

Beitrag zur Untersuchung der Proteine aus rotem Kalbsknochenmark mittels Stärkegelelektrophorese*

Von

D. Koleff und T. Nikoloff

Aus dem Chemisch-Pharmazeutischen Forschungsinstitut, Sofia, und aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, Sofia (Bulgarien)

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 1. Oktober 1964)

Man machte Versuche zur Herstellung von Extrakten aus Proteinen des roten Knochenmarks, die für Stärkegelelektrophorese geeignet sind. Die besten Ergebnisse hatten wir bei der Extraktion mit 0,85proz. NaCl-Lösung nach Zerreiben des Markgewebes mit Quarzsand. Auch bei dieser Methode wurde die Gleichartigkeit zwischen den Eiweißfraktionen des roten Knochenmarks und denen des Blutserums bestätigt, indem gleichzeitig auch auf einige Unterschiede hingewiesen wurde. Bei Extraktion mittels 0,85proz. NaCl-Lösung wurde eine zusätzliche Fraktion bestimmt, die eine Elektrophoresebeweglichkeit zwischen den Serum-postalbuminen und den $F\alpha_2$ -Globulinen aufweist.

Experiments were carried out to prepare extracts of the proteins of red bone marrow in a form suitable for starch gel electrophoresis. The best results were obtained by grinding the tissue with quartz sand and extracting it with 0.85proc. NaCl solution. Although the protein fractions of red bone marrow and of blood serum proved to be very similar, a few differences could be noted. When 0.85proz. NaCl was used for the extraction, an additional fraction was found to occur which had an electrophoretic mobility less than the serum postalbumins and greater than the $F\alpha_2$ globulins.

Das rote Knochenmark ist eines der wichtigsten bluterzeugenden Organe des menschlichen und tierischen Organismus. Während die chemische Zusammensetzung der das Mark aufbauenden Lipide verhältnismäßig gut charakterisiert ist¹, sind die Angaben in der Literatur in bezug auf

* Herrn Prof. Dr. A. Boitschinoff zum 65. Geburtstag gewidmet.

¹ P. K. Lund, D. M. Abadi und J. C. Mathies, *Lipid Research* **3**, 95 (1962).

seine Proteinzusammensetzung nicht genügend ausführlich. Im Jahre 1910 untersuchte *Nerking*² zum ersten Mal ganz allgemein die Proteinzusammensetzung des Knochenmarks vom Rind. Später richteten *Fuchs* und *Priesel*³ ihre Aufmerksamkeit auf das Überwiegen der Globuline und Nukleoproteine im Knochenmark von Tieren, zusammen mit Spuren von Albuminen, Albuminosen u. a.

Die Schwierigkeiten bei der Auftrennung und der Charakterisierung der Proteine wurden weitgehend durch die Einführung der Elektrophoresemethoden überwunden. Mittels dieser Methoden wurde die Analogie zwischen den Proteinen des Blutserums und denen des Knochenmarks gezeigt. So betonten *Polosa* und Mitarb.⁴ die entscheidende Rolle des Knochenmarks bei der Plasmaproteingenesse mittels kombinierter Anwendung der Papierelektrophorese mit der Refraktometrie, indem sie quantitativ die Proteinfraktionen (Albumine, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline) des Blutserums mit denen des Knochenmarks von Menschen mit verschiedenen Erkrankungen verglichen. Ähnliche vergleichende Untersuchungen unter Benützung der Papierelektrophorese werden in einer Reihe von anderen Arbeiten⁵⁻⁷ gemacht.

Unter den zahlreichen Verschiedenartigkeiten der Elektrophoresemethoden verbreitete sich in der letzten Zeit die im Jahre 1955 von *Smithies*⁸ eingeführte Methode zur Auftrennung von Proteinen im Stärkengel.

Angesichts der großen Auftrennungsfähigkeit dieser Methode stellten wir uns die Aufgabe, die Proteine des roten Knochenmarks vom Kalb qualitativ zu charakterisieren.

Material und Methoden

Das rote Knochenmark wurde aus frischer Tibia von Kälbern gewonnen und sofort der Extraktion unterzogen. Letztere wurde nach sechs verschiedenen Methoden durchgeführt:

1. Extraktion mit 2proz. NaCl-Lösung

Rotes Knochenmark wurde mit 2proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 10:1 (Gew./Vol.) durch Zerreiben mit Quarzsand in 15 Min. im Mörser extrahiert.

² *J. Nerking*, *Biochem. Z.* **10**, 167 (1907).

³ *G. Fuchs* und *R. Priesel*, *Z. ges. exper. Med.* **61**, 539 (1928).

⁴ *P. Polosa*, *R. Curcio* und *L. Mota*, *Bull. soc. med. chir. Catania* **25**, 589 (1957); *Chem. Abstr.* **52**, 8349^d.

⁵ *W. Tangheroni* und *R. Bartalena*, *Minerva pediat.* **7**, 606 (1955); *Chem. Abstr.* **50**, 2803^d.

⁶ *R. Curletto*, *L. Cantoni*, *A. Villa*, *M. Ciconali*, *F. Pello* und *A. Falaschi*, *Haematol. latina* [Mailand] **1**, 61 (1958); *Chem. Abstr.* **53**, 6424^d.

⁷ *A. Agrest*, *C. Gomez*, *R. Barry*, *A. Poggio*, *S. Zingage* und *M. Russo*, *Medicina* [Buenos Aires] **18**, 205 (1958); *Chem. Abstr.* **53**, 15152^d.

⁸ *O. Smithies*, *Biochem. J.* **61**, 629 (1955); **71**, 585 (1959).

Der gewonnene Extrakt wurde durch Zentrifugieren (6000 U/Min.) abgetrennt.

2. *Extraktion mit 0,85proz. NaCl-Lösung*

Rotes Knochenmark wurde mit 0,85proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 10:1 (Gew./Vol.) wie oben extrahiert und das Extrakt zentrifugiert (6000 U/Min.).

3. *Extraktion mit Boratpuffer*

Rotes Knochenmark wurde mit Boratpuffer (pH = 8,8; $\mu = 0,028$) im Verhältnis 4:1 (Gew./Vol.) durch Zerreiben (15 Min.) im Mörser extrahiert. Das gewonnene Extrakt wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (6000 U/Min.).

4. *Extraktion mit Boratpuffer*

Rotes Knochenmark wurde mit Boratpuffer (pH = 8,8; $\mu = 0,028$) im Verhältnis 10:1 (Gew./Vol.) wie sub 3. extrahiert und das Extrakt zentrifugiert (6000 U/Min.).

5. *Extraktion mit 0,85proz. NaCl-Lösung mit nachfolgender Dialyse und Lyophilisation*

Rotes Knochenmark wurde mit 0,85proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 (Gew./Vol.) durch Zerreiben (15 Min.) im Mörser extrahiert. Das gewonnene Extrakt wurde durch Zentrifugieren abgetrennt (6000 U/Min.) und 24 Stdn. gegen fließendes Wasser (2—3° C) dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde lyophilisiert (Apparat Usifroid — Frankreich).

6. *Extraktion mit einem Gemisch aus gleichen Teilen 2proz. NaCl-Lösung und n-Butanol⁹*

Rotes Knochenmark wurde mit einem Gemisch aus gleichen Teilen 2proz. NaCl-Lösung und *n*-Butanol im Verhältnis 2:1 (Gew./Vol.) durch Zerreiben (15 Min.) im Mörser extrahiert. Das Butanol wurde beseitigt, indem man mehrmals an der Zentrifuge mit Äthyläther (der auch entfernt wurde) extrahierte.

Der Eiweißgehalt der durch diese verschiedenen Methoden (1—6) gewonnenen Extrakte wurde nach der Methode von *Lowry* und Mitarb.¹⁰ bestimmt.

Die gewonnenen Extrakte wurden einer vertikalen Elektrophorese nach der Methode *Smithies*⁸ (in der Modifizierung von *Nikoloff* und Mitarb.¹¹) unterzogen. Die Auftrennung wurde ausgeführt bei einer Stromstärke von 29 mA auf der ganzen Platte und 4,5 V/cm längs der Platte unter Verwendung von Boratpuffer (pH = 8,8; $\mu = 0,028$). Die Elektrophorese dauerte etwa 15 Stdn. Das Entwickeln der Proteine auf den Elektrophorogrammen erfolgte durch Färben mit Amidoschwarz 10B.

Die elektrophoretische Beweglichkeit der gewonnenen Fraktionen wurde mit der Beweglichkeit der Eiweißfraktionen aus Blutserum, das par-

⁹ *S. Kaplansky* und *S. Kusowlewa*, *Biokhimija* [Moskau] **22**, 162 (1957).

¹⁰ *H. Lowry*, *N. Rosebrough* und *F. Randa*, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

¹¹ *T. Nikoloff* und *P. Dilowsky*, unveröffentlicht.

allel einer Elektrophorese unterzogen wurde, verglichen. Die gewonnenen Elektrophorogramme der auf verschiedene Art extrahierten Proteine aus rotem Knochenmark vom Kalb mittels Stärkegelelektrophorese sind in Abb. 1—6 dargestellt; in Abb. 7 ist zum Vergleich das Elektrophogramm von Blutserum gegeben*.

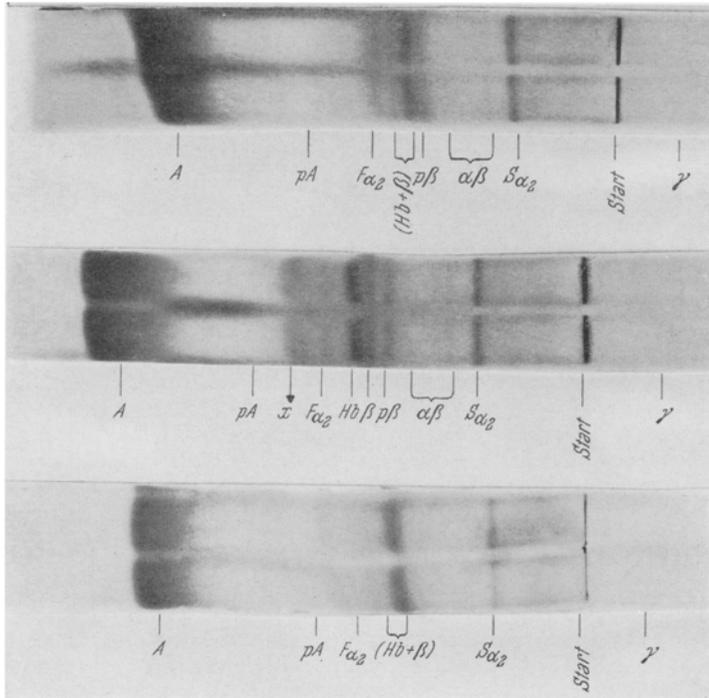


Abb. 1—3

Abb. 1. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: 2proz. NaCl-Lösung); Eiweißgehalt 0,90%

Abb. 2. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: 0,85proz. NaCl-Lösung); Eiweißgehalt 2,00%

Abb. 3. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: Boratpuffer 4:1); Eiweißgehalt 1,48%

Diskussion

Die gewonnenen Pherogramme der auf verschiedene Art extrahierten Proteine, die sowohl aus den Zellen des Knochenmarks als auch aus dem Knochenmarkserum stammen, bestätigen das Vorhandensein einer quali-

* Verwendete Abkürzungen:

A = Albumine, pA = Postalbumine, $F\alpha_2$ = schnelle α_2 -Globuline, β = β -Globuline, p β = Post- β -Globuline, $\alpha\beta$ = α - β -Globuline, $S\alpha_2$ = verzögerte α_2 -Globuline, γ = γ -Globuline, P_1P_2 = Präalbumine, Hb = Hämoglobin. x = s. Text, y = Fraktion, die bei zahlreichen Elektrophoresen des Blutserums auf Stärkegel in unserem Laboratorium gewonnen wurde.

tativen Analogie zwischen den Proteinen aus rotem Kalbsknochenmark und denen des Blutserums. Gleichzeitig kann auf einige Verschiedenartigkeiten hingewiesen werden:

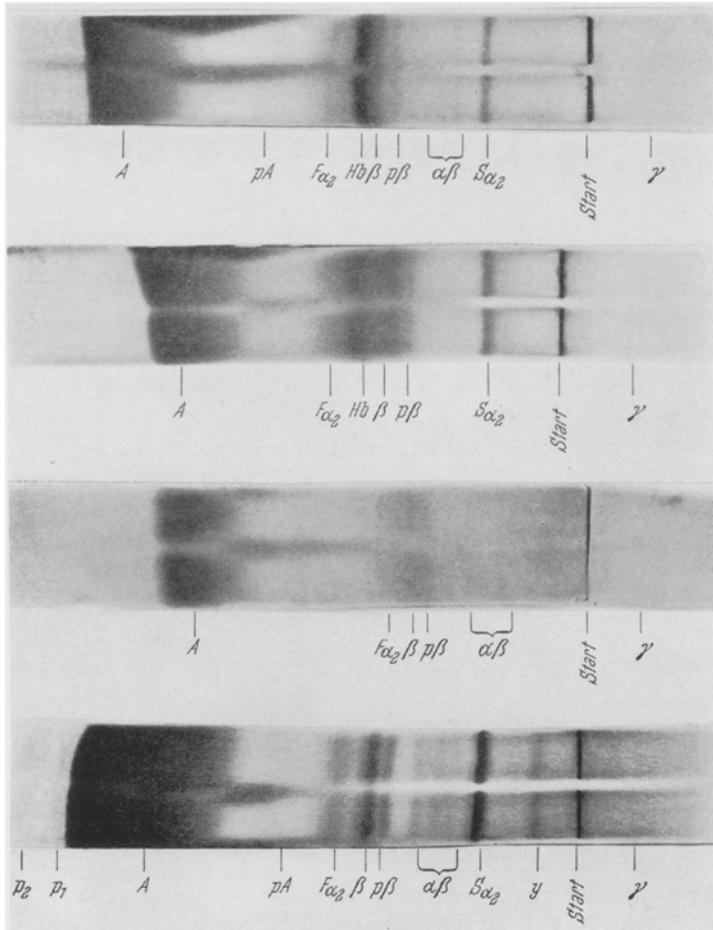


Abb. 4—7

Abb. 4. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: Boratpuffer, 10:1; Eiweißgehalt 2,50 %)

Abb. 5. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: 0,85proz. NaCl-Lösung).

Das Extrakt wurde dialysiert u. lyophilisiert. Eiweißgehalt 2,60 %

Abb. 6. Stärkegelelektrophorese eines Extrakts aus rotem Knochenmark (Extraktionsmittel: ein Gemisch aus gleichen Teilen 2proz. NaCl-Lösung und *n*-Butanol); Eiweißgehalt 0,93 %

Abb. 7. Stärkegelelektrophorese eines Blutserums (zum Vergleich)

a) Das Fehlen von präalbuminen Fraktionen.

b) Geringfügige Mengen von Proteinen (auf den Abb. schwer sichtbar) mit der Beweglichkeit der Serum- γ -Globuline. Diese Tatsache zeigt den

relativ kleinen Anteil der Serumproteine in den gewonnenen Knochenmarkextrakten.

c) Proteine mit der Beweglichkeit der Serum-Haptoglobulinfraktionen sind in kleineren Mengen vorhanden und sind nicht so klar differenziert wie im Blutserum.

d) Die Extrakte (mit Ausnahme des Extraktes, der durch Extraktion mit gleichen Teilen 2proz. NaCl-Lösung und *n*-Butanol gewonnen wurde (Abb. 6) enthalten eine Hämoglobinfraktion, die eine etwas größere Beweglichkeit aufweist, die aber sehr nahe an die der Serum- β -Globuline herankommt.

e) Bei Verwendung einer 0,85proz. NaCl-Lösung als Extraktionsmittel wird eine scharf ausgeprägte zusätzliche Fraktion identifiziert, deren Beweglichkeit zwischen den Serumpostalbuminen und dem $F\alpha_2$ -Globulin liegt (in Abb. 2 mit einem Pfeil bezeichnet).

Aus den Abb. ist die ungleiche Rolle und Bedeutung der Extraktionsmittel ersichtlich, die von uns bei den verschiedenen Methoden der Extraktion benützt worden sind.

Das beste Ergebnis haben wir mit 0,85proz. NaCl-Lösung (Abb. 2) erhalten. Das Pherogramm zeigte die größte Anzahl und die am schärfsten differenzierten Proteinfractionen sowie eine neue zusätzliche, für das Blutserum nicht typische Fraktion, wie oben erwähnt.

Des großen Reichtums an Lipiden wegen erwies sich die Methode der Homogenisierung des Gewebes mit einem Homogenisator als unbequem. Dies zwang uns, eine Extraktion mittels Zerreiben des Knochenmarkgewebes im Mörser anzuwenden. Der Vorgang der Extraktion der Proteine aus dem Gewebe wurde wesentlich verbessert, indem man Quarzsand zum leichten Zerreiben und Zerreißen der Zellen benützte; darauf wurde bei der Verwendung von Boratpuffer als Extraktionsmittel hingewiesen (Methode 4, 3).

a) Der Eiweißgehalt der gewonnenen Extrakte nach Methode 4 (2,50%) ist höher als der nach Methode 3 (1,43%), obwohl das Verhältnis Gewebe/Lösungsmittel bei der Methode 4 (1:10) größer ist (1:4 bei Methode 3).

b) Das Differenzieren der einzelnen Fraktionen auf dem Pherogramm ist vollkommener und klarer (vgl. Abb. 3 mit Abb. 4). Mittels beider Verfahren wurden verhältnismäßig konzentrierte Eiweißlösungen mit hohem Gehalt an Hämoglobinfraktion gewonnen. Letztere ist im Verfahren 4 besser ausgeprägt.

Ein nicht besonders gutes Pherogramm entstand bei der Verwendung von 0,85proz. NaCl-Lösung als Extraktionsmittel mit nachfolgender Dialyse und Lyophilisation (Abb. 5). Einige der entwickelten Fraktionen

(Hämoglobin, $S\alpha_2$ -Globulin) sind bedeutend erweitert; auch fehlen einige der Fraktionen, die bei den anderen Methoden auftreten (Postalbumine, Haptoglobuline).

Während das Extraktionsmittel aus gleichen Teilen 2proz. NaCl-Lösung und *n*-Butanol beim Extrahieren anderer Organe erfolgreich verwendet wird⁹, erwies es sich beim Extrahieren des Knochenmarks als wenig geeignet. Das gewonnene Extrakt war arm an Eiweiß (0,93%) und die gewonnenen Pherogramme (Abb. 6) enthielten eine kleine Anzahl Fraktionen. Es fehlten die Hämoglobin- und $F\alpha_2$ -Globulinfraktion.