

Zur Kenntnis der Zellreceptoren für das Influenzavirus Über das Vorkommen von Neuraminsäure im Eiweiß des Erythrocytenstromas

Von

E. Klenk und W. Stoffel

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 24. Oktober 1955)

Auf Grund der Untersuchungen von Hirst¹ sowie von Burnet und seiner Schule² ist anzunehmen, daß das Influenzavirus sich an die infizierbaren Zellen durch die in ihrer Oberfläche vorhandenen Receptoren festheftet. Das Virus hat außerdem die Eigenschaft die Receptoren enzymatisch abzuspalten, so daß es sich wieder von der Zelle ablösen kann. Auch die Erythrocyten der meisten Tiere besitzen derartige, durch das Virus enzymatisch abspaltbare Zellreceptoren, wodurch sich einerseits das Hirstsche Phänomen der Virushämagglutination und andererseits die Tatsache erklärt, daß die Agglutination nur die erste Phase eines viel weitergehenden Prozesses ist, bei welchem schließlich die Fähigkeit der Erythrocyten zu agglutinieren verlorengeht.

Nachdem schon Gottschalk³ im Burnetschen Institut die enzymatische Einwirkung des Influenzavirus auf einige Mucoproteide, welche die Virushämagglutination stark hemmen, etwas eingehender studiert hatte, konnte von uns⁴ vor kurzem, vom Harnmucin ausgehend, N-Acetyl-neuraminsäure als enzymatisches Spaltprodukt isoliert werden. Wenn es sich hier um die für das Influenzavirus und andere ähnliche Viren typische enzymatische Reaktion handelt, so folgt daraus, daß Acetyl-neuraminsäure als Zellreceptor fungiert oder daß sie zumindest einen wesentlichen Teil desselben bildet und daß das in der Zelloberfläche vorhandene hypothetische Mucoprotein, welches nach Burnet² die Festheftung des Virus an die Zelle vermittelt, durch seinen Neuramin-säuregehalt charakterisiert ist.

Wir haben deshalb geprüft, ob im Eiweiß des Erythrocytenstromas Neuraminsäure vorkommt und ob damit eine der von der Theorie geforderten Voraussetzungen erfüllt ist. In der Tat war es möglich, aus den lipoidfreien Eiweißrückständen von Rinderblutstroma Neuramin-

¹ G. H. Hirst, *J. exp. Medicine* **75**, 49 [1942].

² F. M. Burnet, Croonian Lecture, *Proc. Roy. Soc. [London]*, Ser. B **138**, 47 [1951]; siehe auch *Endeavour* **14**, 5 [1955].

³ A. Gottschalk u. P. E. Lind, *Nature [London]* **164**, 232 [1949]; A. Gottschalk, *Nature [London]* **167**, 845 [1951]; **174**, 652 [1954].

⁴ E. Klenk, H. Faillard u. H. Lemppried, *diese Z.* **301**, 235 [1955].

säure herauszuspalten und sie wie üblich in Form der kristallisierten Methoxylverbindung zu isolieren. In Anbetracht des relativ niedrigen Neuraminsäuregehalts des Ausgangsmaterials (weniger als 0,9%) war es notwendig, in den Gang des alten Darstellungsverfahrens noch einen weiteren Reinigungsschritt einzuschieben. Wir bedienten uns dabei mit Erfolg der von Hagdahl und Danielson⁵ beschriebenen Papiersäule, die ein Arbeiten in präparativem Maßstab gestattet.

Beschreibung der Versuche

Als Ausgangsmaterial diente das lipoidfreie Stroma von Rinderbluterythrocyten, das seinerzeit⁶ bei der Darstellung der Glykolipide des Stromas angefallen war. Das Präparat enthielt 0,82 (0,91)% Neuraminsäure (NS). Bei der NS-Bestimmung⁷ machten sich jedoch die im Präparat vorhandenen geringen Mengen Blutfarbstoff störend bemerkbar, so daß der gefundene Wert zu hoch sein dürfte.

Vorversuch: Bei Anwendung des alten Darstellungsverfahrens von Klenk und Lauenstein⁸, nach welchem die Abspaltung der NS durch Erhitzen mit 5-proz. methanol. Salzsäure im Bombenrohr bei 105° vorgenommen wird, erhielt man nach der Fraktionierung mit einer Anionenaustauscher-Säule⁹ aus 150 g Stromaeiweiß 8,8 g Spaltprodukt mit einem NS-Gehalt von nur 2,01 (2,20)%. Daraus wurde auf chromatographischem und elektrophoretischem Wege 82 mg eines Produkts mit 43,0 (42,5)% NS abfraktioniert. Nachdem dieser Reinheitsgrad erreicht war, konnte die Methoxy-NS aus heißem wäßrigem Alkohol zur Kristallisation gebracht werden (12,0 mg). Die nochmals aus wenig Wasser umkristallisierte, rein weiße Substanz war papierchromatographisch einheitlich und hatte denselben R_F-Wert wie die als Testsubstanz mitlaufende Methoxy-NS aus Rindersubmaxillarismucin.

Hauptversuch. Die Spaltung (140 g Stromaeiweiß) erfolgte jetzt nach dem von Böhm und Baumeister¹⁰ etwas abgeänderten Verfahren, bei welchem die Neuraminsäure durch Behandlung mit siedender 2-proz. methanol. Salzsäure in Form eines noch nicht näher charakterisierten Derivats in Lösung gebracht und nach Abtrennung des Eiweißrückstands durch Nachbehandlung mit 5-proz. methanol. Salzsäure im Bombenrohr bei 105° in die Methoxylverbindung übergeführt wird. Auf diese Weise erhielt man ein von vornherein NS-reicheres Spaltprodukt (Menge des nicht über Anionenaustauscher-Säule fraktionierten Produkts: 1,8 g mit 8,7% NS).

Zur Anreicherung der NS wurde zunächst die von Hagdahl und Danielson⁵ beschriebene Papiersäule verwendet. Lösungsmittel: Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 5 mit der Butanolschicht als mobile Phase. Auf die gründlich mit der mobilen Phase ausgewaschene Säule brachte man die in derselben Phase gelöste Substanz (1,0 bzw. 0,8 g), ließ die Lösung einziehen und entwickelte das Chromatogramm in der üblichen Weise. Der Durchfluß wird in Portionen von je 250 ccm gesammelt und 1. auf Aminosäuren nach Moore und Stein¹¹ sowie 2. auf NS mit Bials Reagens geprüft. Zur Prüfung auf NS brachte man 15 ccm Lösung im Vak. auf dem Wasserbad zur Trockne, löste den Rückstand in 2 ccm Wasser auf und führte mit 1 ccm die Bialreaktion aus. Die bialpositiven Fraktionen

⁵ L. Hagdahl u. E. Danielson, *Nature [London]* **174**, 1062 [1954].

⁶ E. Klenk u. K. Lauenstein, *diese Z.* **291**, 249 [1942].

⁷ E. Klenk u. H. Langerbeins, *diese Z.* **270**, 185 [1941], mod. nach P. Böhm, St. Dauber u. L. Baumeister, *Klin. Wschr.* **32**, 289 [1954].

⁸ E. Klenk u. K. Lauenstein, *diese Z.* **291**, 147 [1952].

⁹ E. Klenk u. H. Faillard, *diese Z.* **298**, 230 [1954].

¹⁰ P. Böhm u. L. Baumeister, *diese Z.* **300**, 153 [1955].

¹¹ S. Moore u. W. H. Stein, *J. biol. Chemistry* **176**, 367 [1948].

wurden vereinigt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vak. bei 40–50° nahm man den Rückstand in möglichst wenig Wasser auf und gewann die Substanz aus der wäBr. Lösung durch Gefriertrocknung zurück. Auf diese Weise wurden 230 bzw. 285 mg Substanz mit 27,0 bzw. 22,0% NS erhalten.

Eine weitere Reinigung konnte mit Hilfe der früher⁸ bei der Darstellung des Virus-Spaltprodukts benutzten präparativ-papierchromatographischen Trennungsmethode erzielt werden. Von der dort gegebenen Vorschrift wurde nur insofern abgewichen, als man wegen der größeren Beständigkeit die Eluierung der Substanz aus dem die NS enthaltenden Papierstreifen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur durchführte. Menge der so gereinigten Substanz: 98 bzw. 95 mg. NS-Gehalt: 51,5 bzw. 40,1%.

Die beiden vereinigten Substanzen löste man schließlich in möglichst wenig Wasser und fügte unter Erwärmen das 4–5fache Vol. Äthanol hinzu. Beim Abkühlen und mehrstdg. Aufbewahren bei 0° kristallisierte Methoxy-NS aus (62,5 mg). Zur Analyse wurde die Substanz noch 2mal aus wenig Wasser umkristallisiert und im Hochvak. getrocknet.

4,142 mg : 6,440 mg CO₂, 2,600 mg H₂O u. 0,015 mg Rückst. — 3,352 (4,032) mg : 1,035 (1,256) ccm n/100-HCl.

C₁₁H₂₁O₉N (311,29) Ber. C 42,44 H 6,80 N 4,50
Gef. C 42,58* H 7,05* N 4,33 (4,36)

* Ber. für aschefreie Substanz.

Rein weiße, kristallwasserhaltige Substanz mit der für Methoxy-NS typischen Kristallform. Bei der NS-Bestimmung ergab sich derselbe Extinktionswert wie für die aus Rindersubmaxillarismucin gewonnene Testsubstanz. Bei der papierchromatographischen Prüfung (Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 5 mit Butanolschicht als mobile Phase) war die Substanz einheitlich und mit der obigen Testsubstanz identisch (Sichtbarmachung des Flecks mit Ninhydrin, Bials Reagen¹⁰ sowie Perjodat und Stärkelösung¹². Spez f. Drehung: 14,13 mg in 514,73 mg H₂O gelöst, $c = 2,745$; bei 20° im 1 dm-Rohr. $\alpha: -1,5305$, $[\alpha]_D^{20}: -55,8^\circ$. Für die Methoxy-NS aus Submaxillarismucin wurde früher⁸ gefunden $[\alpha]_D^{20}: -55,1^\circ$.

Die Untersuchung wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Verbandes der Chemischen Industrie, Fonds der Chemie, unterstützt.

Zusammenfassung

Im Stroma von Rinderbluterythrocyten wurde das Vorkommen eines neuraminsäurehaltigen Glykoproteids nachgewiesen. Aus dem lipidfreien Stromaeiweiß konnte Neuraminsäure in Form der kristallisierten Methoxyverbindung in kleinen Mengen isoliert werden.

Summary

The presence of a glycoprotein containing neuraminic acid has been demonstrated in the stroma of bovine blood erythrocytes. Neuraminic acid was isolated in small quantities from the lipid-free stroma protein in the form of the crystalline methoxy-compound.

¹² R. L. Metzberg u. H. K. Mitchell, J. Amer. chem. Soc. **76**, 4187 [1954].