

In a typical experiment we succeeded in finding serum antibrain antibodies in a group of animals, all of which had EAE.

Nineteen dogs were injected subcutaneously with homologous brain homogenate, emulsified in Freund's complete adjuvant, the injections being repeated at 14 day intervals<sup>4</sup>. All the animals showed clinical signs of EAE (weakness, ataxia, paralysis) between the 30th and the 120th day after the first inoculation of encephalitogenic emulsion. The animals with clinical signs were sacrificed. In all these cases, the histopathologic examinations showed characteristic microscopic lesions of EAE. After the first inoculation and until the sacrifice, blood was collected from all the animals at an average interval of 5 to 6 days. The antibrain antibodies were investigated by the tanned hemagglutination technique<sup>5</sup>, using as antigens a saline extract of dog brain, as well as a water-soluble fraction extracted from dog brain<sup>6</sup>.

In all the animals, circulating antibrain antibodies were demonstrated with varying titers between 1/10 and 1/360, at different time intervals starting on the 7th day after the first inoculation of encephalitogenic emulsion. As some other workers found<sup>4</sup>, we also detected anti-

Animals with circulating antibrain antibodies at various time intervals

Time interval (in days)	No. of dogs with serum antibrain antibodies	No. of dogs with clinical signs of EAE <sup>b</sup>
0-30	19 (100%) <sup>a</sup>	1
30-60	18 (100%)	-
60-90	18 (100%)	6
90-120	12 (100%)	12
Total animals with EAE		19

<sup>a</sup> Figures in parentheses show the percentage of animals with antibrain antibodies out of the total number of surviving animals.

<sup>b</sup> Animals which were sacrificed when exhibiting clinical signs of EAE.

body titers in the same animal; they varied and at a certain moment they disappeared and subsequently reappeared. About 10 days before the onset of EAE, in almost all animals (except 2 dogs), it was not possible to show serum antibrain antibodies.

Although not all the animals had serum antibrain antibodies on the same day, antibodies have been demonstrated within 30 days in all living animals. The data (Table) indicates that the majority of animals exhibit clinical signs of EAE 90 days after the first inoculation with encephalitogenic emulsion. In the present experiments we have found no animals with serum antibrain antibodies without EAE, while animals with EAE did not have antibrain antibodies. As all animals presented circulating antibrain antibodies at various time intervals, and all of them fell sick with EAE, it seems that a close relationship might exist between the occurrence of serum antibrain antibodies and EAE. However, the fact that circulating antibrain antibodies were not detected at the onset of the disease, makes this correlation rather unreliable.

It has been shown<sup>7</sup> that the complement-fixing antibrain antibodies play a protective role and exert a suppressive influence on the development of EAE when passively administered to animals actively sensitized to nervous tissue. It may be that a similar part is played also by antibrain antibodies as demonstrated by the passive hemagglutination reaction.

*Résumé.* Chez 19 chiens présentant des symptômes de EAE, on a trouvé des anticorps sériques anticerveaux pendant divers laps de temps.

M. SARAGEA, T. NEGRU,  
N. ROTARU, and A. VLADUTIU

*Department of Pathologic Physiology, Institute of Medicine, Bucharest (Roumania), November 13, 1964.*

<sup>5</sup> E. V. BOYDEN, *J. exp. Med.* 93, 107 (1951).

<sup>6</sup> R. F. KIBLER and A. E. BARNES, *J. exp. Med.* 116, 807 (1962).

<sup>7</sup> P. Y. PATERSON and S. M. HARWIN, *J. exp. Med.* 117, 755 (1963).

### Cancerostatische Proteinkomponenten aus *Viscum album*

Frühere Untersuchungen über cancerostatische Inhaltsstoffe von *Viscum album* L. zeigten die höchste Aktivität in der Gesamtproteinfraktion des Preßsaftes<sup>1</sup>. Unseres Wissens ist dies die erste proteinartige Substanz, die eine hohe Hemmwirkung an experimentellen Tumoren zeigt<sup>2</sup>.

Später berichteten WINTERFELD et al.<sup>3</sup> über die Anreicherung einer peptidartigen Substanz aus *V. album*. Die tumorhemmende Wirkung der dabei isolierten Endfraktion ist jedoch lediglich mit derjenigen unseres Ausgangsextraktes vergleichbar. WATANABE et al.<sup>4</sup> gelang es dagegen vor kurzem, ein Protein aus *Flammulina velutipes* zu isolieren, dessen cancerostatische Wirkung bereits in die Größenordnung unserer Stufe [3] (Figur 1) fällt. Wir wollen mit diesem Beitrag den vorläufigen Stand unserer eigenen Arbeiten mitteilen. Der in Figur 1 schematisierte

Aufarbeitungsgang<sup>5</sup> erlaubt es, die biologische Aktivität des schonend gewonnenen Pflanzenextraktes<sup>6</sup>, einer ED<sub>50</sub> von 0,3 mg/kg, auf das 150fache anzureichern (Tabelle).

<sup>1</sup> O. S. SELAWRY, F. VESTER, W. MAI und M. SCHWARTZ, *Hoppe Seyler's Z.* 324, 262 (1961).

<sup>2</sup> Hier sei auf eine Arbeit von W. B. COLEY hingewiesen (Trans. Am. Surg. Ass. 12, 183 (1894)), der bereits Ende des vorigen Jahrhunderts quasi als biologische Alternative zu den bislang bekannten synthetischen Zellgiften die Anwendung eines toxinhaltigen Extraktes von *Bacillus prodigiosus* zur Tumorbekämpfung empfahl.

<sup>3</sup> K. WINTERFELD, O. S. SELAWRY, M. GRUNTHAL und M. SCHWARTZ, *Arzneimittelforschung* 13, 29 (1963).

<sup>4</sup> Y. WATANABE, K. NAKANISHI, N. KOMATSU, T. SAKABE und H. TERAKAWA, *Bull. chem. Soc. Japan* 37, 747 (1964).

<sup>5</sup> F. VESTER, Patentschrift, Belg. 646095 v. 4. 4. 1963.

<sup>6</sup> F. VESTER und W. MAI, *Hoppe Seyler's Z.* 322, 273 (1960).

Ausbeute aus 1 l Preßsaft (150 g Trockengewicht) = 110 mg Fraktion I [8]. Wie später gezeigt wird (Figur 3) stellt jedoch auch die hier beschriebene Stufe [8] noch kein Endprodukt dar.

Die Anreicherung der wirksamen Komponenten wurde mit biologischen, chemischen und physikalischen Testmethoden verfolgt. Zur Untersuchung der biologischen Aktivität<sup>7</sup> wurde die Hemmwirkung auf das Crockersar-

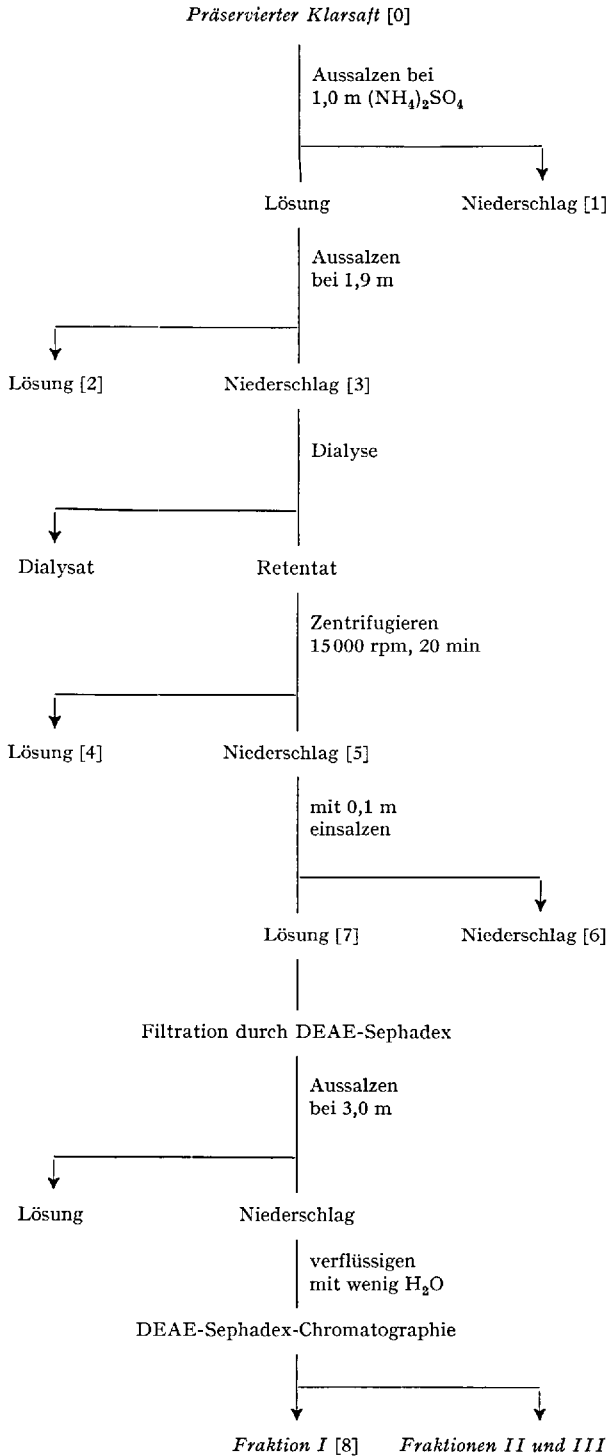


Fig. 1. Aufarbeitungsschema.

Anreicherung der biologischen Wirkung während der Aufarbeitung

Aufarbeitungsstufe (Figur 1)	ED <sub>50</sub> in mg/kg Maus i.p. <sup>a</sup>	Überlebende	ID <sub>50</sub> in µg/ml <sup>b</sup>
[0]	0,3	8/8	1,4
[1] <sup>c</sup>	1,0	10/12	5,0
[2] <sup>c</sup>	1,0	12/12	30,0
[3]	0,07	34/36	0,25
[4] <sup>e</sup>	0,05	6/16	10,0
[5]	0,02	12/12	0,03
[6] <sup>e</sup>	0,2	5/6	0,1
[7]	0,015	16/18	0,03
[8]	0,002	6/8	–

<sup>a</sup> Effektive Dosis für 50%ige Wachstumshemmung des Crocker-sarkoms 180 der Maus gegenüber Kontrolltieren.

<sup>b</sup> Inhibitionsdosis für 50%ige Zellkulturhemmung (HeLa).

<sup>c</sup> Aus dem Aufarbeitungsgang entfernte Fraktionen.

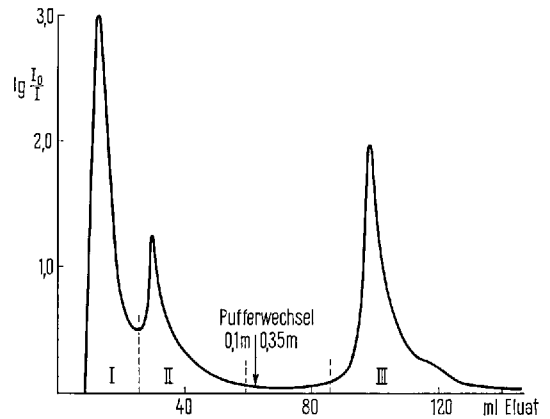


Fig. 2. Elutionsdiagramm der DEAE-Sephadexchromatographie. Die dem ersten Maximum entsprechende Fraktion ist cancerostatisch hochaktiv.

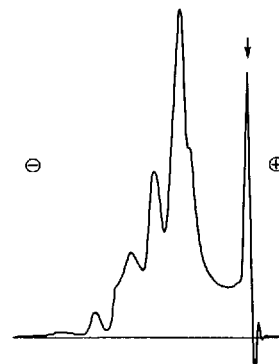


Fig. 3. AEP-Kurvenbild von Stufe [8] mit erhöhter Auflösung. Menge: 65 µg. Bedingungen: 120 min bei 250 V, pH 8,6. Anfärbung: Amidoschwarz. ↓ = Startlinie.

<sup>7</sup> Die Durchführung der sehr umfangreichen biologischen Tests verdanken wir dem Arbeitskreis von O. S. SELAWRY, Buffalo (USA) und von P. LOUSTALOT, Ciba Aktiengesellschaft, Basel (Schweiz).

kom 180 der Maus und auf Zellkulturen von Amnion- und HeLa-Zellen herangezogen, sowie die immunogene Wirkung im Kaninchen und Meerschweinchen<sup>8</sup> und die Verwendung entsprechender Antiseren<sup>9</sup>.

Zur Prüfung auf Einheitlichkeit und zur Identifizierung der wirksamen Fraktionen während der Aufarbeitung sind papierelektrophoretische Methoden unbrauchbar. Die sehr empfindlichen Proteine werden zum Teil irreversibel am Startpunkt adsorbiert. Stärkegel-Oberflächen-elektrophorese zeigt diesen Nachteil nicht, erfordert jedoch zu einer deutlichen Anfärbung relativ viel Substanz, vor allem, da am Protein gebundene Kohlehydrate in gewissen Fällen die typische Proteinfärbung kaschieren können. Das beste Auflösungsvermögen (mehrere scharfe Banden) zeigte bisher die Horizontal-Elektrophorese auf Acetatfolien (AEP)<sup>10</sup>, bei der die erforderliche Substanzmenge unter 100 µg liegt. Darüberhinaus gaben sowohl die charakteristischen Sephadex-Elutionskurven (Figur 2) als auch quantitative Aminosäureanalysen weitere Hinweise auf Anreicherungsgrad und Menge an gesuchter Substanz.

Beschreibung des aktiven Proteinkomplexes [8]. Die isolierte Fraktion I [8] ist von hellbrauner bis hellbeiger Farbe. Sie ist in Wasser schwer löslich. In 0,1–0,5 m Natriumacetatpuffer vom pH 5,5 ist sie bis zu Konzentrationen von 0,7% direkt löslich. Durch Anreiben mit wenig Wasser und anschließendes vorsichtiges Verdünnen («Verflüssigung») erreicht man jedoch Konzentrationen bis zu 67% (!). In Lösung beginnt die wirksame Komponente bereits durch zehnminütige Temperatureinwirkung bei 45°C zu denaturieren und teilweise auszuflocken. Der Vorgang ist mit einem raschen Wirkungsverlust verbunden.

Die Elementaranalyse ergab die Zusammensetzung: C 51,40%, H 7,07%, N 14,93%. Der bei der Radikalhydrolyse mit 6*n* HCl (24 h, 105°) anfallende schwarze Rückstand (Kohlehydrate) betrug 11,3%. Der Proteinanteil enthält 16,8% basische Aminosäuren mit Arginin als Hauptkomponente, eine Tendenz, die sich bereits in dem 36prozentigen Argininanteil bei den freien Aminosäuren des Preßsaftes zeigte<sup>6</sup>. Neben dem Verhalten bei der Sephadexchromatographie (Molekularsiebeffekt) deutet auch der Sedimentationskoeffizient der Hauptkomponente  $s = 6 \cdot 10^{-13}$  auf ein höheres Molekulargewicht hin<sup>11</sup>.

Die AEP des aktiven Komplexes (Figur 3) zeigt deutlich die einzelnen in ihren Eigenschaften sehr ähnlichen basischen Protein- bzw. Glycoproteinkomponenten. Erst bei pH-Werten über 11,2 beginnen die ersten Banden zur Anode zu laufen. Stickstoffgehalt, Aminosäureanalyse und elektrophoretisches Verhalten sprechen also für eine relativ hohe Basizität des Gesamtkomplexes.

Neben Tumorwirksamkeit und Toxizität (Tabelle) zeigt die Stufe [8] eine starke antigene Wirkung. Dosen von 10 µg pro Kaninchen genügen für eine gute Antikörperbildung. Antiserum vermag noch bei 500facher Verdünnung 3 Letaldosen/ml zu neutralisieren (= 1500 antitoxische Einheiten pro ml). Die Immunität kann passiv durch Antiserum übertragen werden<sup>8</sup>.

Aus der Mistel gewonnene Peptide wie Viscotoxin<sup>12</sup> oder das oben erwähnte, von WINTERFELD<sup>3</sup> isolierte Peptid mögen ursprünglich mit unserer hochaktiven Komponente in Beziehung gestanden haben und als Rudimente daher noch Spuren der ursprünglichen Aktivität aufweisen.

Bei Untersuchungen über den noch unbekanntem Wirkungsmechanismus ist auf Grund der möglichen Rolle der Tertiärstruktur (hierfür sprechen der Wirkungsverlust durch Denaturierung und das immunologische Verhalten), weiterhin auf Grund des basischen Charakters unserer Substanz (der Assoziationen mit Nukleinsäuren ermöglicht) und nicht zuletzt in Anbetracht der hohen Wirkung kleinster Dosen auch an eine Steuerung fehlgeleiteter Zellfunktionen durch Einschalten in den nuclearen Informationsmechanismus zu denken<sup>13,14</sup>.

*Summary.* A protein fraction of *Viscum album*, possessing marked anti-tumour activity in the experimental animal, is described. The isolation procedure and some physical and chemical properties are presented.

F. VESTER und J. NIENHAUS

*Institut für organische Chemie der Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe für Proteinforschung, Saarbrücken (Saar, Deutschland), 12. Januar 1965.*

<sup>6</sup> Für die immunologischen Untersuchungen und die Herstellung verschiedener Antiseren sind wir R. JACQUES, Ciba Aktiengesellschaft, Basel, sehr verbunden.

<sup>9</sup> B. v. BOROS, Saarbrücken, danken wir für die Herstellung von Kaninchenantiserum.

<sup>10</sup> Zu diesen Untersuchungen wurde eine von H. MAJER, Ciba Aktiengesellschaft, Basel, ausgearbeitete Elektrophoresetechnik übernommen. Verwendet wurden Membranfolien der Fa. Schleicher und Schüll.

<sup>11</sup> Für die UZ-Analysen danken wir H. MAJER, Ciba Aktiengesellschaft, Basel.

<sup>12</sup> K. WINTERFELD, Naturwiss. 42, 487 (1955). – G. SAMUELSSON, Svensk Farm. Tidsk. 65, 209 (1961).

<sup>13</sup> F. VESTER, Proc. Intern. Congr. Biochem. 6th, New York, 241 (1964); Biochim biophys. Acta, im Druck (1965).

<sup>14</sup> Der Firma Ciba Aktiengesellschaft, Basel, sind wir für die großzügige Förderung dieser Arbeiten zu grossem Dank verpflichtet. Besonders den Herren Dr. J. M. MÜLLER und Dr. H. MAJER danken wir für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

### A New Pseudoabnormal Hemoglobin in Hemolytic Anemias

A hitherto unknown, fast-moving hemoglobin was observed for the first time in a case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

*Case 1.* A 29-year-old female with PNH had a normal hemoglobin pattern, except for a slight increase in Hb F: Hb F 2.1% (norm. < 0.8%), Hb A<sub>2</sub> 1.9%, the remaining Hb being A<sub>1</sub>. The activities of the red cell glucose-6-

phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, glutathione reductase and the amount of reduced glutathione were in the normal range. At the time of every hemolytic crisis starch block electrophoresis (pH 8.6) with subsequent benzidine staining showed no abnormal hemoglobin in the hemolysate of washed erythrocytes; in plasma, however, 3 Hb fractions were present: normal free Hb A<sub>1</sub>, methemalbumin, and a hemoglobin moving slightly faster than Hb A<sub>1</sub> (Figure). The hemolytic urine contained predominantly this fast-moving component and only