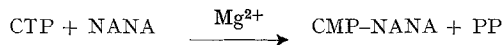


Cytidinmonophosphat-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase in Hühnererythrozyten

Wie schon vorher in den Rinderleukozyten¹, so konnte nun auch in den kernhaltigen Hühnererythrozyten das neuraminsäureaktivierende Enzym, die Cytidinmonophosphat-N-Acetylneuraminsäure-Synthetase, nachgewiesen werden. Dieses Enzym liefert der Neuraminyltransferase die aktivierte Neuraminsäure, CMP-NANA, zum Einbau in Glykoproteine und Glykolipide²⁻⁵; es katalysiert die folgende Reaktion:



Die CMP-NANA übt ferner eine regulierende Wirkung auf die UDP-N-Acetylglucosamin-2-epimerase aus, die das N-Acetylmannosamin für die Biosynthese der NANA bereitstellt⁶.

Das besondere Verhalten der kernhaltigen Blutzellen nach einer Infektion durch Influenzaviren mit einer nur kurzfristigen Resistenz, der nur vorübergehenden Inagglutinabilität dieser Zellen und dem baldigen Erscheinen neuer Virus-Rezeptoren an der Zelloberfläche liess auf eine spezielle, den Neuraminsäurestoffwechsel betreffende Enzymsausstattung dieser kernhaltigen Blutzellen schliessen. Auch die serologischen Eigenschaften von Vogeler erythrozyten mit der Neuraminsäure als immunodeterminantes Molekül des Antigens M^{duc}⁷ werden in diesem Zusammenhang verständlich.

Methodik. a) Darstellung der Erythrozytenmembran. Das Hühnerblut wurde unter Umschütteln zu einer kalten Lösung von 1% Na₂EDTA in 0.7% NaCl hinzugegeben und sofort 10 min bei 4°C und 800 × g zentrifugiert. Plasma und weisser Belag wurden abgehoben, die Erythrozyten wurden noch dreimal mit 0.9% NaCl gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand und die weisse Schicht wurden jeweils verworfen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das obere Drittel des Erythrozytensedimentes ebenfalls entfernt. Die restlichen Erythrozyten hämolysierten wir in Anlehnung an die Vorschrift von HAMMEL und BESSMAN⁸ in dem gleichen Volumen einer Lösung von 1% Saponin in 0.25 M Saccharose und 0.003 M CaCl₂. Nach 6 Min wird das Hämolysat mit dem zehnfachen Volumen 0.25 M Saccharose/0.003 M CaCl₂ versetzt und 15 Min bei 800 × g zentrifugiert. Das Sediment mit den intakten Zellkernen wurde noch viermal in 0.25 M Saccharose/0.003 M CaCl₂ suspendiert und zentrifugiert.

Nach der Lyse in 0.01 M Tris-HCl (pH 5.5), 20stündiger Inkubation mit Desoxyribonuklease (Serva, Heidelberg) in 0.1 M Tris-HCl (pH 5.5) und anschliessender Dia-

lyse (16 h bei 4°C) gegen 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Membranen in der Ultrazentrifuge in 25 min bei 65 000 × g herunterzentrifugiert, in wenigen ml 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6) aufgenommen und 10 sec im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert.

Aliquote Teile des Membranhomogenates wurden zur Inkubation verwendet. Das Protein bestimmten wir nach Vorschrift von LOWRY et al.⁹ unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard.

b) Bestimmung der CMP-NANA-Synthetase-Aktivität. Zu 0.5 ml des in 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6) homogenisierten Membranmaterials fügten wir 0.5 ml einer Lösung hinzu, die 10 µmol MgCl₂ und 0.104 M 2-Merkaptoäthanol in 0.36 M Tris-HCl-Puffer (pH 9.0) enthielt.

In den einzelnen Inkubationsansätzen waren ausserdem vorgelegt bei a) 2.5 µmol NANA und 2.5 µmol CTP (Trinatriumsalz, Boehringer, Mannheim); bei b) 2.5 µmol CTP; bei c) 2.5 µmol NANA; bei d) weder CTP noch NANA.

Zwei Proben wurden jeweils 1 h bei 37°C inkubiert, zwei weitere Proben wurden nach Zusatz der Agentien sofort eingefroren. In 0.2 ml-Proben bestimmten wir die CMP-NANA nach der Methode von KEAN und ROSEMAN¹⁰. Auch hier wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Aktivitäten der CMP-NANA-Synthetase in den Zellkernen der Hühnererythrozyten sind in der Tabelle wiedergegeben, sie sind berechnet als nmol gebildetes CMP-NANA/mg Protein/h. Die Kontrollwerte der Ansätze b), c) und d) sind subtrahiert.

Summary. The nucleated red blood cells from chicken contain a cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminate synthetase which remains bound to the membrane fragments after lysis. The occurrence of this enzyme in nucleated erythrocytes may explain the special behaviour of these blood cells after infection with influenza virus and also their special antigenic properties.

W. GIELEN, R. SCHAPER und G. UHLENBRUCK

Pharmakologisches Institut der Universität,
Gleueler Strasse 24, 5 Köln 41; und
Med. Universitätsklinik, Abt. für Immunbiologie,
Kerpener Strasse 15, 5 Köln 41 (Deutschland),
10. Juli 1972.

Aktivität der CMP-NANA-Synthetase in den Zellkernen von Hühnererythrozyten

| | nmol NANA/ml Inkubations- medium | | nmol CMP-NANA/mg Protein/li | |
|-------------------------|--|------|-----------------------------------|------|
| 1. Zellkern-Präparation | 34.0; | 35.0 | 5.06; | 5.20 |
| | 37.6; | 38.8 | 5.57; | 5.74 |
| 2. Zellkern-Präparation | 38.2; | 38.8 | 2.87; | 2.90 |
| | 35.3; | 36.6 | 2.78; | 2.76 |

Zwei Zellkern-Präparationen, Mittelwerte aus 4 Bestimmungen.

¹ W. GIELEN, R. SCHAPER und H. PINK, Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem. 352, 1291 (1971).

² G. W. JOURDIAN, D. M. CARLSON und S. ROSEMAN, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 352 (1963).

³ J. N. KANFER, R. BLACKLOW, L. WARREN und R. O. BRADY, Biochem. biophys. Res. Commun. 14, 287 (1964).

⁴ A. ARCE, H. F. MACCIONI und R. CAPUTTO, Arch. Biochem. Biophysics 116, 52 (1966).

⁵ P. J. O'BRIEN, M. R. CANADY, G. W. HALL und E. F. NEUFELD, Biochim. biophys. Acta 117, 331 (1956).

⁶ S. KORNFIELD, R. KORNFIELD, E. F. NEUFELD und P. J. O'BRIEN, Pro. natn. Acad. Sci., USA 52, 371 (1964).

⁷ G. UHLENBRUCK und G. I. PARDOE, Z. Naturforsch. 24b, 142 (1969). — H. KAISER, Diss. Köln 1970.

⁸ C. L. HAMMEL und S. P. BESSMAN, J. biol. Chem. 239, 2228 (1964).

⁹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

¹⁰ E. L. KEAN und S. ROSEMAN, J. biol. Chem. 241, 5643 (1966).