

Total ultraviolet absorption at 260 mμ of perchloric acid extracts of non-aqueous nuclei isolated from various rabbit tissues  
1 ml extract is derived from an amount of nuclei containing 10 μg DNA-P.

Tissue	DNA-P	RNA-P	Optical density (mean and range)	
	% dry wt			
Appendix . . . . .	1.01	0.48	0.469 (0.294–0.644)	(12)*
Bone marrow . . . . .	0.67	0.30	0.580 (0.440–0.720)	( 5 )
Intestinal mucosa . . . . .	0.64	0.45	0.673 (0.493–0.853)	( 7 )
Lung . . . . .	0.45	0.27	0.818 (0.551–1.085)	(11)
Thymus . . . . .	1.68	0.35	0.277 (0.183–0.371)	( 7 )
Embryo liver . . . . .	0.38	0.37	1.031 (0.512–1.550)	( 3 )

\* Figures in brackets show the number of extracts examined.

tissues may be arranged in the following order of decreasing content of acid soluble ultraviolet absorbing material:—Lung, Intestinal mucosa, Bone marrow, Appendix, Thymus.

In embryo liver nuclei the mean value is higher than for any of the adult tissues but again the scatter is very great. High values were also found in two preparations of non-aqueous nuclei from the fowl GRCH 16 tumour.

The nucleotide bases found in the acid extracts included adenine which was most abundant, hypoxanthine, guanine, uracil and very small amounts of cytosine. In the nucleoside and free base fraction the bases were less plentiful than in the nucleotide fraction. Adenine and hypoxanthine were most abundant; guanine and uracil were present in smaller amounts and cytosine was found only in traces.

The scatter of values in different preparations was very great but the tissues could be arranged in the following order of decreasing base content:

- Nucleotide bases:*
- (a) *Adenine.* Intestinal mucosa, bone marrow, appendix = lung, thymus.
  - (b) *Hypoxanthine.* Intestinal mucosa = lung, bone marrow, appendix, thymus.
  - (c) *Guanine.* Intestinal mucosa, bone marrow = lung, appendix, thymus.
  - (d) *Uracil.* Intestinal mucosa = bone marrow = appendix = lung, thymus.
  - (e) *Cytosine.* No important differences—all values low.
- Non-nucleotide bases:*
- (a) *Adenine.* No particular trend as individual differences were too great.
  - (b) *Hypoxanthine.* Intestinal mucosa = lung, bone marrow = appendix, thymus.
  - (c) *Guanine.* No important differences—all values low.
  - (d) *Uracil.* No important differences—all values low.
  - (e) *Cytosine.* Present in traces.

Results from two preparations of GRCH 16 tumour nuclei suggest that these nuclei are rich in adenine nucleotides but the most surprising feature of this material is the very high content of non-nucleotide hypoxanthine. This may be due in part to autolytic changes occurring either before removal from the animal or during the processing of the tissue.

Since mono-, di- and tri-nucleotides of adenine, guanine, cytosine and uracil are known to be present generally in living cells (SACKS, LUTWAK, and HURLEY<sup>1</sup>; SCHMITZ, POTTER, HURLBERT, and WHITE<sup>2</sup>; SCHMITZ,

HURLBERT, and POTTER<sup>1</sup>; SMITH and MILLS<sup>2</sup>), it is not surprising to find evidence of the occurrence of these bases and hypoxanthine as nucleotides, nucleosides and free bases in acid extracts of non-aqueous nuclei. Nucleotides of these bases have also been observed by EDMUNDS and LEPAGE<sup>3</sup> in nuclei prepared in aqueous sucrose homogenates of liver and of Flexner Jobling carcinoma.

It is interesting however to find that in adult rabbit tissues there is no evidence of any preferential accumulation of such materials in those tissues in which cell division is active and the turnover of DNA is high (SMELLIE *et al.*<sup>4</sup>).

This work is being continued on a larger scale with material labelled with <sup>14</sup>C.

*Acknowledgment:*—This work was carried out with the aid of grants from the Medical Research Council and the British Empire Cancer Campaign.

E. R. M. KAY<sup>5</sup> and J. N. DAVIDSON

*Department of Biochemistry, The University of Glasgow, Scotland, August 30, 1955.*

*Zusammenfassung*

Zellkerne, die aus Kaninchengewebe mittels eines nichtwässrigen Verfahrens bereitet werden, enthalten in ihren säurelöslichen Bestandteilen Nukleotide von Adenin, Hypoxanthin, Guanin, Uracil und (in sehr geringen Mengen) von Cytosin. Diese Stoffe wurden in Lunge, Darm-Mucosa, Knochenmark, Appendix und Thymus in abnehmender Konzentration vorgefunden.

<sup>1</sup> H. SCHMITZ, R. B. HURLBERT, and V. R. POTTER, *J. biol. Chem.* **209**, 41 (1954).  
<sup>2</sup> E. E. B. SMITH and G. T. MILLS, *Biochim. biophys. Acta* **13**, 386 (1954); **13**, 587 (1954).  
<sup>3</sup> M. P. EDMUNDS and S. A. LEPAGE, *Cancer Res.* **15**, 93 (1955).  
<sup>4</sup> R. M. S. SMELLIE, G. F. HUMPHREY, E. R. M. KAY, and J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.* **60**, 177 (1955).  
<sup>5</sup> British Empire Cancer Campaign Research Fellow.

Über das Cu<sup>2+</sup>-Bindungsvermögen einiger  
Aminosäuren und Peptide  
Metallionen und biologische Wirkung<sup>1</sup>

Wir haben in einer früher erschienenen Arbeit<sup>2</sup> gezeigt, wie das Cu<sup>2+</sup>-Bindungsvermögen von biologischen Systemen durch das Vorhandensein von gelösten basischen Partikeln bestimmt wird. Die Menge der gefunde-

<sup>1</sup> J. SACKS, L. LUTWAK, and P. D. HURLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 424 (1954).  
<sup>2</sup> H. SCHMITZ, V. R. POTTER, R. B. HURLBERT, and D. M. WHITE, *Cancer Res.* **14**, 66 (1954).  
<sup>3</sup> 37. Mitteilung; 36. Mitteilung: R. GALL und H. ERLÉNMEYER, *Helv. chim. Acta* **38**, 1421 (1955).  
<sup>2</sup> S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER, *Exper.* **11**, 174 (1955).

nen  $\text{Cu}^{2+}$  im Plasma wird demnach in der Hauptsache von der Konzentration und der Art der vorhandenen Proteine abhängen. Ausgehend vom  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen einfacher Peptide als Proteinmodelle, wie Glycyl-Glycyl-Glycin, hatten wir versucht, das Verhältnis von gebundenen und freien  $\text{Cu}^{2+}$  im Plasma des Menschen zu berechnen.

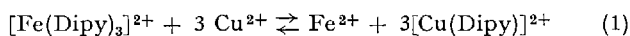
Um genauere Kenntnis über die sich im Organismus abspielenden Reaktionen, an denen  $\text{Cu}^{2+}$  beteiligt sind, zu erhalten, interessierten wir uns in der Folge für das  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen von in Plasmaproteinen vorkommenden Strukturkomponenten.

Bei einfachen Verbindungen genügt die Angabe einer einzigen Masszahl, zum Beispiel der Gleichgewichtskonstanten, zur Berechnung der Konzentrationen aller an einem Gleichgewicht beteiligten Partikel, und damit auch zur Ermittlung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögens.

Wenn hingegen die Struktur der Verbindung mehrere zur Komplexbildung befähigte Gruppen aufweist, wie dies bei Peptiden und Proteinen der Fall ist, ist es bedeutend schwieriger, die für die Charakterisierung aller möglichen Gleichgewichte notwendigen Konstanten zu ermitteln und an Hand solcher Konstanten die Menge  $\text{Cu}^{2+}$ , die diese Verbindung aus einer Lösung zu binden vermag, zu berechnen.

Es war daher für eine Systematik biologischer Systeme erwünscht, eine einfache, direkte Methode zur Ermittlung von vergleichbaren Werten des  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögens verschiedener Systeme zu entwickeln.

Eine solche Methode ist gegeben durch Verwendung des sehr stark gefärbten  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ -Komplexes als Indikator.  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$  reagiert, wie frühere Versuche gezeigt haben<sup>1</sup>, mit  $\text{Cu}^{2+}$  nach der Gleichung (1):



Wird zu einem System, das  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$  und einen weiteren Komplexbildner enthält,  $\text{Cu}^{2+}$  hinzugefügt, so steht für diese Austauschreaktion (1) nur so viel  $\text{Cu}^{2+}$  zur Verfügung, als von diesem Komplexbildner nicht gebunden wird. Die durch spektrophotometrische Messungen zu ermittelnde Zunahme an verbleibender  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$  – gegenüber einem Vergleichsversuch nur aus  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  – ist demnach ein Mass für das  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen des hier interessierenden Komplexbildners.

Wir haben mit dieser Methode das  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen einer Reihe von Aminosäuren und Peptiden ermittelt.

Die Messresultate sind in den Abbildungen 1 und 2 graphisch dargestellt. Als Abszisse ist die Konzentration des im System vorhandenen Komplexbildners aufgetragen, als Ordinate die kolorimetrisch ermittelte verbleibende  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ -Konzentration. Die Messgrösse ist in erster Näherung zugleich ein Mass für die Menge der – unter den gewählten Versuchsbedingungen – an den Komplexbildner gebundenen  $\text{Cu}^{2+}$ . Bei genügend hoher Konzentration des zu prüfenden Komplexbildners erreicht sie in jedem Fall einen bestimmten gleichen Maximalwert. Signifikant für die Unterschiede im Komplexbildungsvermögens sind demnach vor allem die Versuche mit niedriger Konzentration an Komplexbildner.

Die hier durchgeführten Versuche liefern nur Vergleichswerte für das Komplexbildungsvermögen solcher basischer Verbindungen. Der pH wurde auf  $5,2 \pm 0,1$  konstant gehalten. Der zu untersuchende Komplex-

bildner wurde zunächst in konzentrierter Lösung auf das pH 5,2 gebracht und dann mit Azetatpuffer vom pH 5,2 auf ein bestimmtes Volumen verdünnt. Zum Indikatorsystem, bestehend aus je 5 cm<sup>3</sup> der Lösungen:

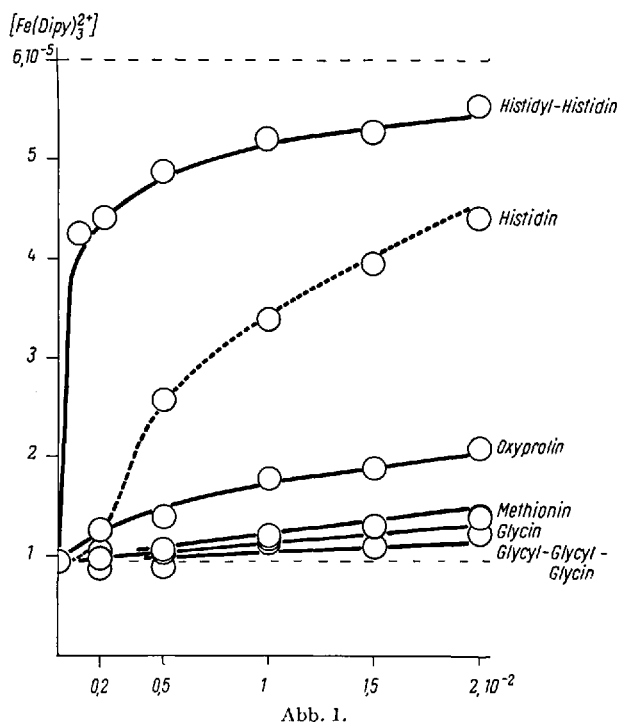


Abb. 1.

$6 \cdot 10^{-4} \text{ m Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  in Wasser,  $18 \cdot 10^{-4} \text{ m Dipyridyl}$  in Azetatpuffer und  $14 \cdot 10^{-4} \text{ m CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in Azetatpuffer, wurde alsdann eine bestimmte Menge der Lösung des Komplexbildners zugefügt und mit

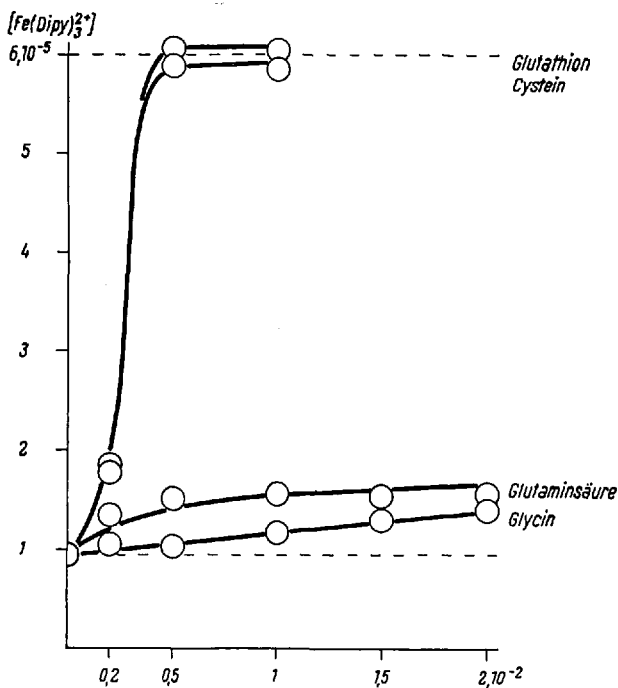


Abb. 2.

Azetatpuffer auf 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Nach 24 h war das Gleichgewicht eingestellt, und es wurde die Absorption bei 5250 Å gemessen. In jedem Fall konnte durch einen

<sup>1</sup> P. G. LÄUGER, S. FALLAB und H. ERLNMEYER, Helv. chim. Acta 38, 92 (1955).

Kontrollversuch gezeigt werden, dass bei den gewählten Konzentrationen der Komplexbildner dem  $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ -Gleichgewicht kein  $\text{Fe}^{2+}$  entzieht. Der Durchmesser der Kreise in den Abbildungen 1 und 2 entspricht dem grössten beobachteten Fehlerintervall.

Die kolorimetrischen Messungen wurden mit einem Unicam-Spektrophotometer SP 500 durchgeführt. Bei den pH-Messungen bedienten wir uns eines Metrohm-Potentiometers E 187 mit kombinierter Glaselektrode.

Den Resultaten ist zu entnehmen, dass unter den untersuchten Aminosäuren Cystein und Histidin ein erheblich stärkeres  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen aufweisen. Ausser den in den Abbildungen 1 und 2 aufgeführten Aminosäuren untersuchten wir Asparaginsäure, die sich wie Glutaminsäure verhält, ferner Arginin und Serin, die von Glycin nicht signifikant verschieden sind.

Bei den Peptiden zeigt Glycyl-Glycyl-Glycin kein stark abweichendes Verhalten gegenüber der einfachen Aminosäure. Das Tripeptid Glutathion verhält sich praktisch gleich wie sein Baustein Cystein. Auffallend ist das potenzierte  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindungsvermögen von Histidyl-Histidin gegenüber seiner Komponente. Bei einer Konzentration von  $0,2 \cdot 10^{-2}$  bindet das Peptid rund 10mal mehr  $\text{Cu}^{2+}$  als die Aminosäure.

G. WOLFF, S. FALLAB und  
H. ERLÉNMEYER

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel,  
den 20. August 1955.

#### Summary

The capacity of binding copper ions of several amino-acids and peptides has been investigated. A direct colorimetric method measuring comparable values of bound  $\text{Cu}^{2+}$  has been developed.

### Über die Wirkung von Mischungen eines antigenhaltigen Plasmas mit einem antikörperhaltigen Serum auf die Entwicklung des Fremdkörpergranuloms

In einer vorhergehenden Mitteilung haben wir beschrieben, dass bei Zusammenbringen von Antiserum mit entsprechenden Antigenen eine deutliche emigrationsfördernde Wirkung an Leukozyten auftritt<sup>1</sup>. Da Stoffe, besonders Bakterienpolysaccharide, welche eine solche Wirkung an Leukozyten besitzen, eine wachstumsanregende Wirkung am Fremdkörpergranulom ausüben<sup>2</sup>, schien es möglich, dass ein Gemisch von Plasma und antikörperhaltigem Serum auch im tierischen Organismus eine solche Wirkung haben könnte. Diese Frage hat besonderes Interesse hinsichtlich des Entstehungsmechanismus der allergisch bedingten Bindegewebsreaktion.

Es wurden die Wirkung der Einzelkomponenten, verschiedene Antiseren und das homologe Serum oder Plasma und die Mischungen dieser Einzelkomponenten auf ihre Wirkungen am Fremdkörpergranulom in den von uns entwickelten Testen untersucht. Als Antigen-Antikörperseren wurden folgende geprüft:

1. Präzipitierendes Antihühnergansserum (BEHRING)
2. Präzipitierendes Antipferdeserum (S. B.).

<sup>1</sup> R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. (im Druck).

<sup>2</sup> R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953); 10, 376 (1954). – R. MEIER, P. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. Exp. Path. Pharmacol. 224, 104 (1955).

Für die Untersuchung ist es Voraussetzung, dass unter vollkommen sterilen Kautelen gearbeitet wird. Diese wurden dadurch garantiert, dass folgende Vorsichtsmassnahmen getroffen wurden: Antigene und die verschiedenen antikörperhaltigen Seren wurden mit sterilen Tuberkulinspritzen in der gewünschten genauen Menge in der Kälte auf sterile Whatman-Papierstreifen aufgebracht und das Material lyophil getrocknet und gepresst. Die daraus hergestellten Presslinge wurden nach unserem üblichen technischen Verfahren zur Erzeugung von Fremdkörpergranulomen<sup>1</sup> Ratten dorsal eingepflanzt. Das entstehende Granulom wurde nach einem Intervall von 7 Tagen herauspräpariert und untersucht.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist folgendes: Hühnerplasma und Pferdeserum und die verschiedenen Antiseren lösen auch bei Anwendung ohne jede Verdünnung praktisch keine granulomerregende Wirkung aus. Es kann in einzelnen Fällen eine ganz geringe, noch in der Fehlerbreite der Methode liegende Veränderung des Granulomgewichtes auftreten, doch ist sie in keinem Falle signifikant. Benutzt man zur Imprägnierung der Papierstreifen Mischungen von entsprechenden Mengen Antiseren in homologem Plasma, so erhält man deutliche granulomwachstumsfördernde Wirkung gegenüber den Kontrollen, die mit den Einzelkomponenten behandelt wurden. In quantitativer Hinsicht lässt sich dieser Effekt bei Verwendung von Verdünnungen von Antiserum zu Plasma noch deutlicher nachweisen, wie folgende Tabelle ergibt.

Granulomgewebegewicht

Tierzahl	Dosis	Absolut		Differenz mg
		mg	S.E.	
12 Kontrollen . . . . .	—	146	± 12	—
6 Antihühnergansserum (BEHRING) . .	$10^{-5}$	156	± 12,7	+ 10
6 Hühnerplasma . . . . .	$10^{-5}$	160	± 11	+ 4
6 Antipferdeserum (S.B.) . . . . .	$10^{-5}$	154	± 12,2	+ 8
6 Pferdeserum . . . . .	$10^{-5}$	150	± 11,7	+ 4
6 Hühnerplasma . . . . .	$10^{-5}$	221	± 14,3	+ 75
+ Antiserum 3/2	$5 \times 10^{-6}$	186	± 12,7	+ 40
6 Pferdeserum . . . . .	$10^{-5}$	194	± 20,0	+ 48
+ Antiserum 3/2	$5 \times 10^{-6}$	173	± 13,0	+ 27

Dieser Effekt lässt sich sowohl mit Antihühnergansserum als auch mit Antipferdeserum mit homologem Plasma bzw. Serum zeigen, obwohl im letzteren Falle die entstandene fördernde Wirkung weniger ausgesprochen war, als es mit Antihühnerserum der Fall war.

Analog wie bei den Befunden an isolierten Zellen ist zu erwägen, welche Stoffe für die beobachtete Wirkung in Betracht gezogen werden können. Nach unseren eigenen Versuchen sind Histamin, Serotonin, Adrenalin, Heparin und Bradykinin, die eventuell bei dieser Antigen-Antikörperreaktion auftreten, auszuschliessen, weil sie nur in Konzentrationen, die etwa der Gesamtmenge des angewandten Serums entsprechen, eine deutliche granulomfördernde Wirkung zeigen. Ebenso rufen sie zum Teil eine ausgesprochene Reizwirkung hervor, bzw. eine Gefässerweiterung an der Konjunktiva des Kaninchenauges, die von dem Antiserumplasmagemisch in diesen Konzentrationen nicht gegeben wird. Damit dürfte es ausgeschlossen sein, dass diese Stoffe für die beobachtete granulomfördernde Wirkung in diesen

<sup>1</sup> R. MEIER, W. SCHULER und P. DESAULLES, Exper. 6, 469 (1950).