MADOFF und EYLAR¹⁹ haben bereits gezeigt, daß dies grundsätzlich möglich ist. Auch haben COOK und MITARB.¹⁸ sowie mit einem ähnlichen Ergebnis EYLAR und MITARB.²² berechnet, daß beim Menschen etwa doppelt so viel chemisch nachweisbare Neuramin-

säure-Moleküle von jedem Erythrocyten abgespalten werden wie auf Grund der Potentialverminderung zu erwarten sind, was wiederum darauf hinweist, daß nicht jede Abspaltung von Neuraminsäure-Molekülen elektrokinetische Folgen nach sich ziehen muß.

Das elektrokinetische Potential von Hühnererythrocyten unter RDE-Einwirkung

II. Mitt.: Das quantitative Verhältnis zwischen adsorbierter und freier RDE-Phase

VON E. STRAUB ** und P. SACHTLEBEN^{†, ††}

Aus der Pädiatrischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. G. WEBER)

(Z. Naturforsch. **18 b**, 536—540 [1963]; eingegangen am 25. Februar 1963)

1. Zellelektrophoretische Untersuchungen haben ergeben, daß zwischen dem adsorbierten und freien Anteil eines zur Reaktion mit Hühnererythrocyten angebotenen RDE-Präparats ein Gleichgewicht besteht, dessen Proportion etwa 1 : 1 beträgt und von der RDE-Dosis nicht beeinflusst wird.

2. Dieses Gleichgewicht gehorcht dem Massenwirkungsgesetz und wird durch Erhöhung der Zellsuspensionsdichte oder Einschränkung des Flüssigkeitsvolumens, das dem Zell-RDE-System zur Verfügung steht, zugunsten der adsorbierten Phase verschoben.

3. Die bei hoher Konzentration der Reaktionspartner herbeigeführte elektrophoretische Beweglichkeitsverminderung läßt sich durch Vergrößerung des Reaktionsraumes in entsprechendem Maße rückgängig machen.

4. Die Desorption von an der Zelloberfläche haftendem RDE kann auch dadurch erreicht werden, daß frische Erythrocyten mit den RDE-besetzten vereinigt werden.

5. RDE verliert durch Adsorption und nachfolgende Desorption seine elektrokinetische Wirksamkeit nicht.

Die in der 1. Mitteilung¹ dargestellten Untersuchungen haben ergeben, daß „receptor destroying enzyme“ (RDE)², sich an Hühnererythrocyten adsorbiert. Eine anschließende spontane Elution ist nicht nachweisbar. Diese Eigenschaften lassen RDE als dem perijodat-inaktivierten Virus ähnlich erscheinen und unterscheiden es von aktivem Virus, das regelmäßig spontan eluiert, nachdem es an der Zellmembran eine charakteristische enzymatische Wirkung entfaltet hat³. RDE führt zu einer quantitativ von der Dosis abhängigen Verminderung der elektrokinetischen Beweglichkeit von Hühnererythrocyten¹.

Im folgenden berichten wir über Untersuchungen betreffend das Verhältnis zwischen adsorbierter und freier RDE-Phase in einem Zell-RDE-System.

Material und Methoden

Genauere Angaben mit Literaturhinweisen finden sich in der 1. Mitteilung¹.

a) „Receptor destroying enzyme“ (RDE). Verwendet wurde das Präparat der Behring-Werke. Es handelt sich um lyophilisierte Kulturfiltrate von *V. cholerae* oder um hochgereinigtes, in Lösung geliefertes RDE.

b) Virus. Das Virus der Klassischen Geflügelpest (K. P.; fowl plague) wurde auf Hühnerembryonen vermehrt. Die im Adsorptions-Elutions-Verfahren gereinigten Erreger inaktivierten wir mittels Perijodat.

c) Erythrocyten. Bei 4° in Alsever-Lösung konservierte Hühnererythrocyten wurden unmittelbar vor Gebrauch — spätestens 10 Tage nach der Entnahme aus der Vene — 3-mal in physiologischer Kochsalzlösung und 1-mal in Pufferlösung gewaschen.

* Die Arbeiten wurden von der Friedrich-Baur-Stiftung unterstützt.

** Zur Zeit der Durchführung der Untersuchungen Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Jetzt an der Universität des Saarlandes, Homburg.

† Jetzt an der Kinderklinik der Universität des Saarlandes, Homburg.

†† Unter technischer Assistenz von Frau I. SAUTTER.

¹ E. STRAUB u. P. SACHTLEBEN, Z. Naturforsch. **18 b**, 530 [1963].

² F. M. BURNET and J. D. STONE, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **25**, 227 [1947].

³ A. BUZZEL and M. HANIG, Advances Virus Res. **5**, 289 [1958].

d) Pufferlösung. Als Suspensionsmedium diente 0,9-proz. Kochsalzlösung, der 5 Volumenprozent *m*/15-Phosphatpuffer beigelegt worden waren. Der p_H -Wert dieses Gemisches betrug 7,0, die elektrische Leitfähigkeit 0,0136 mS ($23,0^\circ$).

e) Zellelektrophorese. Das Verfahren beruht auf der mikroskopischen Messung der Wanderungsgeschwindigkeit einzelner suspendierter Zellen im elektrischen Feld.

Die Temperatur wurde bei $23,0 \pm 0,1^\circ$ konstant gehalten. Die unten aufgeführten Meßwerte stellen, soweit nicht anders vermerkt, das Mittel aus jeweils 20 Einzelbestimmungen dar. Der mittlere Fehler des Mittelwertes betrug 0,6 Prozent.

Eine ausführliche Beschreibung der Methode wurde an anderer Stelle ⁴ gegeben.

f) Hämagglutinations-Test. Virus und RDE wurden nach HIRST ⁶ entsprechend der Technik von SALK ⁵ auf ihre Hämagglutinationskraft geprüft. Eine agglutinierende Einheit (a. E.) definiert sich dabei als die geringste in einem Volumteil enthaltene Menge, die die Erythrocyten eines Volumteils der 0,25-proz. Suspension sichtbar verklumpt.

Ergebnisse

1. Das quantitative Verhältnis zwischen adsorbierter und freier RDE-Phase in einem Zell-RDE-System

Wir untersuchten eine Serie von Reaktionsgemischen, die sich aus einheitlich dichten Erythrocyten-Suspensionen und unterschiedlich konzentrierten RDE-Präparaten zusammensetzten. Der Gehalt der Medien an freiem RDE wurde bestimmt, indem wir die nach Zentrifugation abgehobenen Überstände jeweils mit frischen roten Blutkörperchen vereinigten und letztere der elektrophoretischen Messung unterzogen. Die neuerdings angefallenen Überstände wurden wiederum zu normalen Zellen gegeben. Mit den nunmehr vorliegenden Aufschwemmungen wurde in weiteren Schritten ebenso verfahren, bis eine erythrocytenverändernde Aktivität der Überstände elektrophoretisch nicht mehr in Erscheinung trat.

Im einzelnen wurde dabei so vorgegangen, daß wir, ausgehend von einem RDE-Präparat mit 64 a. E., halbschlächtinge Verdünnungsreihen anlegten. Als Dilutionsflüssigkeit diente Pufferlösung. Die Proben à 5 ml wurden jeweils mit dem Sediment aus

5 ml einer 0,5-proz. Erythrocyten-Suspension beschickt. Nach Aufwirbeln der roten Blutkörperchen und 1-stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert, das Zellgut routinemäßig elektrophoretisch gemessen und in die Überstände frisches Erythrocytensediment eingebracht. Unter 8-maliger Wiederholung dieser Prozedur erhielten wir die Diagramme der Abb. 1.

Es ergab sich, daß RDE nicht restlos an die Zellmembran adsorbiert wird. Wäre dies der Fall, so hätten bis zu einer bestimmten, der Absättigung aller zur Verfügung stehenden Rezeptoren entsprechenden Relation von Erythrocytenzahl zur angebotenen RDE-Menge die Überstände frei von Hämagglutination gefunden werden müssen. Tatsächlich läßt sich aber auch in RDE-Präparaten von weniger als 16 a. E. nach der vorübergehenden Anwesenheit roter Blutkörperchen noch eine erhebliche RDE-Aktivität nachweisen. Es ist demnach anzunehmen, daß das Zell-RDE-System bezüglich der adsorbierten und der freien RDE-Phase einem Gleichgewicht unterliegt.

Bestimmte RDE-Mengen führen regelmäßig zu bestimmten elektrokinetischen Wirkungen. Die in Abb. 4 unserer 1. Mitteilung ¹ aufgeführten Elektrophoresewerte als Funktion der RDE-Dosis können also im Sinne einer Eichkurve benutzt werden, nach der von einem bestimmten Elektrophoresewert auf die RDE-Dosis, die den gemessenen Erythrocyten zuvor als Reaktionspartner zur Verfügung gestanden hat, geschlossen werden kann. Bei einer solchen Beurteilung der in Abb. 1 eingetragenen Beweglichkeiten ergibt sich, daß das Verhältnis zwischen freier und gebundener RDE-Menge von der Dosis des RDE unabhängig ist.

Dieses Verhältnis hat die Proportion von etwa 1 : 1, was ebenfalls dem Resultat des in Abb. 4 der 1. Mitteilung dargestellten Versuches zu entnehmen ist: dort war RDE zur quantitativen Prüfung seines elektrokinetischen Effekts halbschlächting verdünnt worden. Das dabei erhaltene Schaubild ähnelt weitgehend den in Abb. 1 dargestellten Kurven, welche durch wiederholte vorübergehende Exposition stets frischer Erythrocyten in denselben Überständen gewonnen wurden. Demnach muß also bei dem hier

⁴ P. SACHTLEBEN, G. F. FUHRMANN, E. STRAUB u. G. RUHENSTROTH-BAUER, *Klin. Wschr.* **16**, 839 [1961].

⁵ J. W. SALK, *J. Immunology* **49**, 87 [1944].

⁶ G. HIRST, *Science* **94**, 22 [1941].

⁷ E. KLENK, *Angew. Chem.* **72**, 482 [1960].

⁸ G. V. F. SEAMAN u. G. UHLENBRUCK, *Klin. Wschr.* **40**, 699 [1962].

nen Flüssigkeitsvolumina in stets derselben absoluten Quantität enthalten waren.

Jeweils 6 a. E. getrockneten RDE-Ausgangsmaterials wurden in 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 oder 1000 ml Pufferlösung aufgenommen. Ebenso wurde je ein inaktiviertes Viruspräparat von $\frac{1}{2}$ a. E. in entsprechend unterschiedliche Flüssigkeitsmengen eingebracht. Die Angaben in a. E. beziehen sich hierbei auf den routinemäßigen Hämagglutinations-Test nach Salk, der mit 2,5 ml des hämagglutininhaltigen Materials ausgeführt wird. Alle Präparate sowohl der RDE- wie auch der Virus-Serie wurden jeweils zum Sediment aus 5 ml einer 0,5-proz. Zellsuspension gegeben. Nach Aufwirbeln der Erythrocyten warteten wir 60 min bei Zimmertemperatur ab, wuschen die Zellen 3-mal in Pufferlösung und nahmen dann die elektrophoretische Bestimmung vor.

Die Vergrößerung des Reaktionsraumes führt, wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, zu einer Einschränkung der elektrokinetischen Wirkungen. Das quantitative Verhältnis des gebundenen zum freien Hämagglutinin verschiebt sich demnach zugunsten der freien Phase.

Abb. 3. Der Einfluß der Größe des Reaktionsraumes eines Zell-RDE-Systems auf den erzielten elektrokinetischen Effekt (A: Virus; B: RDE).

4. Die elektrokinetischen Folgen der Variation des Suspensions-Volumens nach Abschluß der Zell-RDE-Reaktion

Wir untersuchten nun eine Suspension von Erythrocyten, die mit RDE in vergleichsweise hoher Konzentration vorbehandelt und deshalb weitgehend mit RDE besetzt waren. Sie wurde anschließend

durch Zusatz unterschiedlicher Flüssigkeitsmengen verdünnt. Nach Ablauf einer längeren Frist prüften wir die aus den ungleich dimensionierten Medien stammenden Zellen in der Elektrophorese-Apparatur.

Hierzu behandelten wir 25 ml einer 0,5-proz. Erythrocyten-Suspension mit einem RDE-Präparat von 6 a. E. Die Reaktion der im Volumenverhältnis 1 : 1 vermischten Partner ging bei Zimmertemperatur vonstatten. 60 min nach Vereinigung von Zellgut und RDE erfolgte die Waschung und Resuspendierung der roten Blutkörperchen in Pufferlösung. Die nun vorliegende 0,5-proz. Aufschwemmung RDE-vorbehandelter Erythrocyten in Pufferlösung wurde in 5 Portionen aufgeteilt. Nach Zentrifugierung lagen ebenso viele gleiche Zellsedimente vor, die in 5; 10; 40; 80 oder 1000 ml Pufferlösung aufgenommen und 180 min stehengelassen wurden. Anschließend wurden die aus den einzelnen Proben gewonnenen Erythrocyten routinemäßig elektrophoretisch gemessen.

Überraschenderweise fanden wir, daß, wie Abb. 4 zeigt, die bei hoher Zellkonzentration durch RDE bewirkte elektrophoretische Beweglichkeitseinschränkung nach Überführung der Zellen in größere Volumina des Mediums teilweise wieder rückgängig gemacht wird. Die erreichten Werte sind den unter 3. ermittelten vergleichbar.

Ein weiteres Experiment ergab, daß RDE-besetzte Erythrocyten durch mehrmaliges Waschen innerhalb kürzester Frist und bei unverzüglicher elektrophoretischer Messung ihr ursprüngliches, elektrophoretisch niedriges Beweglichkeitsniveau unverändert beibehalten; ein mechanisches Abstreifen des membranständigen Hämagglutinins war also nicht erfolgt.

Abb. 4. Die elektrokinetischen Folgen der Verbringung einheitlich dicht mit RDE besetzter Zellen in unterschiedlich dimensionierte Suspensionslösungen.

5. Die elektrokinetischen Folgen der Vereinigung RDE-besetzter und normaler Erythrocyten

Wir prüften weiterhin noch das Verhalten einer Suspension, in der sowohl mit RDE vorbehandelte als auch frische rote Blutkörperchen enthalten waren. Diese Mischpopulation wurde sofort nach der Vereinigung der nativen mit den RDE-besetzten Zellen laufend elektrophoretisch gemessen.

Wir brachten 5 ml einer 0,5-proz. Aufschwemmung maximal RDE-besetzter und 3-mal in Pufferlösung gewaschener Erythrocyten mit 5 ml einer 0,5-proz. Suspension von nativen roten Blutkörperchen zusammen und führten an dieser Mischsuspension in Minutenabständen während 1 Stde. elektrophoretische Messungen aus.

Als Ergebnis erhielten wir das Diagramm der Abb. 5. Man kann den Kurven entnehmen, daß frische Erythrocyten im hämagglutinfreien Medium bei Anwesenheit von mit RDE-behafteten Zellen elektrophoretisch verlangsamt werden. Man muß also annehmen, daß sich RDE von den primär RDE-besetzten Zellen abgelöst und an die nativen Erythrocyten gebunden hat. Zu einer auf Grund der unter 4. mitgeteilten Befunde denkbaren elektrokinetischen Vereinheitlichung aller beteiligten roten Blutkörperchen infolge der Neueinstellung des Gleichgewichtes zwischen dem adsorbierten und dem nicht adsorbierten Anteil des verfügbaren RDE kommt es allerdings nicht — vielmehr erscheinen die ursprünglich behandelten Erythrocyten hinsichtlich der elektrokinetischen Veränderung auch nach längeren Fristen bevorzugt.

Abb. 5. Zellelektrophoretische Auswertung einer Mischsuspension von maximal RDE-besetzten und normalen Erythrocyten im Verlauf der Zeit.

Besprechung der Ergebnisse

Unser 1. Versuch zeigt, daß RDE sich auch dann nicht quantitativ an die angebotenen Erythrocyten adsorbiert, wenn die Zellen eine submaximale elektrokinetische Veränderung erfahren, also nur unvollständig mit RDE besetzt sind und demnach noch angreifbare Rezeptoren zur Verfügung stehen. Es errechnet sich für unseren Ansatz ein Verhältnis zwischen gebundener und freier RDE-Phase von etwa 1:1, und zwar unabhängig von der angewendeten Dosis.

Dem 2. Experiment ist zu entnehmen, daß die Variation der Erythrocyten-Konzentration den elektrokinetischen Effekt in relativ geringerem Maße beeinflusst als die Veränderung der RE-Menge.

Wie Versuch Nr. 3 ergibt, ist die Größe des Reaktionsraumes von Bedeutung für die quantitative Ausprägung der elektrokinetischen RDE-Wirkung.

Bereits diese Feststellungen sprechen dafür, daß zumindest das elektrophoretisch faßbare Prinzip des RDE die klassischen Kriterien eines Enzyms nicht erfüllt. Der mit dem 4. und 5. Versuch geführte Nachweis der Reversibilität der RDE-bedingten Zellveränderung stellt die Fermentnatur jedenfalls der elektrokinetischen RDE-Aktivität vollends in Frage. Die Resultate stützen u. E. die in der Besprechung der 1. Mitteilung entwickelte Vorstellung, daß die „Abdeckung“ an der Zelloberfläche befindlicher elektronegativer Ladungen durch das RDE-Molekül für die Erniedrigung der Zellmobilität im elektrischen Feld verantwortlich ist.

Aus dem Ergebnis des 5. Versuches, bei dem es nach Vereinigung von RDE-besetzten und frischen Zellen zu einem — wenn auch nicht vollständigen — Ausgleich der elektrophoretischen Beweglichkeiten gekommen war, darf geschlossen werden, daß RDE sich unter bestimmten Bedingungen von der Zellwand ablösen und dann an frische Erythrocyten adsorbieren kann.

Das RDE hat durch Adsorption und nachfolgende Desorption offenbar keinen wesentlichen Aktivitätsverlust erlitten. Denaturierungsprozesse dürften demnach bei der elektrokinetischen Abwandlung der Zelloberfläche allenfalls eine untergeordnete Rolle spielen. Im übrigen weist die Reversibilität der elektrokinetischen Potentialerniedrigung besonders nachdrücklich darauf hin, daß die mittels der zellelektrophoretischen Methode festzustellenden RDE-Effekte mit der bekannten Neuraminsäure-Abspaltung nicht gleichgesetzt werden dürfen.