

sion hämolysierender Antikörper aus Milchflecken nachweisen. Da die im Omentum verstreut liegenden Milchflecken bei der Maus überwiegend unvaskularisiert sind<sup>2, 5, 7</sup>, ist auszuschließen, daß die hier nachgewiesenen Antikörper aus der Blutbahn stammen. Dagegen wäre es möglich, daß die in den Milchflecken gelegenen Zellen, die hämolysierenden Antikörper abgeben, diesen nicht selbst gebildet, sondern nur gespeichert haben. Das Vorhandensein zahlreicher pyroninophiler Plasmazellen und Plasmazellvorstufen wie auch die Tatsache, daß gerade solche Zellen — aus dem Omentum isoliert und mit dem Cunnigham-Verfahren untersucht — zu den charakteristischen Hämolyselaques führen, beweist jedoch, daß in den Milchflecken tatsächlich Antikörper-bildende Zellen vorhanden sind.

Bei Tieren, die gleichzeitig oder nacheinander mit zwei morphologisch leicht unterscheidbaren Erythro-

cytenarten immunisiert waren, wurden jeweils beide Erythrocytenarten im Bereich der einzelnen Milchflecken lysiert. Untersuchten wir hingegen Einzelzellen aus solchen Omenten, so fanden wir stets nur Zellen, die *entweder* diese *oder* jene Erythrocytenart zur Lyse brachten. Demnach kann es sich bei den Milchflecken nicht um reine Zellklone handeln, die nur einen Antikörper produzieren. Hingegen ist die einzelne Antikörper-bildende Zelle im Milchflecken offensichtlich auf die Produktion von hämolysierendem Antikörper gegen *eine* Erythrocytenart ausgerichtet.

Frl. HANNA FINTER und Frau BRIGITTE TACKE danken wir für hervorragende technische Assistenz. Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Über ein aus menschlichen und tierischen Geweben isoliertes Nucleoprotein mit Kollagen-fällenden Eigenschaften I

## Abtrennung und Charakterisierung des Nucleoproteins

G. WILHELM

Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt, Main (Direktor: Professor B. RAJEWSKY)

(Z. Naturforschg. 21 b, 793—796 [1966]; eingegangen am 19. April 1966)

Es wird über ein neu aufgefundenes Ribonucleoprotein berichtet, das beim Menschen, Kalb, Ratte und Huhn aus allen untersuchten Organen zu isolieren war. Der Abtrennungsvorgang und die bisher vorliegenden Daten zur Charakterisierung des Nucleoproteins werden beschrieben.

In dieser ersten Mitteilung sollen das Verfahren zur Abtrennung des Nucleoproteins und die zu seiner Charakterisierung dienenden Eigenschaften besprochen werden.

### I. Abtrennung des Nucleoproteins

Tierische oder menschliche Organe werden mit doppelter Menge dest. H<sub>2</sub>O mit dem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wird sodann drei Std. bei Zimmertemperatur gerührt und dann 15 Min. bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Rückstand wird verworfen. Die überstehende Lösung wird im Wasserbad auf 80 °C erhitzt, sodann wird die Lösung mit Ammonsulfat auf 40-proz. Sättigung eingestellt und 12 Std. im Eisschrank bei 4 °C gehalten. Danach wird wiederum 15 Min. bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Die Lösung wird dann auf 70-proz. Ammonsulfatsättigung eingestellt und wiederum 12 Std. im Eisschrank bei 4 °C gehalten. Danach wird erneut bei 5000 Umdrehungen 15 Min. zentrifugiert. Das Zentrifugat wird gegen dest. H<sub>2</sub>O bis zum Verschwinden der Sulfatreaktion dialysiert und sodann über Blaugel getrocknet. Die weitere Reinigung

erfolgt mit dem stark basischen Zelluloseaustauscher DEAE Serva Nr. 12113 pa.

12 g Austauscher werden in 500 cm<sup>3</sup> Michaelis-Puffer von p<sub>H</sub> 7 suspendiert, die Lösung nach 45 Min. Stehen dekantiert und eine Säule von 30 ml Inhalt gefüllt. 2 g Rohsubstanz werden in 10 ml Puffer bei p<sub>H</sub> 7 gelöst, die entstehende Trübung bei 20 000 Umdrehungen 15 Min. abzentrifugiert und auf die Säule gegeben.

Die Säule wird mit Puffer von p<sub>H</sub> 3 gewaschen bis das Eluat einen p<sub>H</sub>-Wert von 3,0 erreicht hat. Sodann werden dem Puffer 3% NaCl zugesetzt, die ersten 20 ml Eluat werden verworfen, die nächsten 80 ml aufgefangen. Das Eluat wird sodann gegen dest. H<sub>2</sub>O bis zum Verschwinden der Chlorreaktion im Eisschrank bei 4 °C dialysiert und über Blaugel getrocknet.

### II. Elektrophoresen und Färbemethoden

Die Substanz läßt sich in der Niederspannungselektrophorese gut abtrennen. Die Abb. 1 zeigt eine Papierelektrophorese.

Außer diesen Anfärbungen wurden folgende weitere Farbreaktionen durchgeführt:

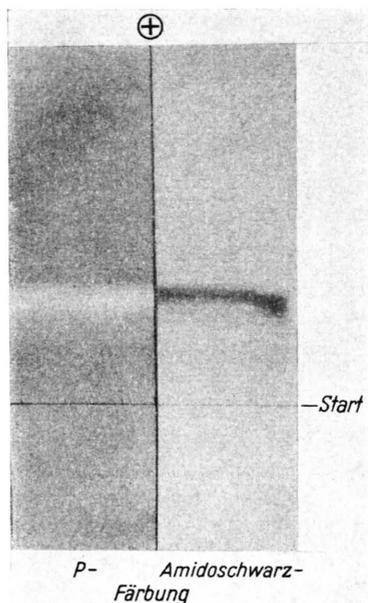


Abb. 1. Papierelektrophorese. Bedingungen: Veronalpuffer 0,1-m., pH 8,6, 200 V 2 Stunden. Rechts auf der Abb. ist die Färbung mit Amidoschwarz 10 b nach GRASSMANN und HANNIG<sup>1</sup> zu sehen, links die Phosphatfärbung nach WADE und MORGAN (Eisen-3-chlorid in Sulfosalicylsäure).

#### Anfärbung auf Calcium

Die Anfärbung erfolgte nach POLLARD und McOMIE<sup>3</sup>. Es konnte hiermit deutlich Calcium nachgewiesen werden. Auch mit einem Calceinsprühereagenz kann deutlich Calcium nachgewiesen werden. Die Streifen werden dabei mit 7-proz. KOH + 0,05-proz. KCN besprüht und bei 80 °C getrocknet, sodann mit 0,03-proz. Calcein in 0,25-n. NaOH nochmals besprüht. Es bilden sich gelbe Streifen auf rosa Untergrund.

#### Anfärbungen\* von Lipiden

Die Färbung erfolgte mit Sudanschwarz B nach SWALM<sup>4</sup>. Auch hiermit erhält man eine deutliche Reaktion.

<sup>1</sup> W. GRASSMANN u. K. HANNIG, *Naturwissenschaften* **37**, 496 [1950].

<sup>2</sup> H. E. WADE and D. M. MORGAN, *Nature* [London] **171**, 529 [1953].

<sup>3</sup> F. H. POLLARD and J. F. W. McOMIE, *Endeavour* **10**, 213 [1951].

<sup>4</sup> B. SWALM, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **4**, 247 [1952].

<sup>5</sup> C. LEVINE and E. CHARGAFF, *J. biol. Chemistry* **192**, 465, 481 [1951].

<sup>6</sup> H. MICHL u. F. HABERLER, *Mh. Chem.* **85**, 779 [1954].

<sup>7</sup> E. T. PACSU, T. P. MORA, and P. W. KENT, *Science* [New York] **110**, 446 [1949].

<sup>8</sup> E. VISCHER and E. CHARGAFF, *J. biol. Chemistry* **176**, 715 [1948].

Anfärbungen mit Ninhydrin ergeben eine schwache Reaktion.

Die Anfärbung auf Cholin nach LEVINE und CHARGAFF<sup>5</sup> mit Phosphormolybdansäure und Zinnchlorid ergibt keine Reaktion.

Die Anfärbung auf Purinkörper nach MICHEL und HABERLER<sup>6</sup> mit Eosinquecksilberchlorid ergibt eine sehr deutliche Reaktion.

Die Anfärbung auf Zucker nach PACSU, MORA und KENT<sup>7, 8</sup> mit 1-proz. Kaliumpermanganat und 2-proz. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ergibt eine schwache Reaktion.

#### III. UV-Spektrum

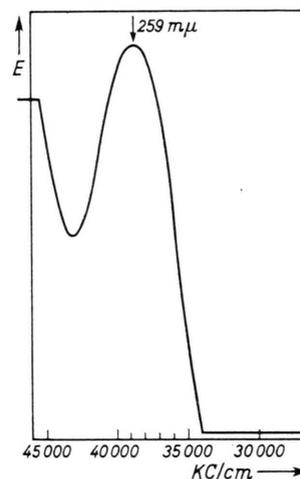


Abb. 2. UV-Spektrum. Die hier gezeigte Kurve wurde im Unicam-UV-Spektrometer aufgenommen. Es zeigt sich hierbei ein deutliches Maximum bei 259 mμ. 100 μg/ml Substanz ergeben in der 1-cm-Küvette eine Extinktion von 0,5.

#### IV. Titrationskurve

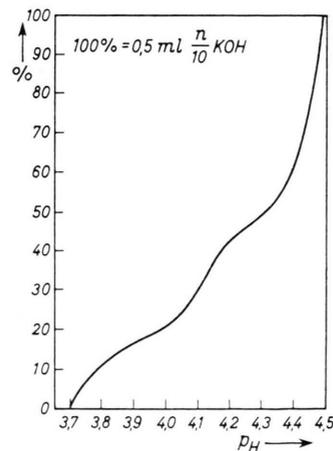


Abb. 3. Titrationskurve. 20 mg Nucleoprotein aus Rattendarm in 1 ml H<sub>2</sub>O.

V. Infrarotspektrum

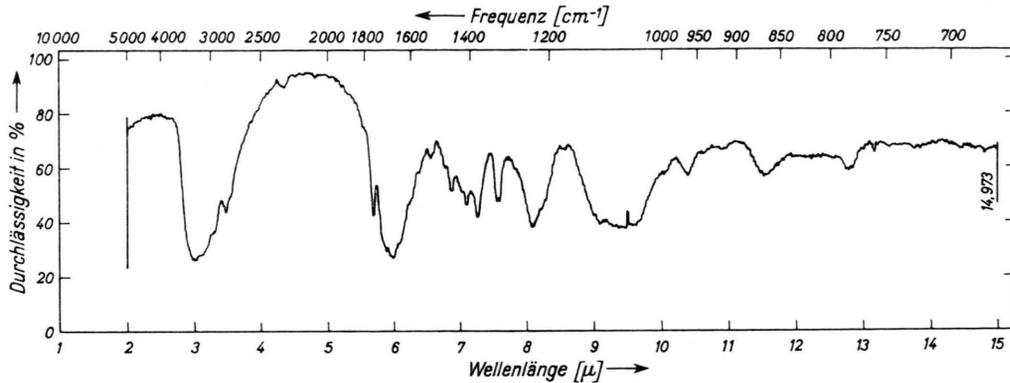


Abb. 4. Infrarotspektrum. 4,05 mg Nucleoprotein aus Kalbsdarm + 250 mg Kaliumbromid.

VI. Löslichkeit

Die Substanz ist ausgezeichnet in Wasser löslich, unlöslich in organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Äther, Chloroform.

VII. Basenbestimmung

Die Basenbestimmung wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt:

1. 5 mg Nucleoprotein aus Rattendarm wurden in 3 ml 0,3-n. KOH 20 Stdn. bei 37 °C hydrolysiert. Danach wurde mit 60-proz. HClO<sub>4</sub> auf p<sub>H</sub> 1 und mit KOH auf p<sub>H</sub> 4 weiter eingestellt. Sodann wurde zentrifugiert. Die Elektrophorese wurde im Citratpuffer 0,02-m. bei p<sub>H</sub> 3,5, 1000 V Spannung, 0 °C, Laufzeit 2 Stdn. durchgeführt. Gleichzeitig wurden Vergleichssubstanzen mit aufgetragen. Im UV-Licht bei 260 mμ konnten Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil gefunden werden. Anschließend wurde noch eine Phosphatfärbung nach WADE und MORGAN<sup>2</sup> durchgeführt.

2. 5 mg Substanz wurden mit 0,5 ml 1-n. HCl eine Stde. bei 100 °C hydrolysiert, im Vakuum getrocknet und mit 0,1-n. HCl aufgenommen und auf Dowex 50 chromatographiert. Auch hierbei fanden sich die bereits genannten Basen.

VIII. Zuckeranalyse nach Partridge<sup>9</sup>

0,2 ml der 2-proz. Nucleoproteinlösung aus Kalbsdarm wurden mit 0,8 ml 1-n. HCl versetzt und eine Stde. bei 100 °C hydrolysiert, sodann über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und KOH getrocknet. Das Hydrolysat wurde danach auf ein Papierchromatogramm gegeben und mit Methyläthylketon, Eisessig, Wasser im Verhältnis 3 : 1 : 1 aufsteigend entwickelt. Als Sprühreagenz diente 0,93 g Anilin + 1,66 g Phthalsäure in 100 ml H<sub>2</sub>O gesättigtem Butanol. Während sich, wie zu sehen ist, reichlich Ribose nachweisen läßt, konnte Desoxy-Ribose nicht aufgefunden werden.

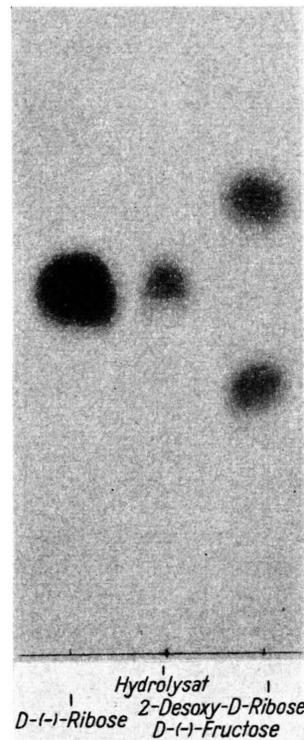


Abb. 5. Zucker-Analyse nach Partridge.

den werden. Ob sich Spuren von Galaktose oder Glucose im Hydrolysat finden, ließ sich nicht sicher aussagen.

IX. Aminosäureanalyse

Da uns kein Aminosäureanalysator zur Verfügung stand, wurden die Aminosäuren nach Hydrolyse mit halbkonzentrierter HCl über Nacht bei 100 °C über die Hochspannungs-Elektrophorese und Papierchromatogra-

<sup>9</sup> S. M. PARTRIDGE, Nature [London] 4167, 443 [1949].

phie bestimmt. Verfahren wurde hierbei nach der von DOSE und CAPUTO<sup>10</sup> angegebenen Methodik.

Folgende Zusammensetzung konnte hierbei gefunden werden:

[%]

- 21 Asparaginsäure,
- 26 Glutaminsäure,
- 14,5 Glyzin,
- 14,5 Alanin,
- 4,4 Serin,
- 5,8 Threonin,
- 3,5 Valin,
- 10,3 Leucin.

Sehr auffällig hierbei ist das starke Überwiegen von Asparaginsäure und Glutaminsäure in der Aminosäure-Zusammensetzung. Da der Methode keine sehr hohe Genauigkeit zukommt, möchten wir dies lediglich als vorläufiges Ergebnis mitteilen.

#### X. Ausschluß von Phosphorproteinphosphor in der Nucleoprotein-Fraktion

1 ml der 2-proz. Nucleoproteinlösung wurden mit 0,032 ml 1-n. KOH versetzt, so daß die Lösung einer 0,25-n. KOH-Lösung entsprach. Die Lösung wurde sodann 24 Stdn. bei 20 °C gehalten. In der Lösung konnte kein anorganischer Phosphor nachgewiesen werden.

#### XI. Versuch des Nachweises von Lipidphosphor in der Fraktion

22 mg Nucleoprotein aus Rattendarm wurden mit 6 ml Alkohol-Äther im Verhältnis 3 : 1 bis zum Sieden erhitzt und zweimal gewaschen. Der Extrakt und die Waschlösung wurden sodann eingeengt und versetzt (in der Sodaschmelze). Phosphat war auch hier nicht nachweisbar. Ein nochmaliger Versuch, mit 0,25-n. KOH im Rückstand anorganischen Phosphor abzuspalten, blieb ebenfalls erfolglos. Hier ist zu sagen, daß sich der mit der Färbung nach SWALM<sup>4</sup>

nachweisbare Lipidanteil weder durch die Alkohol-äther-Behandlung noch durch Erhitzen mit Chloroform während 5 Min. abspalten ließ. In der anschließend ausgeführten Elektrophorese zeigte sich die Fettfärbung nach SWALM<sup>4</sup> unverändert. Ein Versuch, den Lipidanteil in der Gaschromatographie näher aufzuklären, blieb ohne Ergebnis.

#### XII. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase läßt sich aus der Nucleoprotein-Fraktion kein Phosphat abspalten.

#### XIII. Phosphorgehalt des Nucleoproteins

Der Phosphorgehalt des Nucleoproteins betrug 28  $\mu$ /mg. Bei einem Präparat, das wiederholt über die Ionenaustauschersäule gegeben wurde, stieg der Phosphorgehalt auf 58  $\mu$ /mg an.

#### XIV. Nachweis des Nucleoproteins

Der Nachweis des Nucleoproteins konnte in folgenden Geweben geführt werden:

- a) In menschlichem foetalen Gewebe:
  - Darm, Niere, Herz, Leber, Lunge.
- b) In tierischem Gewebe:
  1. Kalb: Darm, Thymus, Blutserum.
  2. Ratte: Darm, Muskel, Thymus, Leber, Milz, Niere, Lunge, Gehirn, Haut.
  3. Huhn: Herz, Vollblut.

Außerdem wurde in Streptokokken der Gruppe A und C ein in bezug auf UV-Absorption und elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit identisches Nucleoprotein isoliert.

Die neu aufgefundene Substanz ist nach diesen Ergebnissen als Ribonucleoprotein anzusprechen, das einen auffallend fest gebundenen Lipidanteil enthält.

<sup>10</sup> K. DOSE u. A. CAPUTO, Biochem. Z. **328**, 376 [1956].