenreich-Antigenen rechnen, wie in Abb.13 erläutert<sup>50</sup>.

Dies leitet über zu einigen möglichen biologischen Funktionen NS-haltiger Rezeptoren bzw. der auf den Zelloberflächen glykoproteingebundenen NS, die wir im folgenden Schaubild versucht haben zueinander in Beziehung zu setzen (Abb.15).

<sup>52</sup> W. WESEMANN und F. ZILLIKEN, *Liebigs Ann. Chem.* 695 (1966) 209.

<sup>53</sup> R. B. KEMP, *J. Cell Science* 6 (1970) 751.

<sup>54</sup> Y. MARIKOVSKY und D. DANON, *J. Cell Biol.* 43 (1969) 1.

<sup>55</sup> E. SKUTELSKY und D. DANON, *J. Cell Biol.* 43 (1969) 8.

<sup>56</sup> V. BOCCI, *Experientia* 214 (1968) 626.

<sup>57</sup> J. J. WOODRUFF und B. M. GESNER, *J. Exper. Med.* 129 (1969) 551.

<sup>58</sup> P. D. WARD und E. J. AMBROSE, *J. Cell Sci.* 4 (1969) 289.

<sup>59</sup> B. H. SANFORD, *Transplantation* 5 (1967) 1273.

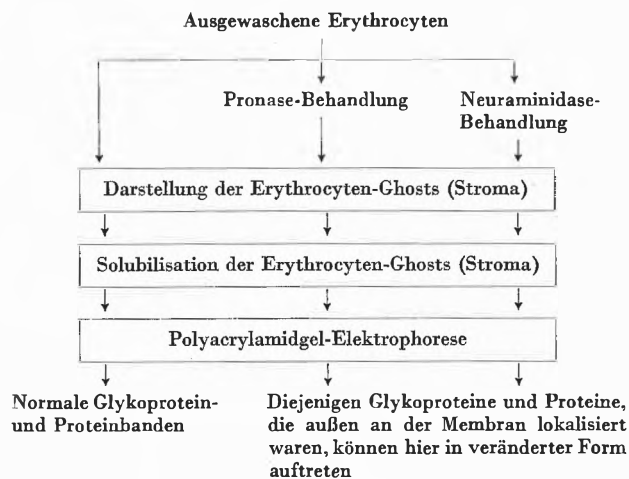


Ganz allgemein kann man demnach die Hauptfunktionen der NS in zwei Gruppen einteilen: in die Beteiligung am Aufbau biologischer Rezeptoren und in eine Bedeutung als Schutz- und Maskierungssubstanz, letztere vornehmlich auch aufgrund der negativen Ladung.

### Strukturuntersuchungen an Erythrocytenglykoproteinen

Die NS spielt natürlich auch bei den strukturellen Untersuchungen an Erythrocytenmucoiden eine außerordentliche Rolle. Dies ist schon in Abb.2 gezeigt, wo angedeutet ist, daß man methodisch sehr gut beraten ist, wenn die NS-haltigen Mucoide nach Abspaltung der NS einer proteolytischen Verdauung unterworfen werden, wonach sie nochmals fraktioniert werden können. Auch der Polymorphismus der Erythrocytenglykoproteine, so wie er sich beim isoelektrischen Fokussieren zeigt<sup>60</sup>, ist nach unseren Untersuchungen mit WINTZER im wesentlichen durch die NS bedingt. Jedoch scheint es uns wichtig zu sein, bei diesen und anderen Fraktionierungsversuchen auch genau zu determinieren, wo die entsprechende Substanz sitzt, außen an der Membran oder mehr nach innen, in der Mitte bzw. unzugänglich innerhalb der Membranschichtung. Zu diesem Zweck hat sich uns folgendes Arbeitsschema bewährt<sup>61</sup>, wobei vor allem die Stroma-Solubilisationsmethoden von MADDY<sup>62, 8</sup> angewandt wurden (Abb.16).

Abb.16. Aufarbeitungsschema für Erythrocytenstroma im Hinblick auf «äußere» Glykoprotein- und Proteinbestandteile



Der (immun-)chemische Abbau der Erythrocytenmucoiden, wozu nicht nur der Abbau durch verschiedene Proteasen (sowie ein Vergleich mit den durch die gleichen Proteasen von der Zelloberfläche abgetrennten Fraktionen!) und Glykosidasen gehören, sondern auch

<sup>60</sup> G. WINTZER und G. UHLENBRUCK, *Z. Physiol. Chem.* 351 (1970) 834.

<sup>61</sup> G. UHLENBRUCK, I. SPRENGER und M. HEGGEN, noch unveröffentlicht.

<sup>62</sup> A. H. MADDY und P. G. KELLY, *FEBS Letters* 8 (1970) 341.

Abb.17. Einige Strukturen in Erythrocytenmucoiden

Chemische Formel	Vorkommen im Erythrocytenmucoid von
$NS \xrightarrow{\frac{2-3}{\alpha}} GalmNAc \xrightarrow{\beta}$	Mensch, Pferd, Vögel (I)
$NS \xrightarrow{\frac{2-3}{\alpha}} Gal \xrightarrow{\frac{1-4}{\beta}} GNAc \longrightarrow$	Rind (II)
$Gal \xrightarrow{\frac{1-6}{\beta}} Gal$	Rind (III)
$NS \xrightarrow{\frac{2-3}{\alpha}} Gal \xrightarrow{\frac{1-3}{\beta}} GalNAc \xrightarrow{\alpha} \begin{matrix} Thr \\ Ser \end{matrix}$	Mensch (IV)
$NS \rightarrow Gal \rightarrow GNAc \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \begin{matrix} 6 \uparrow \\ 2 \downarrow \\ \alpha \end{matrix} \begin{matrix} (Man)_2 \\ \downarrow \\ NS \end{matrix}$	Mensch (V)
$Gal \rightarrow GNAc \nearrow$	↓ Asp

die schon erwähnte Alkali-Behandlung<sup>63</sup>, die milde Säurehydrolyse<sup>64</sup> (Polystyrolsulfonsäure) und die Perjodat-Behandlung<sup>65</sup> haben zu einigen partiellen Strukturaufklärungen von Oligosaccharidketten dieser Glykoproteine geführt, die in Abb.17 angegeben sind. Das Strukturbild (I) ergab sich aus Perjodatversuchen<sup>65</sup> und den schon beschriebenen Experimenten mit dem Agglutinin aus *Helix pomatia*<sup>28, 45</sup>. Die Strukturen (II) und (III) konnten wir in Rindererythrocyten auffinden<sup>66, 67</sup>, sie sind, besonders im NS-freien Zustand, für die Reaktion von Rinderblutkörperchen mit Anti-Pneumokokken-Typ-XIV-Serum (II) sowie mit dem Lektin aus *Ricinus communis* (II und III) verantwortlich. Das Tetrasaccharid (IV) wurde durch Alkalihydrolyse aus menschlichen, M-aktiven (Blutgruppe M) Mucoproteinen<sup>68</sup> sowie MN- und NN-aktiven Glykoproteinen<sup>69</sup> isoliert und chemisch charakterisiert. Wir fanden<sup>70</sup>, daß das NS-freie Disaccharid, welches auch in Gehirngangliosiden vorkommt<sup>71</sup>, mit dem Lektin aus *Bauhinia purpurea* reagiert, also offenbar eine Grundstruktur im MN-System erfaßt wird, wie das auch schon serologisch postuliert wurde<sup>72</sup>. Stabil gegenüber Alkali ist dagegen der sogenannte PHA-Rezeptor (V), dessen Struktur kürzlich aufgeklärt werden konnte<sup>73</sup> und der durch das Phaseo-

<sup>63</sup> E. LISOWSKA, *Europ. J. Biochem.* 10 (1969) 574.

<sup>64</sup> E. LISOWSKA, E. ROMANOWSKA und T. BARANOWSKI, *Arch. Imm. Ther. Exper.* 17 (1969) 300.

<sup>65</sup> E. ROMANOWSKA und T. BARANOWSKI, *Arch. Immun. Ther. Exper.* 11 (1963) 625.

<sup>66</sup> G. UHLENBRUCK, *Z. Immunforsch.* 127 (1964) 9.

<sup>67</sup> H. WIEGANDT und Mitarbeiter, persönliche Mitteilung sowie eigene unveröffentlichte Versuche.

<sup>68</sup> D. B. THOMAS und R. J. WINZLER, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 5943, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35 (1969) 811.

<sup>69</sup> A. M. ADAMANY und R. H. KATHAN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37 (1969) 171.

<sup>70</sup> W. DAHR und G. UHLENBRUCK, noch unveröffentlicht.

<sup>71</sup> E. KLENK, U. W. HENDRIKS und W. GIELEN, *Z. physiol. Chem.* 330 (1962) 140.

<sup>72</sup> E. ROMANOWSKA, *Vox sang.* 9 (1964) 578.

<sup>73</sup> R. KORNFELD und S. KORNFELD, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2536.

*lus-vulgaris*-Lektin serologisch erkannt wird. Die Bindung dieser Oligohexosidkette erfolgt über N-Acetyl-Glucosamin-Asparagin, ist also alkalistabil. Ebenso verhält sich gegenüber Alkali dasjenige Oligosaccharid, welches für die Myxovirusinhibitoreigenschaft menschlicher Erythrocytenmucoide verantwortlich ist<sup>63</sup>.

Unklar ist noch die genaue Strukturformel der M- und N-Blutgruppenantigene, denn merkwürdigerweise haben beide den gleichen NS-Gehalt<sup>74</sup>, obwohl SPRINGER<sup>75</sup> als auch wir<sup>76</sup> fanden, daß am Aufbau der N-Blutgruppensubstanz D-Galaktose eine maßgebliche Rolle spielt, denn der *Vicia-graminea*-Lektin-Rezeptor dieses Antigens wird sowohl durch Galaktose-Oxydase als auch durch  $\beta$ -Galaktosidase zerstört<sup>77, 75</sup>, während Ganglioside mit endständiger D-Galaktose  $\xrightarrow{\beta}$  GalNAc-Struktur hemmwirksam sind<sup>75</sup>. Wir konstatierten außerdem, daß der NS-Gehalt von NN- und MM- Erythrocyten gleich ist und daß beide nach Neuraminidase-Behandlung auch in gleicher Weise mit dem Agglutinin aus *Helix pomatia* reagierten<sup>76</sup>, also subterminales N-Acetyl-D-Galaktosamin keine Rolle bei diesen Antigenen zu spielen scheint.

Es ist mithin noch nicht geklärt, in welcher Beziehung die in MM- und NN-Zellmucoiden vorkommende Verbindung (IV) zur Struktur der M- bzw. N-Antigene steht; es könnte sein, daß jeweils eine NS bei M (beispielsweise die am Galaktosamin) oder N (an Galaktose) fehlt, was vielleicht im Gegensatz zu der von uns postulierten Grundsubstanz N stehen würde<sup>76</sup>, aber ein M-Antigen mit 2 NS-Molekülen (IV) widerspräche den analytischen Befunden. Wahrscheinlich ist es so, daß doch der Konformation dieser antigenen NS-Strukturen eine größere Bedeutung zukommt, wie am Einfluß benachbarter Aminogruppen eindeutig gezeigt werden konnte<sup>78</sup>. Dieser Gesichtspunkt verdient besondere Beachtung im Hinblick auf die Entstehung von Neoantigenen M und N bei maligner Transformation<sup>79</sup>, und man sollte ihn auch heranziehen, um Oberflächenladungsanomalien bei Tumorzellen zu interpretieren<sup>80, 81</sup>.

#### Probleme zukünftiger Membranglykoproteinforschung

Die aufgeführten biochemischen Resultate auf diesem Forschungsgebiet sind noch recht unvollkommen, hierhin muß sich der Schwerpunkt zukünftiger Forschung verlagern. So wissen wir noch recht wenig über die Biosynthese dieser Zellmembranglykoproteine, obwohl erste erfolgreiche Ansätze in dieser Richtung von EYLAR

und Mitarbeitern unternommen worden sind (Überichten bei EYLAR<sup>82</sup>, COOK<sup>83</sup> und SPIRO<sup>84</sup>). Auch die Beziehungen dieser Glykoproteine zu den Transplantationsantigenen (HL-A) sind Gegenstand intensiver Untersuchungen, vor allem ist bemerkenswert, daß ein Teil dieser Histokompatibilitätsantigene durch Proteasen von der Zelloberfläche entfernt werden kann, dennoch wissen wir über die Chemie dieser geradezu typischen Oberflächenantigene noch so gut wie nichts<sup>85</sup>.

Für den Virologen sind diese Glykoproteine ebenfalls nicht uninteressant. So ist bewiesen, daß das Virus beim Austritt aus der Zellmembran zelleigenes Material sich einverleibt, was man auch serologisch nachweisen kann<sup>86</sup>. Diese Befunde haben für die Immunität (z. B. Inkorporation von Blutgruppenantigenen<sup>86</sup>) und Resistenz gegenüber Viren (Isoantikörper) eine epidemiologische Bedeutung.

Bei alledem, nicht nur bei bestimmten Viruserkrankungen, spielt die NS eine nicht unerhebliche Rolle. Die Bedeutung dieser Säure für die verschiedenen biologischen Rezeptoren<sup>87</sup> und für die Ladung der Tumorzelle<sup>80, 81</sup> abzuklären, ist eine weitere Aufgabe, bei der es vor allem «spezifisch» von «unspezifisch» zu unterscheiden gilt<sup>24</sup>.

NS-haltige Mucopeptide konnten zwar von Tumorzellen isoliert werden, aber ihre Beziehung zu «normalen» Zellmucoiden ist noch unklar<sup>88, 89</sup>. An dieser Stelle wären Störungen des von EYLAR<sup>82</sup> diskutierten Multienzymsystems von Glykosyl-Transferasen zu untersuchen und auch, inwieweit ihre Spezifität im Verlaufe der neoplastischen Umwandlung verlorengelht, etwa im Sinne eines Übergreifens auf die Synthese von Glykolipiden und umgekehrt.

In diesem Zusammenhang werden weitere Untersuchungen über das MNSs Uu-Blutgruppensystem und die NS-haltigen Kälteagglutininrezeptoren vonnöten sein. Gerade im ersten System muß man sich darüber klar sein, daß trotz genetischer Assoziation auf der Erythrocytenoberfläche eine räumliche Dissoziation der einzelnen Rezeptoren vorhanden ist, daß also beispielsweise die Antigene Ss oder Uu, rein topographisch gesehen, nicht in der Nähe der MN-Rezeptoren gelegen sind und einzelne Rezeptoren (MN) unabhängig von den anderen (Ss, Uu) inaktiviert werden können. So ergeben sich reizvolle Beziehungen zwischen Chromosomen-«Mapping» und dem topographisch angeordneten Anti-

<sup>74</sup> R. H. KATHAN und A. ADAMANY, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1716.

<sup>75</sup> G. F. SPRINGER, *Naturwiss.* 57 (1970) 162.

<sup>76</sup> G. UHLENBRUCK, *Vox sang.* 16 (1969) 200.

<sup>77</sup> M. KRÜPE und G. UHLENBRUCK, *Z. Immun. Forsch.* 126 (1964) 408.

<sup>78</sup> E. LISOWSKA und A. MORAWIECKI, *Europ. J. Biochem.* 3 (1967) 237.

<sup>79</sup> J. T. KASSULKE, H. M. HALLGREN und E. J. YUNIS, *Amer. J. Pathol.* 56 (1969) 333.

<sup>80</sup> G. RUHENSTROTH-BAUER, G. F. FUHRMANN, E. GRANZER, W. KÜBLER und F. RUEFF, *Naturwiss.* 49 (1962) 363.

<sup>81</sup> J. NAAMAN, S. EISENBERG und F. DOLJANSKI, *Lab. Invest.* 14 (1965) 1396.

<sup>82</sup> E. H. EYLAR, *J. Theoret. Biol.* 10 (1965) 89 sowie *Z. Klin. Chem.*, im Druck (2nd European Symposium on Connective Tissue Research, Hannover 1970, Abstract).

<sup>83</sup> G. M. W. COOK, *Biol. Rev.* 43 (1968) 363.

<sup>84</sup> R. G. SPIRO, *New Engl. J. Med.* 281 (1969) 991, 1043.

<sup>85</sup> B. D. KAHAN und R. A. REISFELD, *Transplant. Proc.* 1 (1969) 483, *Science* 164 (1969) 514.

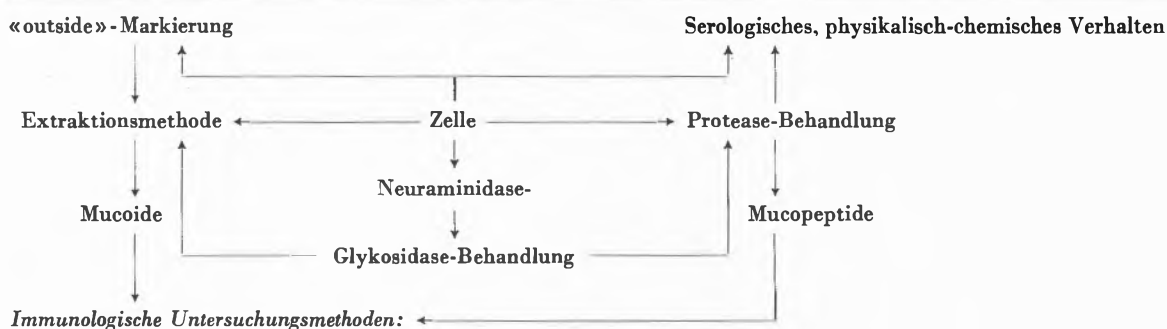
<sup>86</sup> G. F. SPRINGER, *Transfusion* 3 (1963) 233.

<sup>87</sup> W. GIELEN, *Naturwiss.* 55 (1968) 104.

<sup>88</sup> O. K. LANGLEY und E. J. AMBROSE, *Nature* 204 (1964) 53, *Biochem. J.* 102 (1967) 367.

<sup>89</sup> E. F. WALBORG, R. S. LANTZ und V. P. WRAY, *Cancer Res.* 29 (1969) 2034.

Abb. 18. Allgemeines Schema zur immunchemischen Untersuchung von Zelloberflächen-Glykoproteinen



## I. Immunisierung

## 1. Humorale Antikörper

- a) Immunodiffusionsteste
- b) Hämagglutinationshemmteste
- c) Präzipitations (hemm) teste

Spezifität: kohlenhydratspezifisch, «carrier» (Protein)-spezifisch oder beides  
Kreuzreaktionen mit Mucoiden anderer Herkunft und Spezies

2. Spezifische zelluläre Immunreaktion (Allergie vom verzögerten Typ)  
Hautteste

Spezifität: «carrier» (Protein)-spezifisch kohlenhydratspezifisch oder beides  
Kreuzreaktionen mit anderen Mucoiden möglich

## II. Serologische Endgruppenbestimmungen (Spezifität: kohlenhydratspezifisch)

1. Agglutinine aus Pflanzen (Lektine)
2. Agglutinine aus der Eiweißdrüse des Sexualapparates von Schnecken (Protectine)
3. Agglutinine aus der Hämolymphe von Avertebraten

## III. Abbau durch Glykosidasen:

1. Serologische Eigenschaften verschwinden
2. Neue serologische Eigenschaften treten dabei auf

## IV. Protease-Behandlung:

1. Abschwächung oder Verschwinden serologischer Aktivität
  - a) Zelluläre Immunreaktion
  - b) Virusrezeptoreigenschaften
2. Aufspalten in serologisch verschieden aktive Bruchstücke

genmosaik der Zelloberfläche: als Verbindungsstück fungieren die Multienzymsysteme, sozusagen ein Architektenteam, welches den genetischen Plan, die Information in eine Konstruktion umsetzt. Auch bei den Kälteagglutininrezeptoren wissen wir, daß einige auf dem protease-resistenten, andere auf dem protease-labilen Teil des Glykoproteins lokalisiert sind<sup>16</sup>. Dies alles führt schließlich zu weiteren Variationen eines Zellmembranmodells, etwa im Sinne von ZÄHLER<sup>90</sup>, um alle Befunde, die ungewöhnlichen genetischen Variationsmöglichkeiten der Zelloberflächenmucoide (im Bezug auf den Kohlenhydrat- und den Proteinanteil) biochemisch und serologisch zu koordinieren und in Korrelation zu stereoscan-elektronenoptischen Rasterbildern von der Zelloberfläche zu setzen, unter Berücksichtigung funktioneller Gesichtspunkte<sup>91</sup>.

Uns hat sich das in Abb. 18 aufgestellte Schema bei der Untersuchung von Erythrocytenglykoproteinen recht

gut bewährt, vor allem die sukzessive Einwirkung verschiedener Enzyme und die Feststellung serologischer Spezifitäten mit Hilfe heterophiler antikörper-ähnlicher Verbindungen aus Pflanzen und Avertebraten, womit sich auch der Abbau durch Glykosidasen recht gut verfolgen läßt. Zur Feststellung der Heterogenität von Erythrocytenmucoiden haben wir gute Erfahrungen mit dem Verfahren der isoelektrischen Fokussierung gemacht, über die wir an anderer Stelle berichtet haben<sup>92</sup>. Als Beispiel sei hier nur die Auftrennung von Schweineerythrocytenmucoiden von verschiedenen Tieren aus dieser Arbeit aufgezeigt (Abb. 19). Die serologische Aktivität für den PHA-Lektin-Rezeptor liegt nur in den NS-haltigen Fraktionen<sup>93</sup>. Dies ist nur ein Beispiel für den Polymorphismus der Erythrocytenglykoproteine, den wir aber auch für andere Zelloberflächenglykoproteine annehmen können, z. B. von Lymphocyten und Thrombocyten.

<sup>90</sup> P. ZÄHLER, *Vox sang.* 15 (1968) 81.

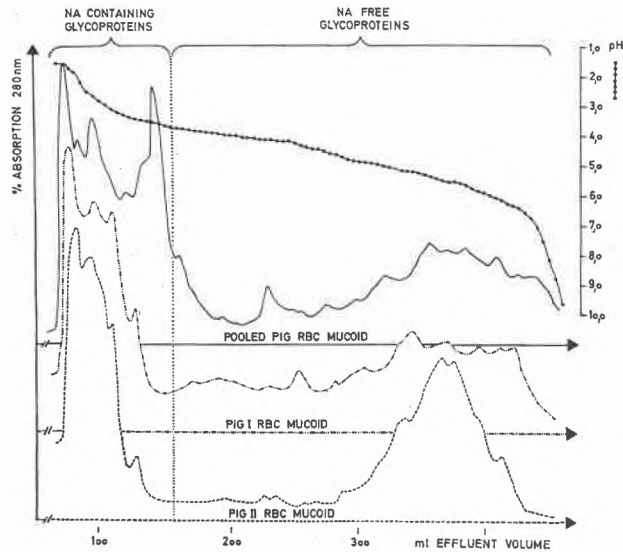
<sup>91</sup> G. A. JAMIESON und T. J. GREENWALT, *Red Cell Membrane*, Blackwell Scientific, 1970.

<sup>92</sup> G. WINTZER und G. UHLENBRUCK, *Folia Haematologica*, im Druck.

<sup>93</sup> G. UHLENBRUCK, G. WINTZER, B. SALFNER, K. SCHUMACHER, H. OERKERMANN, W. D. HIRSCHMANN und G. ALZER, *Klin. Wschr.* 48 (1970) 1369.

Abb. 19. Auftrennung verschiedener Schweineerythrocytenmucoide mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierungsmethodik (genaue Angaben bei<sup>60</sup>)

Obere Kurve: Sammelblut als Ausgangsmaterial, darunter Blut von zwei Einzeltieren. Zu Beginn des pH-Gradienten NS-haltige Glykoproteine, dann die NS-freien Fraktionen. Absorptionsmessung nach Lowry-Methode



Welche Bedeutung diesem Polymorphismus allerdings zukommt, wissen wir heute noch nicht, denn die lebens-

wichtigen Funktionen der Zelle werden hierdurch wohl kaum beeinflusst, abgesehen von einer Ausnahme bei Schaf-Erythrocyten, wo eine enge genetische Beziehung zwischen dem M-Antigen der Zelle (Glykoprotein?) und dem Kalium-Transport besteht<sup>94</sup>. Ansonsten ist der Sinn dieser genetisch bedingten Variabilität unklar. Als einzig bisher bekannte funktionelle Einheiten der äußeren Glykoproteinschicht sind die Enzyme Acetylcholinesterase<sup>95</sup> und ATPase<sup>94</sup> bekannt. An dem ersteren könnte kürzlich eine spezifische «outside»-Markierung demonstriert werden, die es gestattet, das Enzym selektiv als zur äußeren Zellmembran zugehörig zu markieren<sup>96</sup>. Die Acetylcholinesterase läßt sich nicht nur durch Proteasen inaktivieren; sie ist auch für das Penicillinbindungsvermögen der Erythrocyten verantwortlich und ist bei membrandefekten Zellen (PNH, siehe Abb.6) deutlich vermindert<sup>95</sup>. Diese Hinweise mögen genügen, um zu zeigen, daß die äußeren Zellmucoide nicht nur für die Ausbildung eines höchst individuellen antigenen *make up* der Zelloberfläche und zu ihrem Schutz beitragen – zugleich auch für die Koordination im Zellverband sorgen –, sondern daneben auch eine Reihe von wichtigen Funktionen übernehmen können.

<sup>94</sup> P.K. LAUF und D.C. TOSTESON, *J. Membrane Biol.* 1 (1969) 177.

<sup>95</sup> F. HERZ, *Nature* 214 (1967) 497.

<sup>96</sup> M. BURNS BELLHORN, O. O. BLUMENFELD und P. M. GALLOP, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 39 (1970) 267.