

Fluorescence of Human Erythrocyte 'Ghosts' on Treatment with 8-Anilino-1-Naphthalene Sulfonate

EDELMAN and McCLURE¹ and STRYER² have recently reviewed the use of 8-anilino-1-Naphthalene Sulfonate (ANS) and similar compounds as fluorescent probes for the hydrophobic regions of protein molecules. We have found that a suspension of ghosts fluoresces strongly in a solution of ANS at pH 7.4. Most of this work had been completed when FREEDMAN and RADDA³ reported the interaction of ANS with ghosts.

Materials and methods. Hemoglobin-free ghosts were prepared by hypotonic hemolysis at pH 7.4^{4,5}. The number of ghosts in a stock suspension was determined in a Coulter Counter, model B. The Mg salt of ANS (Turner, Palo Alto, Calif.) was dissolved in 0.13M phosphate, pH 7.4. Fluorescence intensity was measured in an Aminco-Bowman spectrofluorometer. Later measurements were made with a Photovolt model 54 Fluorescence Meter with primary filter No. 5464 and secondary filter No. B470. Both instruments gave similar results.

Results. Addition of ghosts to a 0.20 mM solution of ANS gave marked enhancement of fluorescence, with maximum wavelength for activation at 390–400 nm and for emission at 465–475 nm. As increasing volumes of ghost suspension (5.2×10^9 cells, 3.0 mg of protein, per ml) were added to 5 ml of 0.12 mM ANS in buffer, the fluorescence intensity increased proportionately up to 0.20 ml of ghosts added. Addition of 1% bovine serum albumin (BSA) to 5 ml of ANS in buffer gave a linear response up to 0.10 ml added. Thus, on a protein weight basis, BSA yielded 3.2 times the fluorescence intensity compared with ghosts. Addition of 1 mM CaCl₂ to an ANS-ghost system increased the fluorescence by 8%. Addition of 1 mM ATP or 0.1 mM Mersalyl or ouabain had no effect.

Triton X-100 (a mixture of polyoxyethylene ethers) at 0.05% concentration 'solubilizes' ghosts and releases certain enzyme activities⁶. However, the fluorescence of this ghost solution could not be examined, as solutions of Triton X-100 themselves fluoresce strongly. WEBER and LAURENCE⁷ first reported the enhancement of ANS fluorescence by organic solutes.

In order to estimate the binding of ANS to ghosts, 0.10–1.00 ml aliquots of the stock ghost suspension were added to 5.0 ml of 0.12 mM ANS in buffer. After 5 min the ghosts were centrifuged down in a high-speed centrifuge and the concentration of unbound ANS was determined from the absorbance of the supernatant at 350 nm, after correction for the appropriate blanks. The percentages of ANS bound, for the varying volumes of ghosts, were: 0.100 ml, 5%; 0.200 ml, 10%; 1.00 ml, 42%. It was estimated that at the lower ghost concentrations one cell bound 3×10^7 molecules of ANS. On a protein weight basis, 1 mg of ghost protein bound 1.0×10^{-7} moles of ANS. WEBER and YOUNG⁸ found that 1 mole of BSA bound a maximum of 5 moles of ANS; this equals 7.6×10^{-8} moles/mg of protein.

As measured from a molecular model, the area of the ANS molecule is about 120 Å². The surface area of the human erythrocyte is about 160 μ². If it be assumed that a ghost has the same area (although the volume is somewhat smaller), then 3×10^7 molecules of ANS would cover 43 μ², or about 1/4 of the cell surface, if bound flat on the surface.

When an ANS-ghost preparation was examined in a fluorescence microscope, the fluorescent membranes could be readily seen, and their shapes clearly delineated. The definition is, however, somewhat inferior to that obtained with phase-contrast optics^{9,10}.

Zusammenfassung. Erythrozytenmembranen fluoreszieren in einer Lösung von 8-Anilino-1-Naphthalin Sulfonat bei Phosphatpuffer pH 7.4. Während Kalziumionen die Fluoreszenz leicht verstärken, bleiben ATP, Mersalyl und Ouabain ohne Wirkung. Klare Membranbeobachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

H. B. COLLIER

Department of Pathology, University of Alberta,
Edmonton 7 (Alberta, Canada), 15 September 1969.

Fluorescence of erythrocyte ghosts and of bovine serum albumin in a 0.12 mM solution of ANS in buffer pH 7.4

ml of ghost suspension	<i>I</i>	1% bovine serum albumin (ml)	<i>I</i>
0.050	279	0.005	275
0.100	565	0.010	515
0.150	823	0.020	1050
0.200	1100	0.030	1700
0.250	1220	0.040	2200
0.300	1390	0.050	2900
		0.100	2900

Fluorescence intensity. *I*, is the product of the meter reading and the photometer multiplication factor.

¹ G. M. EDELMAN and W. O. McCLURE, *Accts. chem. Res.* 1, 65 (1968).

² L. STRYER, *Science* 162, 526 (1968).

³ R. B. FREEDMAN and G. K. RADDA, *FEBS Letters* 3, 150 (1969).

⁴ R. I. WEED, C. F. REED and G. BERG, *J. clin. Invest.* 42, 581 (1963).

⁵ J. T. DODGE, C. MITCHELL and D. J. HANAHAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119 (1963).

⁶ H. B. COLLIER and G. DUCHON, *Proc. XII Congr. Int. Soc. Hematol.*, Abstr. No. 0-1 (1968).

⁷ G. WEBER and D. J. R. LAURENCE, *Biochem. J. Proc.* 56, 31 (1954).

⁸ G. WEBER and L. B. YOUNG, *J. biol. Chem.* 239, 1415 (1964).

⁹ Addendum. The paper by B. RUBALCAVA et al. (*Biochemistry* 8, 2742 (1969)) appeared after this report had been submitted for publication.

¹⁰ This work was supported by the Medical Research Council of Canada.

DNS-Synthese, Blastentransformation und Mitosen in gemischten, homologen Granulozyten-Lymphozytenkulturen

Die Transformation von menschlichen Blutlymphozyten in vitro in der Gegenwart homologer Leukozyten¹ wird als Konsequenz des Histokompatibilitätsunterschiedes der Zellpopulationen interpretiert, indem immun-

kompetente Lymphozyten nichtidentische Transplantationsantigene der fremden Zellmembran erkennen und dies unter anderem mit Blastentransformation, Mitose und gesteigerter Nukleinsäuresynthese beantworten²⁻⁴.

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in homologen Leukozytenkulturen ist unbekannt und aus technischen Gründen nicht systematisch studiert. Ihre mitogene Potenz wird im folgenden erstmals beschrieben.

Material und Methode. Das Zellmaterial stammte von 20 gesunden Versuchspersonen, darunter zwei identische Zwillinge- und vier Geschwisterpaare. Lymphozyten wurden aus peripherem, venösem Blut durch Sedimentation mit frisch zubereitetem, präservativfreiem Heparin (30 E Heparin/ml Blut) isoliert. Die Mehrzahl der Granulozyten des Überstandes wurden mittels einer Wattekolonne eliminiert. Das Filtrat enthielt $97 \pm 3\%$ Lymphozyten. Reine Suspensionen morphologisch intakter Granulozyten liessen sich in Plastikammern über Hautfenstern des volaren Vorderarmes gewinnen⁵.

$1,0 \times 10^6$ Lymphozyten wurden in luftdicht verschlossenen, silikonisierten 16×125 mm Kulturgläsern in 2,5 ml Medium 1640⁶ ohne Antibiotika mit 20% autologem Plasma kultiviert. $1,0 \times 10^6$ homologe Granulozyten wurden den Lymphozytensuspensionen bei Kulturbeginn zugefügt. Nach optimaler Kulturzeit von 140 h⁷ wurde die DNS der Lymphozyten mit H^3 -Thymidin ($2 \mu\text{Ci}$, spez. Aktivität $1,9 \text{ Ci/mM}$, Schwarz BioResearch Inc.) während 5 h markiert und die DNS mit 5% Trichloressigsäure nach der Methode von BACH und VOYNOW⁸ gefällt. Das säureunlösliche Präzipitat wurde in 0,2 ml Phenethylamin und Liquidscintillationslösung⁹ resuspendiert und die Radioaktivität in einem TriCarb Spektrometer bestimmt. Alle Experimente wurden dreifach ausgeführt. Die Mittelwerte sind ausgedrückt in cpm (counts per minute) nach Korrektur für Quenching. Morphologische Zellstudien wurden in einem Parallelversuch mit gleicher Zellkonzentration unter identischen Kulturbedingungen durchgeführt, die Kulturen wurden jedoch nach 140 h zentrifugiert (200 g), ausgestrichen, gefärbt nach Wright-Giemsa und 2000 Zellen wurden nach andernorts beschriebenen Kriterien⁴ in Lymphozyten, Blasten und Mitosen differenziert. Die Kontrollen umfassten: Granulozyten allein und Lymphozyten allein ($2,0 \times 10^6$ Zellen/Kultur), Granulozyten beziehungsweise Lymphozyten stimuliert mit PHA-P (Difco) ($1,0 \times 10^6$ Zellen/Kultur, Inkubationszeit 72 h) und Lymphozyten stimuliert mit autologen Granulozyten.

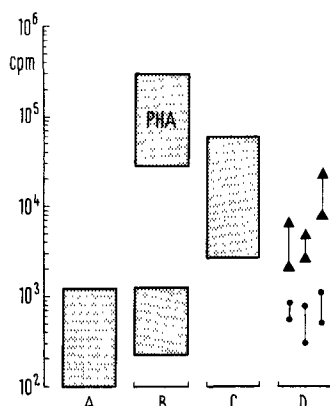


Fig. 1. cpm (counts per minute) Radioaktivität H^3 -Thymidin markierte DNS in Leukozytenmischkulturen nach 145 h. Streuung von 12 Versuchen pro Gruppe. A) Granulozyten allein und mit PHA-P: fehlende Stimulation. B) Lymphozyten allein und Lymphozyten + autologe Granulozyten: fehlende Stimulation. PHA) Phytohaemagglutinin + Lymphozyten: Stimulation. C) Lymphozyten + homologe Granulozyten: Stimulation. D) \blacktriangle - \blacktriangle , Geschwistermischungen: Stimulation; \bullet - \bullet , 2 Zwillinge-1 Geschwistermischung: fehlende Stimulation.

Resultate und Diskussion. Lymphozyten zeigten in allen homologen Mischungen deutliche DNS-Syntheseaktivierung über dem Spontanwert der Gruppe der unstimulierten oder den autologen Granulozyten/Lymphozyten Kontrollen, ohne jedoch die Maximalwerte der PHA Gruppe zu erreichen (Figur 1). Die Mischungen der identischen Zwillinge- und eines Geschwisterpaars blieben, im Gegensatz zu den übrigen Geschwisterkombinationen unstimuliert.

Das Präzipitat der Granulozytenkontrollen wies weder mit noch ohne PHA-P Stimulation eine über dem Hintergrund liegende Radioaktivität auf. Morphologisch zu Blasten transformierte Lymphozyten und Mitosen fanden sich in allen Kulturen mit DNS-Synthesesteigerung, das heisst den homologen Zellmischungen und den PHA-P Lymphozytenkulturen (Figur 2). Über die Resultate der differenzierten Ausstriche orientiert die Tabelle. Die Abgrenzung der Mitosen war einfach, eine

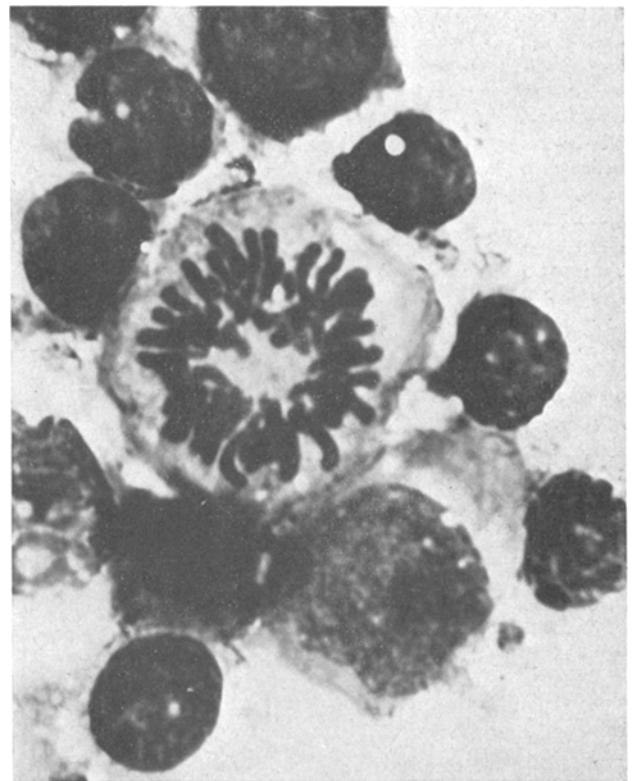


Fig. 2. Homologe Granulozyten-Lymphozyten Mischkultur nach 140 h. Übergangsformen aktivierter Lymphozyten bis zum Blastenstadium und Mitose.

¹ R. SCHRECK und W. J. DONNELLY, *Blood* 18, 561 (1961).

² F. BACH und K. HIRSCHORN, *Science* 143, 813 (1964).

³ B. BAIN und L. LOWENSTEIN, *Science* 143, 1315 (1964).

⁴ M. W. ELVES, M. C. G. ISRAELS und JOAN BOOTH, *Lancet* 1, 1184 (1965).

⁵ H. SENN und J. F. HOLLAND, *Rev. fr. Etud. clin. biol.* 14, 373 (1969).

⁶ G. E. MOORE, R. E. GERNER und H. A. FRANKLIN, *J. Am. med. Ass.* 199, 519 (1967).

⁷ G. A. NAGEL und J. F. HOLLAND, *Transplantation*, in Vorbereitung.

⁸ F. H. BACH und N. K. VOYNOW, *Science* 153, 545 (1966).

⁹ PPO 7 g, Dimethyl-POPOP 0,3 g, Naphthalen 100 g, Dioxan q.s. ad 1000 ml.

Untergruppierung der «Blasten» wurde in dieser orientierenden Übersicht nicht versucht, es fand sich jedoch eine ausgesprochene Variabilität an Übergangsformen in den positiven Kulturen.

Homologe Granulozyten als nicht DNA synthetisierende Endzellen von kurzer (20–50 h) Überlebenszeit bieten sich damit als potentes Mitogen an, welches die selektive Beobachtung biochemischer und morphologischer Ver-

Anzahl Blasten und Mitosen in Leukozytenmischkulturen nach 140 h

Kultur	%	
	Blasten	Mitosen
Homologe GLM Genetisch nicht Verwandte	21,7 (8,6–63,2)	3,2 (0,7–8,2)
GLM Geschwister	18,9 (3,3–59,9)	3,0 (0–4,4)
GLM Zwillinge	3,2 (1,7–3,8)	0
Lymphozyten allein; autologe GLM	< 4	0
Lymphozyten + PHA-P	67,8 (34,5–92,0)	4,1 (3,9–4,6)
Granulozyten allein; Granulozyten + PHA-P	0	0

Mitosen ausschliesslich in Lymphozytenkulturen stimuliert durch PHA-P oder durch homologe Granulozyten, GLM, Granulozyten-Lymphozyten-Mischkultur.

änderungen transformierter Lymphozyten erlaubt. Die positive Lymphozytentransformation durch homologe, nicht aber autologe und isologe Granulozyten ist in Übereinstimmung mit Resultaten der gemischten Lymphozytenkultur^{2,3} und eine indirekte Bestätigung anderer Beobachtungen¹⁰, dass Granulozyten Träger von Transplantationsantigenen sind. Die Zahl der Zellen mit bekannter mitogener Aktivität wird damit erweitert, und es drängt sich die Adaptation dieses Histokompatibilitätstestes zur immunzytologischen Differenzierung von normalen und neoplastischen Geweben auf.

Summary. Lymphocyte stimulation in vitro could be obtained with allogeneic but not autochthonous or isogeneic granulocytes. Blastoid transformation, mitosis and activated DNA synthesis measured by H³-thymidine incorporation occurred simultaneously. The cytoimmunological relevance and further applications of the findings are discussed.

G. A. NAGEL^{11,12}

*Service de Médecine Interne,
Centre des Tumeurs de l'Université libre de Bruxelles,
Institut Jules Bordet,
Bruxelles (Belgien), 25 August 1969.*

¹⁰ J. J. VAN ROOD, A. VAN LEEUWEN, A. SCHIPPERS und H. BALNER, *Cancer Res.* 28, 1415 (1968).

¹¹ Mit Unterstützung der schweizerischen Krebsliga.

¹² Gegenwärtige Adresse: Medizinische Universitätsklinik Bürgerspital, CH-4000 Basel (Schweiz).

Das bioelektrische Potential an der zytoplasmatischen Membran der Granulozyten

Die gemessenen Ionenverteilungen zwischen dem Zellinnern der Leukozyten und dem jeweiligen Suspensionsmedium^{1,2}, die Messungen des Membranpotentials bei Einzellern mit amöboider Bewegung³ und die Ergebnisse an Erythrozyten⁴ legten nahe, diese Grösse für Leukozyten zu bestimmen. Es ist zu vermuten, dass Grösse und Vorzeichen dieser Potentiale von den umgebenden Bedingungen der Leukozyten abhängen, und dass ein Zusammenhang mit der physiologischen Aktivität dieser Blutzellen existiert. REDMANN^{5–7} zeigte, dass das Deckglaspräparat (monolayer) ein günstiges Untersuchungsobjekt für das Studium der Beziehungen zwischen dem bioelektrischen Potential an der Membran von Einzelzellen und den Milieueinflüssen und Zellfunktionen darstellt.

Methodik. Die Granulozyten wurden auf Glasobjektträgern angereichert⁸.

1) Granulozyten aus Vollblut: Einige Tropfen Humanblut werden auf Objektträger gebracht und 30 min bei 37°C bebrütet. Nach anschliessendem Abspülen des Gerinnsels mit dem Untersuchungsmedium ergibt sich eine mehr oder weniger dichte Besetzung von Leukozyten auf dem Objektträger. Es handelt sich bei den haftenden Zellen zu 99% um Granulozyten⁸.

2) Kaninchenexsudatleukozyten: Die Exsudatleukozyten wurden in entsprechender Weise auf die Objektträger gebracht. Das verwendete Exsudat wurde nach den Angaben von BURMEISTER⁹ gewonnen. Sein zellulärer Anteil gliedert sich durchschnittlich in 81% polymorphkernige Leukozyten und 19% Lymphozyten.

3) Messverfahren: Die Messung der Potentiale erfolgte nach den Angaben von REDMANN^{6,7} in einer thermostatisierten Messkammer unter mikroskopischer Kontrolle. Zur Zellpunktion wurden Glasmikroelektroden verwendet (Spitzendurchmesser < 0,5 µm, abgewinkelte Spitze, Tip-Potential < 5 mV, elektrischer Widerstand ca. 30 MΩ, Füllung mit 3M KCl-Lösung). Die Messkette führt symmetrisch über Flüssigkeitsbrücken und Kalomelektroden zum Eingang eines Gleichspannungsverstärkers (Negativ-Capacitance-Elektrometer, Fa. DISA Elektronik, Kopenhagen). Anzeige und Registrierung erfolgte mittels Oszilloskop und Kamera.

Ergebnisse. Die Ergebnisse an Blutleukozyten stammen aus Untersuchungen an 2 Kollektiven: 1) 18 Personen verschiedenen Alters und Geschlechts; 2) 12 Studenten, männlich, 20–22 Jahre). Die zum Vergleich mitgeteilten

¹ D. L. WILSON and J. F. MANERY, *J. cell. comp. Physiol.* 34, 493 (1949).

² D. A. RIGAS, *J. Lab. clin. Med.* 58, 234 (1961).

³ M. S. BINGLEY, *J. exp. Biol.* 45, 251 (1966).

⁴ U. V. LASSEN and O. STEN-KNUDSEN, *J. Physiol.* 195, 681 (1968).

⁵ K. REDMANN, *Biophysik* 4, 92 (1967).

⁶ K. REDMANN und W. KALKOFF, *Experientia* 24, 975 (1968).

⁷ K. REDMANN und D. MOSCHAU, *Acta biol. med. germ.* 20, 255 (1968).

⁸ W. BAUDISCH, *Wiss. Z. Univ. Rostock, Math.-Naturw. Reihe* 3/4, 743 (1963).

⁹ J. BURMEISTER, *Acta biol. med. germ.* 14, 216 (1965).