

Papierelektrophoretische Untersuchungen an radioaktiv markierten Gewebekulturen.

I. Mitteilung: Der Nährboden.

Von

H. Schönfellingner, E. Broda und L. Stockinger.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium und dem
Histologisch-embryologischen Institut der Universität Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 26. Februar 1955.)

Zur Herstellung von Deckglaskulturen aus embryonalem Hühnergewebe oder anderen Gewebsarten werden Hühnerplasma und Hühnerembryonalextrakt als Kulturmedien verwendet. Diese beiden Komponenten des Nährbodens wurden papierelektrophoretisch untersucht. Auch das Verhalten von Glukose, einem Zusatz zum Medium, bei der Papierelektrophorese wurde studiert. Bei Verwendung von Radioglukose, also bei größter Empfindlichkeit des Nachweises, konnten geringe Mengen des Zuckers auf dem ganzen Papierstreifen gefunden werden. Wird Hühnerserum mit Radioglukose versetzt und sofort untersucht, dann führten die Proteine keinen Radiokohlenstoff über das Pherogramm mit. Nach dreitägiger Bebrütung des Kulturmediums bei 37° C dagegen wiesen die Banden des γ -Globulins und des Albumins Radioaktivität auf.

Einleitung.

Durch die Verwendung radioaktiver, am Kohlenstoff markierter Zucker¹ ist es gelungen, Stoffwechseluntersuchungen an einzelnen Gewebekulturen tierischen Ursprungs durchzuführen^{2, 3, 4}. Im Zuge dieser

¹ L. Sverak, O. Suschny und E. Broda, Mh. Chem. 84, 931 (1953).

² O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, H. Bilek, O. Feldstein, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. 83, 1091 (1952).

³ L. Stockinger, H. Enzl, E. Broda, L. Sverak und O. Suschny, Mh. Chem. 85, 327 (1954).

⁴ L. Sverak, O. Suschny, G. Manner, E. Broda, R. Stark, L. Stockinger und H. Enzl, Mh. Chem. 86, 124 (1955).

Untersuchungen sollen auch einzelne Proteine aus den Gewebekulturen auf ihre Radioaktivität geprüft werden.

Die gegebene Methode zur Trennung geringer Mengen von Proteinen ist die Papierelektrophorese. Da jedoch schon der Nährboden⁵ allein beim Bebrüten eine gewisse Stoffwechsellaktivität aufweist⁴, erschien es angezeigt, vor der Untersuchung der Kulturen das Verhalten des Nährbodens zu studieren. Dies ist um so wichtiger, als eine Trennung von Kultur und Nährboden äußerst schwierig ist.

Es waren also die Elektropherogramme der einzelnen Komponenten des Nährbodens — Embryonaleextrakt und Hühnchenplasma — aufzunehmen. Auch war zu prüfen, wie sich der Zucker (Glukose) bei der Papierelektrophorese verhält, und ob er von Proteinen des Nährbodens — ohne oder mit Bebrütung — mitgeführt wird.

Material.

Gewinnung von Plasma und Serum.

Der Halsschlagader oder Flügelvene von Hähnchen im Alter von 6 bis 12 Monaten wurde Blut steril entnommen, in paraffinierte Röhrrchen fließen lassen, gekühlt und zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde abpipettiert und bei + 2° bis zur Verwendung aufbewahrt. Für die Serumgewinnung wurde das Blut in gewöhnlichen Zentrifugenröhrrchen bei Zimmertemperatur gerinnen lassen und das Serum vorsichtig abgehoben.

Gewinnung von Embryonaleextrakt.

Hühnerembryonen im Alter von 8 bis 10 Tagen wurden den Eiern steril entnommen, durch ein Sieb (144 Maschen/cm²) gepreßt und 15 Min. bei 7000 g zentrifugiert. Der schleimige, opaleszente Überstand wurde vorsichtig abgehoben und als konzentrierter Embryonaleextrakt (konz. EE.) bezeichnet. Wenn der Zentrifugenrückstand 2mal mit dem gleichen Volumen Ringerlösung aufgeschwemmt $\frac{1}{2}$ bis 1 Std. stehen gelassen, dann wieder zentrifugiert und die drei überstehenden Lösungen vereint wurden, ergab sich Ringer-Misch-Embryonaleextrakt (Misch-EE.), der für Routinearbeiten Verwendung findet.

Glukosebestimmung in Embryonaleextrakt und Plasma.

Das Eiweiß wurde nach *Kowarsky* mit Cadmiumsulfat gefällt und die reduzierenden Zucker mit Molybdänsäurereagens kolorimetrisch bestimmt⁶. Die Extinktion wurde mit der einer Verdünnungsreihe von Glukose verglichen. Der Glukosegehalt in konz. EE. ergab sich zu 0,42, in Misch-EE. zu 0,36 und in Plasma zu 2,4 mg/ml.

Herstellung radioaktiver Glukose.

Diese wurde durch Radio-Photosynthese mit grünen Blättern und nachfolgender Aufarbeitung mit Hilfe von Ionenaustauschern und Papier-

⁵ Betreffend Zusammensetzung siehe z. B.: *R. Parker*, *Methods of Tissue Cultures*. New York. 1950.

⁶ Siehe *J. Tillmanns* und *G. Ohnesorge*, *Praktikum der klinischen, chemi-*

chromatographie¹ dargestellt. Für die vorliegenden Untersuchungen konnte die hochradioaktive Glukose mit inaktiver Glukose verdünnt werden.

Methodik.

Papierelektrophorese.

Für die Auswahl des Elektrophoresegerätes waren folgende Gesichtspunkte maßgebend: Der Einbau des Radiokohlenstoffes kann in alle Bestandteile des Gewebes, also auch in lipoidlösliche Fraktionen, erfolgen. Wenn nun für die Papierelektrophorese Hochspannung (z. B. 50 V/cm) verwendet wird, muß der Streifen gekühlt werden. Die Kühlung kann durch Einbringen des Streifens in eine organische Flüssigkeit, z. B. Toluol⁷, oder durch Auflegen auf einen elektrisch isolierten, flachen Kühler mit hydrophobierter Auflagefläche⁸ erfolgen. Die Proteinbanden, die durch Anfärbung nachgewiesen werden, werden durch diese Behandlung nicht gestört; wohl ist aber zu befürchten, daß die eventuelle Radioaktivität von Lipoiden über den Streifen verschmiert wird, daher aktives Protein am falschen Platz vortäuschen kann, oder überhaupt verloren geht. Die in letzter Zeit entwickelte Verbesserung der Hochspannungspapierelektrophorese mit Luftkühlung durch Verwendung eines trapezförmigen Papieres⁹ konnte für unsere Zwecke leider nicht angewandt werden, da durch die große Papiermasse der Radiokohlenstoff allzusehr verdünnt worden wäre. So mußte mit niedriger Spannung und Luftkühlung auf einem Streifen mit konstanter, nicht allzu großer Breite gearbeitet werden.

Es wurde also die Anordnung nach *Grassmann, Hannig* und *Knedel*¹⁰ verwendet. Als Puffer wurde 0,1 n Veronal-Natrium benutzt, das mit 1 n Salzsäure auf pH = 8,6 gebracht wurde, als Papier Schleicher-Schüll 2043 a. Für die Elektroden wurde die Kombination Kupfer-Kupfersulfat (gesättigt) verwendet; die Trennung von den Puffergefäßen erfolgte durch Agar-Agar — Kaliumchlorid gefüllte Stromschlüssel. Die Laufzeit betrug 20 Stdn. Die Färbung erfolgte mit Amidoschwarz 10 B in 10%iger Essigsäure am Wasserbad bei 80° C¹¹. Die Elution des überschüssigen Farbstoffes wurde mit 5%iger Essigsäure bei erhöhter Temperatur durchgeführt¹¹. Anstatt die Waschflüssigkeit durch Umschütten zu wechseln, wurde das locker zusammengerollte Papier im Soxhlet

schen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden. Wien. 1950.

⁷ *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

⁸ *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 737 (1952).

⁹ *H. Michl*, Mh. Chem. **85**, 1251 (1954).

¹⁰ *W. Grassmann, K. Hannig* und *M. Knedel*, Dtsch. med. Wschr. **76**, 333 (1951).

¹¹ *Z. Pučar*, Z. physiol. Chem. **296**, 62 (1954).

¹² *B. Drevon*, Bull. soc. chim. biol. **36**, 921 (1954).

extrahiert. Wiederholte heiße Extraktion mit Methanol-Eisessig 95:5 ist ohne Einfluß auf das Verhältnis der Farbintensitäten der einzelnen Porteinbanden¹²; dies konnte nun auch für die heiße Extraktion mit 5%iger Essigsäure bestätigt werden. Die Auswertung der gefärbten Streifen erfolgte im Elphorgerät¹⁰. Es wurde jeweils ein Vergleichstreifen (Serum) mitlaufen gelassen.

Radioaktivitätsbestimmung.

Für jeden Versuch wurden 5 γ Glukose der spezifischen Aktivität $1,37 \cdot 10^8$ Zerfälle/min/mg eingesetzt. Am Papier erfolgte die Messung mit einem Fenster-Geiger-Zählrohr EW 3 H der Fa. Twentieth Century mit einer vorgeschalteten Schlitzblende von 3×23 mm. Teile des Pherogramms, wo die Radioaktivität für die Erfassung mit dem Fensterzählrohr zu schwach war, wurden in Querstreifen von 6 mm Breite geschnitten und naß verbrannt^{13, 14}. Die Radioaktivität wurde dann im Gas-Geiger-Zählrohr bestimmt^{15, 16}.

Das Gaszählrohr mißt mit etwa 85%, das Fensterzählrohr jedoch mit sehr viel geringerer Ausbeute. Zur Bestimmung der Ausbeute des Fensterzählrohres mit Schlitzblende wurde Radioglukose möglichst gleichmäßig auf ein Stück Papier aufgetragen. Das Papier wurde zuerst mit dem Fensterzählrohr — unter Verwendung der Schlitzblende — abgetastet, sodann in Streifen geschnitten und mit dem Gaszählrohr gemessen. So wurde die Fensterzählrohrausbeute unter unseren Bedingungen, also bei starker Selbstabsorption der Strahlung im Papier, zu 2,7% bestimmt.

Zum Vergleich der Aktivität mit der Lage von Eiweißkörpern wurde nicht nur der Parallelstreifen mit Serum laufen gelassen, sondern auch vor der Verbrennung ein Probestreifen von 4 mm Breite aus der ganzen Länge des Pherogramms in der Mitte herausgeschnitten und gefärbt.

Ergebnisse.

Glukose.

Glukose ist zwar kein Elektrolyt, wandert aber doch unter den Bedingungen der Papierelektrophorese. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist die Elektroosmose, die eine Wanderung in Richtung Kathode bedingt¹⁷. Einen weiteren Beitrag liefert der sogenannte „Sog“, der durch Verdunsten von Wasser vom warmen Papier und Nachfließen von Puffer

¹³ D. D. van Slyke und J. Folch, J. Biol. Chem. **136**, 509 (1940).

¹⁴ J. A. Thorn und Ping Shu, Canad. J. Chem. **29**, 558 (1951).

¹⁵ G. Rohringer und E. Broda, Z. Naturforsch. **8 b**, 159 (1953).

¹⁶ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. **58**, 634 (1954).

¹⁷ E. L. Durrum, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2943 (1950).

aus den Vorratsgefäßen entsteht¹⁸. Dadurch ergibt sich eine Abhängigkeit der Wanderungsstrecke vom Auftragungsort. Beispielsweise wurde beim Auftragen in der Streifenmitte eine Wanderung von 5,5 cm in

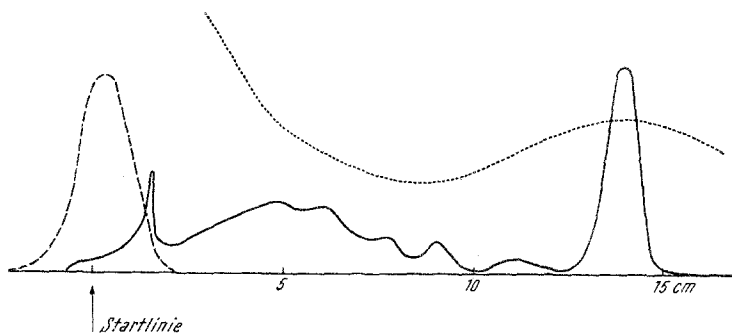


Abb. 1. Papierelektrophorese von Glukose. - - - Radioaktivität von Glukose (mit Fensterzählrohr); ····· Radioaktivität von Glukose (mit Gaszählrohr); ——— Extinktion von Hühnchenplasma (zum Vergleich, im Parallelstreifen).

Richtung Kathode, beim Auftragen 3 cm vom kathodischen Streifenende keine Wanderung oder eine solche von einigen Millimetern in Richtung Anode festgestellt. Diese Daten wurden durch Farbreaktion mit Anilin-Phthalat erhalten.

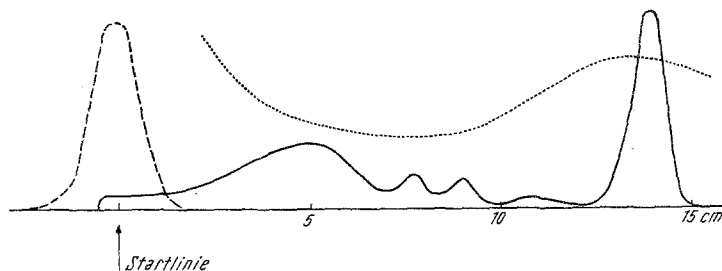


Abb. 2. Papierelektrophorese von Hühnchenserum mit Glukosezusatz. - - - Radioaktivität (mit Fensterzählrohr); ····· Radioaktivität (mit Gaszählrohr); ——— Extinktion (im Parallelstreifen).

Viel empfindlicher ist jedoch der Nachweis der Glukose durch die Radioaktivität, der mit Fenster- und Gaszählrohr durchgeführt wurde (Abb. 1). Das Maximum der Radioaktivität fällt mit dem Maximum der Farbreaktion zusammen, doch finden sich kleine Mengen Glukose im ganzen Papier. Daß im anodischen Teil größere Aktivität vorliegt, schreiben wir dem „Sog“ zu. Die über den ganzen Streifen verteilte

¹⁸ K. Slotta, S. Bril und A. Ballester, Z. physiol. Chem. 296, 141 (1954).

Radioaktivität ergibt bei der Elektrophorese von markiertem Eiweiß einen unerwünschten „Hintergrund“.

Hühnchenplasma.

Das Pherogramm (durch Extinktion; Abb. 1) stimmt am besten mit einem im *Tiselius*-Gerät an Hühnchenserum erhaltenen Pherogramm¹⁹ überein. Weitere, zum Teil abweichende Ergebnisse wurden von anderen Autoren^{20, 21, 22} erhalten. Die scharfe Zacke nahe der Startlinie rührt von vorzeitig geronnenem Fibrinogen her und wurde bei der Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

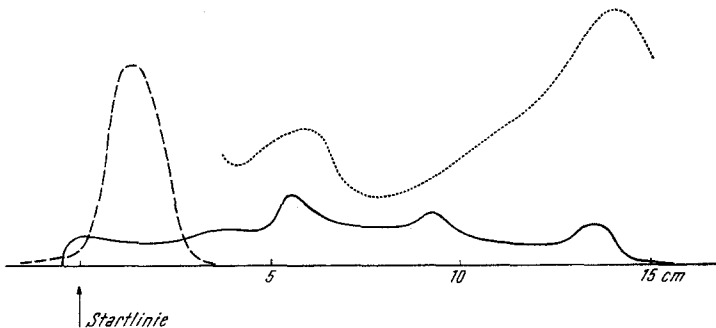


Abb. 3. Papierelektrophorese von Misch-Embryonalextrakt, mit Glukose bebrütet. — — — Radioaktivität (mit Fensterzählrohr); ····· Radioaktivität (mit Gaszählrohr); ——— Extinktion des konzentrierten Embryonalextrakts (im Parallelstreifen).

Embryonalextrakt.

Das Pherogramm (Extinktion) von konz. EE. zeigt drei schwache Maxima über einem kräftigen Hintergrund (Abb. 3). Misch-EE. ist zu verdünnt, um eine ordentliche Extinktionskurve zu geben.

Plasma mit Mischextrakt, bebrütet.

Durch die dreitägige Bebrütung wird das Fibrinogen zu völligem Gerinnen gebracht. Abgesehen davon, ist das Pherogramm (Abb. 4) mit dem des frischen Plasmas identisch. Der Misch-EE. liefert keinen merklichen Beitrag.

¹⁹ O. Armbruster, K. Munk und M. Wiedemann, Z. Naturforsch. 7 b, 619 (1952).

²⁰ P. Slizewicz und P. Atanasiu, Ann. Inst. Pasteur 85, 505 (1953).

²¹ R. H. Common, W. P. McKinley und W. A. Maw, Science 118, 86 (1953).

²² W. P. McKinley, W. F. Oliver, W. A. Maw und R. H. Common, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 346 (1953).

Serum mit Glukose, nicht bebrütet.

Es war zu prüfen, ob die Wanderung der Glukose durch die Anwesenheit von Serumprotein verändert wird. Die Prüfung wurde mit radioaktiver Glukose ausgeführt und ergab, daß die Radioaktivität in gleicher Weise wie ohne Serumzusatz über das Pherogramm verteilt war (Abb. 2). Daraus ist zu schließen, daß die Glukose vom Serumprotein nicht gebunden wird.

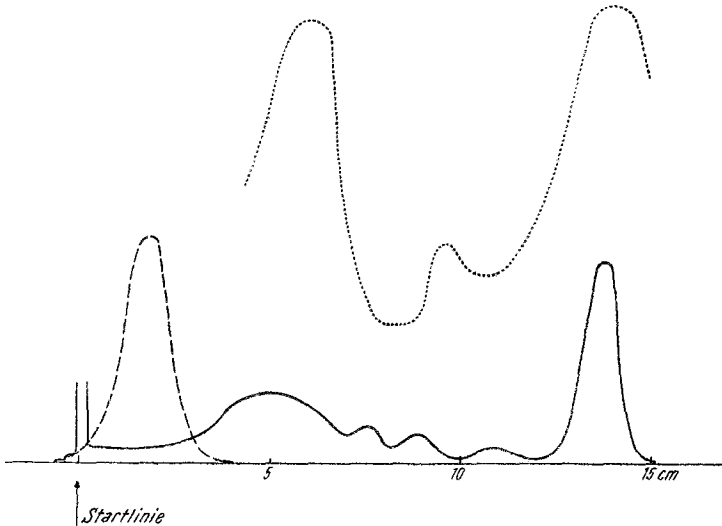


Abb. 4. Papierelektrophorese von Hühnenplasma, mit Misch-Embryonalextrakt und Glukose bebrütet. - - - Radioaktivität (mit Fensterzählrohr); ····· Radioaktivität (mit Gaszählrohr); ——— Extinktion von Plasma und Mischextrakt, bebrütet (im Parallelstreifen).

Glukose und Mischextrakt, drei Tage bebrütet.

Das Radiopherogramm zeigt, daß in diesem Falle Radioaktivität mitgeführt wird (Abb. 3), und zwar in die Lage der γ -Globulin- und der Albuminfraction.

Glukose, Mischextrakt und Plasma, drei Tage bebrütet.

Auch bei diesem Versuch wurde Radiokohlenstoff mitgeführt (Abb. 4), und zwar ebenfalls vorwiegend von der γ -Globulin- und der Albuminfraction. Eine Abschätzung der dem mitgeführten Radiokohlenstoff entsprechenden Zuckermenge ergibt sich folgendermaßen:

Eingesetzter Zucker: Misch-EE. 20 μ l	7,2 γ
Plasma 20 μ l	48 „
Radioglukose	5 „
Summe rund	60 γ

Eingesetzter Radiokohlenstoff.....	6,85 · 10 ⁵ Zerfälle/Min.
In der Albuminfraktion (5 Querstreifen)	1,2 · 10 ³ „
In der γ -Globulinfraktion (4 Querstreifen).....	1,0 · 10 ³ „

Die Aktivitäten der beiden Eiweißfraktionen wurden erhalten, indem von der Summe der Aktivität der einzelnen Querstreifen der Blindwert von „Glukose allein“ abgezogen wurde.

Demgemäß wurden in jeder der beiden aktiven Eiweißfraktionen je ein Fünftel Prozent des eingesetzten Radiokohlenstoffes gefunden, entsprechend etwa 0,1 bzw. 0,08 γ Glukose.

Über den Bindungszustand des mitgeführten Radiokohlenstoffes kann noch nichts ausgesagt werden. Es kann also nicht entschieden werden, ob während der Bebrütung eine Adsorption von Radioglukose an das Eiweiß oder ein chemischer Einbau von Radiokohlenstoff in das Eiweiß stattfindet.

Hingegen kann das Mengenverhältnis zwischen Eiweiß und mitgeführtem Radiokohlenstoff abgeschätzt werden. Die Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* zeigt, daß das Gesamteiweiß im Versuch gemäß Abb. 4 1070 γ betrug. Aus dem Flächenverhältnis der Maxima (unter Berücksichtigung der Extinktionskurven von Abb. 1 und Abb. 2) findet man unter der — nicht ganz exakten — Annahme der gleichmäßigen Anfärbbarkeit der verschiedenen Eiweißkörper, daß 31% (320 γ) Albumin und 26,5% (240 γ) γ -Globulin anwesend waren. Der vom Albumin und γ -Globulin mitgeführte Radiokohlenstoff entsprach also einer sehr geringen Menge Glukose: Das Gewichtsverhältnis betrug rund 3000 : 1.

Wir danken den Herren Professoren *L. Ebert* und *V. Patzelt* für ihr ständiges Interesse an dieser Arbeit, Herrn Dr. *H. Michl* für wertvolle Ratschläge, Herrn Dr. *H. Dressler* für die Erlaubnis zur Benützung des Elphor-Auswertegerätes und dem Damon-Runyon-Fonds für Krebsforschung für finanzielle Unterstützung. Herrn *R. Stark* danken wir für Mitarbeit bei der Bestimmung der Radioaktivität.

Eine einfache Herstellung der Piperonylsäure.

Von

A. Dobrowsky.

Aus der Technischen Hochschule in Wien.

(Eingelangt am 20. Januar 1955.)

Alkoxyderivate des Benzaldehyds können durch Wasserstoffperoxyd in einfacher Weise mit guten Ausbeuten zu den entsprechenden Karbon-