

Über die Auftrennung von Ferritin

Von

H. Paschinger und B. J. Radola

Institut für physikalische Chemie der Universität Wien

Mit 9 Abbildungen

(Eingegangen am 14. April 1967)

Die Anwendung verschiedener Fraktionierverfahren zeigt, daß die bei der Gelelektrophorese in Polyacrylamid gefundenen Ferritin-Komponenten sich auch bezüglich der Löslichkeit, der chromatographischen Eigenschaften und des Verhaltens bei der Gelfiltration auf Sephadex G-200 unterscheiden. Das Ferritin wurde mit Ferrocyanid oder — nach Austausch mit ^{59}Fe — durch die Aktivität identifiziert. Bei der Extraktion eines Niederschlages von Ferritin mit Ammoniumsulfatlösungen fallender Molarität war das α -Ferritin über den ganzen Extraktionsbereich verteilt. Die β -, γ - und δ -Ferritine wurden in zunehmender Menge mit Lösungen fallender Molarität extrahiert.

Es wurden Unterschiede in der Extraktion von Ferritin verschiedenen Ursprungs (Pferd, Rind, Mensch) festgestellt. Bei der Chromatographie von Ferritin auf DEAE-Cellulose wurden mehrere Peaks erhalten. Bei der Papierelektrophorese wanderte das Ferritin verschiedener chromatographischer Peaks mit identischer Beweglichkeit, während sich bei der Gelelektrophorese deutliche Unterschiede in der Verteilung der Ferritin-Komponenten dieser Peaks zeigten. Eine partielle Trennung der Ferritin-Komponenten konnte auch bei der Gelfiltration erreicht werden. Der aufsteigende Teil des einzigen Peaks enthielt die elektrophoretisch langsameren β -, γ - und δ -Ferritine, im absteigenden Teil des Peaks war das α -Ferritin lokalisiert. Dieses Ergebnis weist auf Unterschiede in der Molekülgröße der Komponenten hin.

The application of different fractionation procedures has shown that ferritin components separated by gel electrophoresis in polyacrylamide differ in respect to solubility and to behaviour in chromatography and gel filtration on Sephadex G-200. The

ferritin has been identified with ferrocyanid or—after exchange with ^{59}Fe —by its radiation. On extraction of a ferritin precipitate with solutions of ammonium sulphate of decreasing molarity α -ferritin was distributed over the whole extraction range. The slower β -, γ - und δ -ferritins appeared in increasing amounts in solutions of decreasing molarities. Differences were observed in the extraction of ferritins of different origin (horse, beef, human). Chromatography of ferritin on DEAE cellulose gave several peaks. In paper electrophoresis, the mobility of the chromatographically different ferritins was the same. In gel electrophoresis, however, differences in the distribution of the ferritin components of these peaks were found. A partial separation of the different ferritin components was also obtained in gel filtration. The leading part of the only peak contained the β -, γ - and δ -components, while α -ferritin was found in the trailing part. This result may be ascribed to differences in the molecular sizes of the components.

Bei der Gel-Elektrophorese von Ferritin in Stärke und in Polyacrylamid wurde gefunden, daß es aus mehreren Bestandteilen (α , β , γ , manchmal auch δ und ϵ) besteht¹⁻³. Diese Bezeichnung gibt die Reihenfolge der elektrophoretischen Geschwindigkeit an. Auch das Apoferritin erwies sich als heterogen³⁻⁵. Auf Grund von Sedimentationsanalysen wird angenommen, daß Ferritin in aggregierter Form vorkommen kann^{6, 7}. Die Natur der Bindung in diesen Aggregaten ist unbekannt; es ist auch bisher nicht gelungen, diese Aggregate zu dissoziieren. Serologisch sind die elektrophoretisch unterschiedenen Ferritin-Komponenten identisch³.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von Ferritin bei Anwendung verschiedener Fraktionierverfahren verglichen. Drei Methoden wurden gewählt, die sich auf verschiedene Eigenschaften der Moleküle stützen: 1. Extraktion des Proteinniederschlages mit Ammoniumsulfatlösungen verschiedener Molarität, 2. Chromatographie auf DEAE-Cellulose, und 3. Gel-Filtration auf Sephadex G-200. Der Trenneffekt, der mit diesen verschiedenen Methoden erzielt wurde, wurde durch Elektrophorese in Polyacrylamid überprüft. Radioaktives Eisen (^{59}Fe) wurde öfters angewandt, um das Ferritin zu lokalisieren, wie dies bereits in Versuchen mit Ferritin aus Gewebekulturen getan wurde^{8, 9}.

¹ R. Kopp, A. Vogt und G. Maass, Nature **198**, 892 (1963).

² J. J. Theron, A. O. Hawtrey und V. Schirren, Clin. Chim. Acta **8**, 165 (1963).

³ G. W. Richter, Brit. J. Exper. Path. **45**, 88 (1964).

⁴ F. Carnevali und G. Tecce, Arch. Biochem. Biophys. **105**, 207 (1964).

⁵ R. Kopp, A. Vogt und G. Maass, Nature **202**, 1211 (1964).

⁶ A. A. Suran und H. Tarver, Arch. Biochem. Biophys. **111**, 399 (1965).

⁷ P. M. Harrison und D. W. Gregory, J. Mol. Biol. **14**, 626 (1965).

⁸ B. J. Radola, G. Kellner und S. J. Frimmel, Z. Krebsforsch. **68**, 42 (1966).

⁹ B. J. Radola und G. Kellner, in Vorbereitung.

Material und Methoden

1. Ferritinpräparate

Die meisten Versuche wurden mit Ferritin durchgeführt, das von uns aus Pferdemilz isoliert wurde. Daneben wurde auch kristallisiertes Pferdeferritin (2 x, Cd-frei) der Firma Serva, Heidelberg, verwendet. Apoferritinfreies Pferdeferritin wurde freundlicherweise von Dr. R. Kopp (Freiburg i. B.) zur Verfügung gestellt. Für einige Versuche wurde auch Ferritin aus menschlicher Milz oder Rindermilz gewonnen.

2. Extraktion mit Ammoniumsulfat-Lösungen

Die Isolierung von Ferritin wurde in den ersten Stufen nach der Methode von Granick¹⁰ vorgenommen. Nach dem Erhitzen auf 80° C und anschließender Filtration wurde zu dem Milzextrakt Ammoniumsulfat (30 g/100 ml) hinzugefügt. Der erhaltene Niederschlag wurde gesammelt und in Wasser aufgelöst, die 3—5fache Menge des Gewichtes des feuchten Niederschlages an Cellulose-Pulver (Schleicher & Schüll Nr. 123) wurde zu dieser Lösung zugegeben und das Ferritin durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur Konzentration 2,5*m* erneut ausgefällt. Cellulose wurde anstatt Kieselgur als inerte Träger verwendet, da sie schnelleren Durchfluß ermöglicht. Die Suspension wurde entlüftet und in eine Säule (3 cm \varnothing) bis zu einer Höhe von 15 cm gefüllt. Anschließend wurde mit einer Reihe von Ammoniumsulfat-Lösungen fallender Molarität eluiert, und zwar entsprechend das Volumen jeder Lösung dem 3—5fachen Säulenvolumen. Gesammelt wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 8 ml/10 min. Fraktionen zu 8 ml.

3. DEAE-Chromatographie

Die DEAE-Cellulose (Diäthylaminoäthylcellulose, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde mit 0,3*m*-NaOH, 0,3*m*-HCl und 0,3*m*-Phosphatpuffer (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄, pH 7,2) gewaschen und mit 0,01*m*-Phosphatpuffer (pH 7,2) ins Gleichgewicht gebracht. Für präparative Trennungen wurden Säulen mit 1,8 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 18 cm, für analytische Trennungen Säulen mit 0,7 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 10 cm geladen. Alle Ferritin-Lösungen wurden, bevor sie auf die Säule aufgetragen wurden, gegen 0,01*m*-Phosphatpuffer (pH 7,2) dialysiert. Eluiert wurde stufenweise mit einer Reihe von Phosphatpuffern mit konstantem pH-Wert (7,2), aber steigender Molarität. Die Extinktion im Eluat wurde bei präparativer Auftrennung bei 280 $m\mu$ und bei analytischer Auftrennung bei 210 $m\mu$ ^{8, 11} gemessen. Bei markierten Präparaten wurde die Radioaktivität mit einem Gamma-Szintillations-Spektrometer mit Bohrlochkristall im Bereich von 960 keV aufwärts gemessen.

4. Gel-Filtration

Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) wurde in 0,15*m*-NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,02*m*-Phosphatpuffer (pH 7,3—7,4) suspendiert. Nach einigen Tagen wurden Säulen von 1 cm Durchmesser bis zu 50 cm Höhe geladen. Auf-

¹⁰ S. Granick, J. Biol. Chem. **146**, 451 (1942).

¹¹ M. P. Tombs, F. Souter und N. F. MacLagan, Biochem. J. **73**, 167 (1959).

getragen wurden 0,4—0,6 ml einer Ferritinlösung. Eluiert wurde mit 0,15 *m*-NaCl-Lösung, die 0,02 *m* Phosphatpuffer (pH 7,3—7,4) enthielt. Gesammelt wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/10 min. Fraktionen zu 0,5 ml.

5. Gel- und Papier-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese in Polyacrylamid wurde in wesentlichen nach der Methode von *Ornstein* durchgeführt^{12, 13}. Die Gelröhrchen maßen 6 × 0,5 cm. Es wurde nur eine Gelschicht (600 mg Cyanogum 41 der Firma E. C. Apparatus Comp., Swarthmore [Pa.], auf 10 ml Puffer) mit *Tris*—Borsäure-Puffer (pH 9) verwendet.

Konzentrierte Ferritinlösungen wurden nicht einpolymerisiert, sondern auf die Oberfläche des Gels aufgetragen. Nach einer Stunde wurde das nicht eindiffundierte Ferritin gewaschen. Größere Mengen verd. Lösungen (bis zu 1 ml) wurden auf dem Gel mit Sephadex G-25 stabilisiert und anschließend durch Elektrophorese in das Gel eingeführt. Es bildete sich dabei zunächst an der obersten Gelschicht eine scharfe Startzone, wonach das Sephadex G-25-Gel entfernt wurde. Die Auftrennungen erfolgten bei einer Stromstärke von 1—1,5 mA pro Röhrchen in 60—90 Min.

Das Ferritin wurde mit 0,1proz. K₄Fe(CN)₆-Lösung in 0,1 *m*-HCl angefärbt. Anschließend wurde das Gel mit 5proz. Essigsäure durchgewaschen. In einigen Versuchen erfolgte dazu parallel in anderen Röhrchen die Proteinanfärbung mit Amidoschwarz 10 B in 5proz. Essigsäure mit nachfolgendem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit ebenfalls 5proz. Essigsäure.

Die Papierelektrophorese wurde in einem Apparat mit horizontaler Aufhängung der Streifen auf Papier von Whatman (No. 1) in *Michaelis*-Puffer (pH 9,0, $\mu = 0,1$) durchgeführt. Die Trennzeit war bei einem Spannungsgradienten von 3,8—3,9 V/cm 18—19 Std. Die Streifen wurden mit Amidoschwarz angefärbt.

Für die Aktivitätsmessung von markiertem Ferritin nach erfolgter Papierelektrophorese wurde ein 7 cm breiter Streifen der Länge nach in die Hälfte geteilt, die eine Hälfte wurde mit Amidoschwarz angefärbt, die andere in 1 cm breite Segmente geschnitten, die im Szintillations-Spektrometer ausgewertet wurden.

Ergebnisse

Bei der fraktionierten Extraktion von Rohferritin aus Pferdemilz zeigten sich mit 1,1- und 0,8 *m*-Ammoniumsulfat-Lösung zwei Hauptpeaks (Abb. 1). Kleine Mengen von Ferritin erschienen auch in den Extrakten mit 1,4- und 0,5 *m*-Ammoniumsulfat und mit Wasser. Bei der Extraktion von Rohferritin aus menschlicher Milz wurde eine ähnliche Verteilung festgestellt, jedoch konnten bereits mit 1,4 *m*-Ammoniumsulfat beträchtliche Mengen extrahiert werden. Rinderferritin dagegen zeigte bei der Extraktion nur einen deutlichen Peak, nämlich mit 0,8 *m*-Ammoniumsulfat, während bei anderen Konzentrationen nur geringe Mengen extrahiert wurden.

¹² L. *Ornstein*, Ann. New York Acad. Sci. **112**, 321 (1964).

¹³ H. *Michl* und A. *Pastuszyn*, Mikrochim. Acta [Wien] **1963**, 880.

Aus den Extrakten wurde das Ferritin durch Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration erneut ausgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und in Wasser gelöst. Nach Dialyse und Einengen durch Perva-

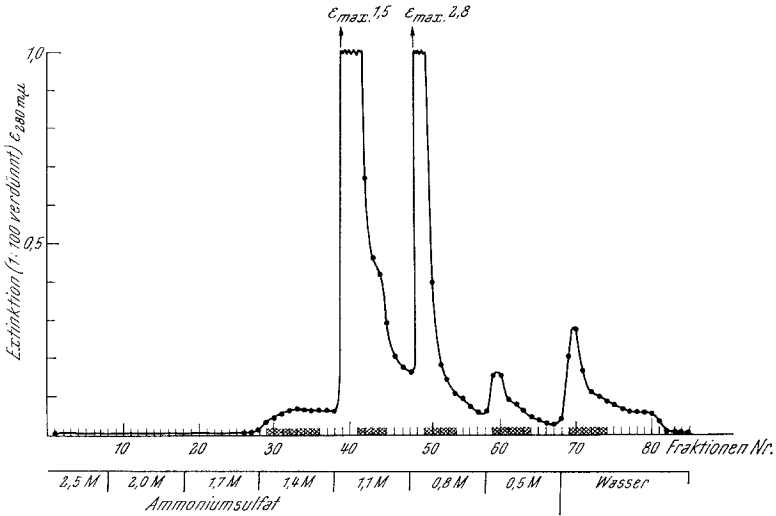


Abb. 1. Fraktionierte Extraktion von Rohferritin aus Pferdemilz. Die mit ||||| bezeichneten Fraktionen wurden für die weiteren Versuche verwendet; siehe Text

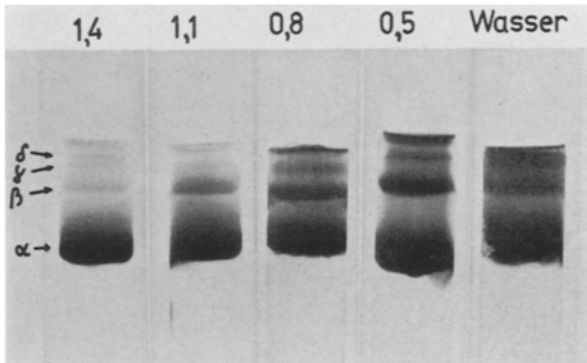


Abb. 2. Gelelektrophorese der Ammoniumsulfat-Extrakte von Pferdeferritin (s. Abb. 1) in Polyacrylamid. Angefärbt mit dem Ferrocyanid-Reagens

poration wurden die Proben durch Gelelektrophorese untersucht. Die einzelnen Extrakte (Pferdeferritin) zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung der Ferritin-Komponenten (Abb. 2). Der „1,4 m-Extrakt“ bestand aus α -Ferritin mit nur geringen Mengen der langsameren β - und

γ -Komponenten. Bei abnehmender Molarität der Ammoniumsulfat-Lösung nahm der Anteil dieser Komponenten zu. Der 0,8 *m*-Extrakt war deutlich an β - und γ -Ferritin angereichert. Das mit Wasser extrahierte Ferritin zeigte bei der Elektrophorese keine gut definierten Zonen, was vielleicht auf partielle Denaturierung zurückzuführen ist. Mit Amidoschwarz wurden in den 1,4 *m*- und 0,5 *m*-Extrakten sowie im Wasserextrakt neben Ferritin beachtliche Mengen von nicht eisenhaltigen Proteinen, die daher mit dem Ferrocyanid-Reagens nicht anfärbbar sind, nachgewiesen. In den 1,1 *m*- und 0,8 *m*-Extrakten waren dagegen neben dem Ferritin nur Spuren anderer Proteine enthalten.

Die 0,8 *m*-, 1,1 *m*- und 1,4 *m*-Extrakte wurden mit radioaktivem Eisen ($^{59}\text{Fe}^{\text{III}}$, 0,1—1 μC , spezif. Aktivität 3 mCi/mg Fe) in *Tris*-Puffer (0,01 *m*, pH 7,0) einige Stunden bei Zimmertemperatur behandelt. Die Proben wurden dann gegen 0,02 *m*-Phosphatpuffer dialysiert und durch Papier- und Gel-Elektrophorese in Polyacrylamid untersucht.

Bei der Papierelektrophorese waren mehr als 70% des Radioeisens innerhalb der Ferritinzone lokalisiert. Geringe Aktivitäten, die vermutlich durch Adsorption von Protein an Cellulose zu erklären sind, traten auch im Bereich zwischen der Ferritinzone und der Startlinie auf. Anorganische Eisenverbindungen bleiben bei dem hier verwendeten Puffer — offenbar als Kolloide — auf der Startlinie zurück, doch kann das Eisen durch Komplexierung (z. B. mit *EDTA*) mobilisiert werden. Das komplexierte Eisen wandert dann als gut definierte Bande schneller als Ferritin.

Bei der Gelelektrophorese wurde das radioaktive Ferritin zunächst mit dem Ferrocyanid-Reagens angefärbt. Danach wurde das Gel in 2 mm dicke Scheiben geschnitten, die im Szintillationszähler gemessen wurden. Die Verteilung der Aktivität stimmte weitgehend mit der Verteilung der Anfärbung überein (Abb. 3).

Dieses Ergebnis der Gelelektrophorese zeigt, daß in bezug auf die Austauschbarkeit des Eisens kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Ferritin-Komponenten besteht.

Auf DEAE-Cellulose konnte Pferdeferritin (Serva) in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden (Abb. 4). Bei der stufenweisen Elution wurde ein Hauptpeak beim 0,12 *m*-Phosphat-Puffer gefunden. Weitere Peaks zeigten sich bei 0,08-, bei 0,2- und 0,3 *m*-Puffer, dagegen nur geringe Mengen bei Puffern mit Molarität < 0,08.

Nach Inkubation von Ferritin mit Radioeisen vor der Auftrennung wurde bei der DEAE-Chromatographie im Bereich 0,08—0,3 *m* Aktivität festgestellt. Die Aktivitätskurve verlief bei den 0,12-, 0,2- und 0,3 *m*-Peaks parallel zur Absorptionskurve (280 $m\mu$) (Abb. 4). Im 0,08 *m*-Peak war Aktivität nur in der zweiten Hälfte des Protein-Peaks festzustellen, was auf die Anwesenheit von Begleitproteinen hinweist. Aus den einzelnen Peaks wurden jeweils 2—4 dem Maximum entsprechende Fraktionen

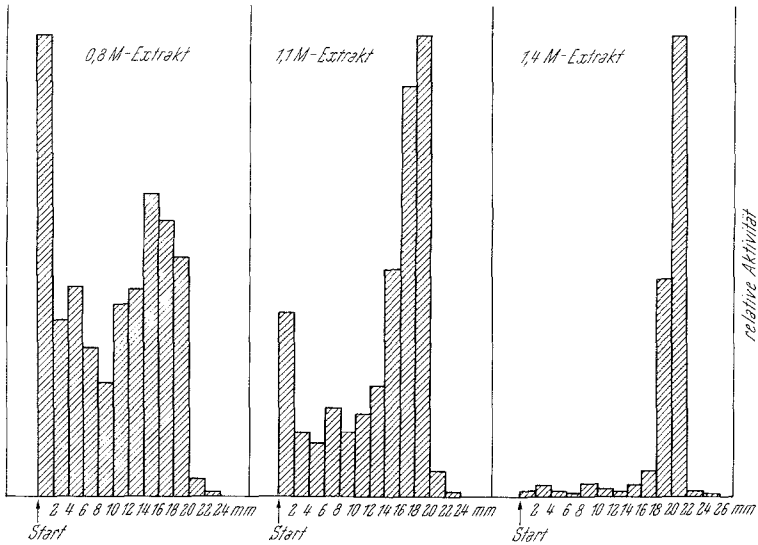


Abb. 3. Verteilung der Aktivität nach der Gelelektrophorese von Ammoniumsulfat-Extrakten aus Pferde ferritin (siehe Abb. 1) nach Markierung mit ^{59}Fe

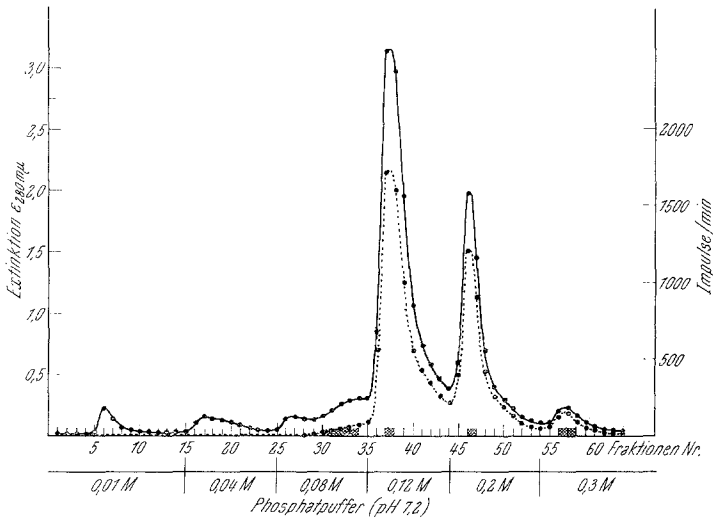


Abb. 4. DEAE-Chromatographie von krist. Pferde ferritin (Serva). — Extinktion bei 280 mμ; - - - Aktivität. Die mit [|||||] bezeichneten Fraktionen wurden für die Gelelektrophorese (Abb. 5) verwendet

isoliert, dialysiert und durch Pervaporation eingengt. Die aus den verschiedenen Peaks isolierten Ferritinfraktionen wanderten bei der Papierlektrophorese mit derselben Beweglichkeit. Die Aktivität ließ sich immer

als gut ausgeprägter Peak in der Ferritinzone nachweisen. Eine geringe Aktivität trat ähnlich wie bei unfraktioniertem Ferritin im Bereich zwischen Proteinzone und der Startlinie auf.

Dagegen zeigten sich bei der Gelelektrophorese der durch DEAE-Chromatographie isolierten Ferritinfraktionen (Abb. 4) deutliche Unterschiede in der Verteilung der Ferritin-Komponenten (Abb. 5). Der 0,08 *m*-Peak bestand nach Aussage der Gelelektrophorese nur aus α -Ferritin. Der 0,12 *m*-Peak wies neben α -Ferritin bereits Spuren an β -Ferritin auf. Mit

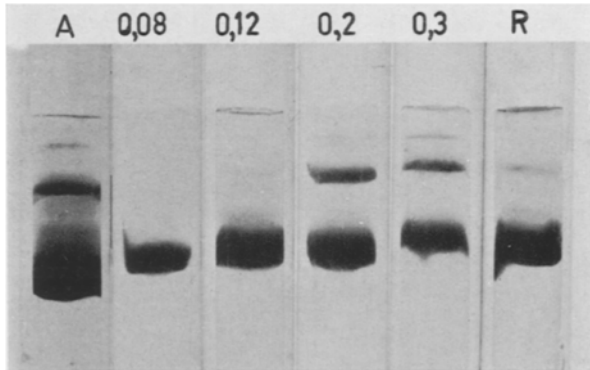


Abb. 5. Gelelektrophorese von DEAE-Chromatographie-Fractionen von krist. Pferdeferritin (Serva). A: Ausgangspräparat; R: Rechromatographie der 0,12 *m*-Fraktion, eluiert mit 0,12 *m*-Puffer. Angefärbt mit dem Ferrocyamid-Reagens

0,2 *m*-Puffer wurden neben α - zusätzlich β - und mit dem 0,3 *m*-Puffer β - und γ -Ferritin eluiert. Die geringen Mengen von β -Ferritin in der 0,12 *m*-Fraktion konnten durch Rechromatographie nicht entfernt werden (Abb. 5: R).

Auch apoferritinfreies Pferdeferritin und Ferritinfraktionen nach Extraktion mit Ammoniumsulfat aus Pferdemilz und Rindermilz wurden auf DEAE-Cellulose untersucht. Gewisse Unterschiede wurden gefunden. So zeigten die 1,1 *m*- und 0,8 *m*-Extrakte von Rohferritin aus Pferdemilz Unterschiede in den Absorptions- und Aktivitätskurven (Abb. 6a, b) sowohl untereinander als auch gegenüber dem kristallisierten Pferdeferritin (Abb. 4). Der Verlauf der Aktivitäts- und Absorptionskurven war jedoch auch hier parallel.

Rinderferritin (0,8 *m*-Ammoniumsulfat-Extrakt) wanderte bei der Papierelektrophorese langsamer als Pferdeferritin. Es zeigte im DEAE-Chromatogramm einen größeren Anteil von Fraktionen, die bei kleinerer Molarität des Puffers eluiert werden (Abb. 7) als die untersuchten Pferdeferritin-Präparate. Die Verteilung der Aktivität beweist, daß diese Frak-

tionen aus Ferritin bestanden. Mehr als ein Drittel der Aktivität wurde bereits bei der Molarität 0,1 eluiert.

Bei der Gelfiltration wurden krist. Ferritin und Ferritinfraktionen aus Pferdemilz und menschlicher Milz nach Extraktion mit Ammoniumsulfat untersucht. Stets wurde nur ein einziger Peak bei der Gel-Filtration ge-

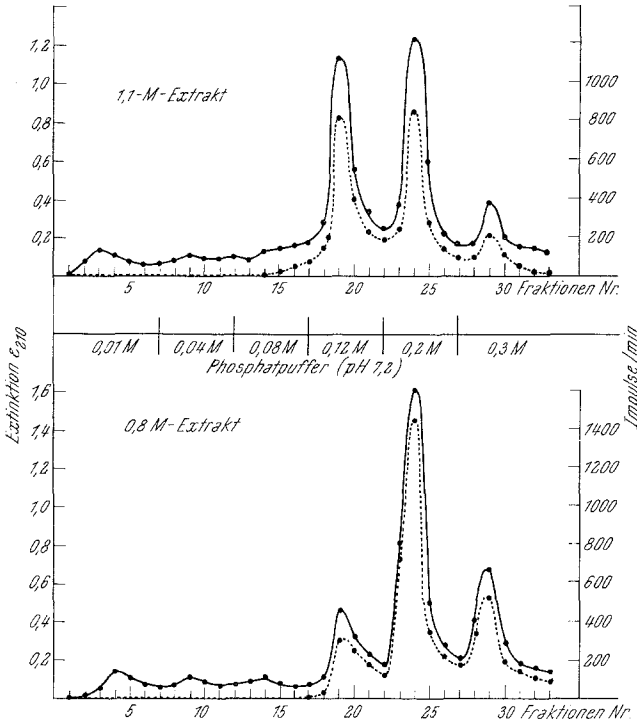


Abb. 6. DEAE-Chromatographie a) der 1,1m- und b) der 0,8m-Ammoniumsulfat-Extrakte aus Pferdeferritin (siehe Abb. 1). — Extinktion bei 210 μ ; - - - - - Aktivität

funden (z. B. Fig. 8). Aus dem aufsteigenden Teil (A), der Mitte (M) und dem absteigenden Teil (E) dieses Peaks wurden jeweils zwei Fraktionen isoliert, durch Pervaporation eingengt und der Gelelektrophorese unterworfen. Dabei wurden beachtliche Unterschiede zwischen A-, M- und E-Proben beobachtet. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse mit den 1,1m- und 0,5m-Extrakten aus Pferdeferritin. Der aufsteigende Teil (A) des Peaks enthielt stets die langsameren β -, γ - und δ -Ferritine, während im absteigenden Teil (E) vorwiegend α -Ferritin anzutreffen war. Das mit niedrigeremolarem Ammoniumsulfat extrahierte Pferdeferritin zeigte einen viel höheren Anteil der langsameren Komponenten.

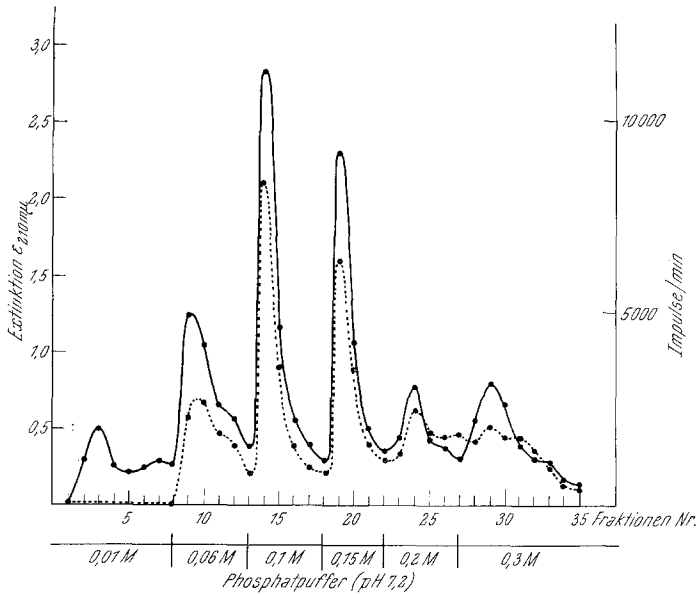


Abb. 7. DEAE-Chromatographie von Rinderferritin (0,8*m*-Ammoniumsulfat-Extrakt von Rohferritin aus Rindermilz). — Extinktion bei 210 $m\mu$; - - - - - Aktivität

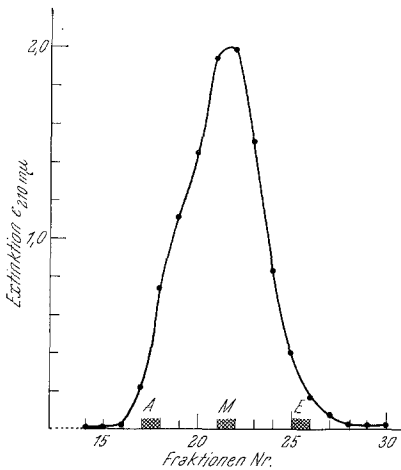


Abb. 8. Gelfiltration auf Sephadex G-200 des 1,1*m*-Ammoniumsulfat-Extraktes aus Pferdeferritin (s. Abb. 1). Die mit [////] bezeichneten Fraktionen wurden als A-, M- und E-Proben für die Gelelektrophorese verwendet

Diskussion

Die Anwendung verschiedener Fraktionierverfahren hat gezeigt, daß die bei der Gelelektrophorese gefundenen Ferritin-Komponenten sich auch bezüglich der Löslichkeit und des Verhaltens bei der Chromatographie und der Gel-Filtration unterscheiden. Die Ergebnisse der Gel-Filtration weisen auf Unterschiede in der Molekülgröße hin. Das Molekulargewicht des Ferritins liegt oberhalb der Ausschlußgrenze des Sephadex G-200-Gels. Eine Auftrennung in einzelne Peaks kann deshalb nicht erwartet werden. Jedoch ist die Möglichkeit einer partiellen Anreicherung von Proteinen oberhalb der Aus-

schlußgrenze des Gels bekannt¹⁴. So zeigte auch die gelelektrophoretische Untersuchung von Proben aus verschiedenen Teilen des Filtrations-Peaks unterschiedliche Anteile der einzelnen Ferritin-Komponenten.

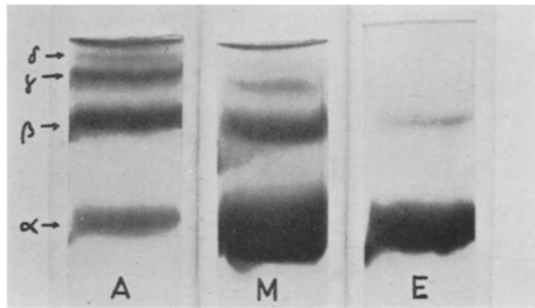


Abb. 9a

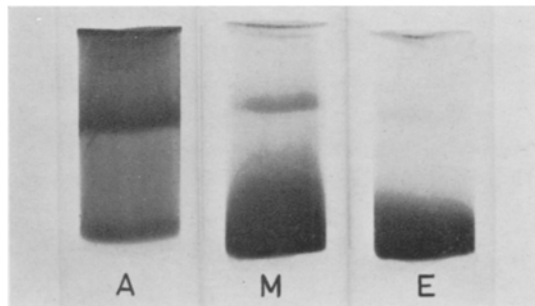


Abb. 9b

Abb. 9. Gelelektrophorese nach Gelfiltration a) des 1,1*m*- und b) des 0,5*m*-Ammoniumsulfat-Extraktes aus Pferdeferritin (s. Abb. 1). Angefärbt mit dem Ferrocyanid-Reagens

Sedimentationsanalysen von Apoferritin-Komponenten nach Anreicherung mittels präparativer Elektrophorese führten zur Annahme, daß β - und γ -Ferritin das Dimer bzw. das Trimer des monomeren α -Ferritins sind⁶. In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit an Pferdeferritin konnte ebenfalls nur ein einziger Filtrations-Peak auf Sephadex G-200 erhalten werden; die elektrophoretischen Komponenten des Apoferritins und auch des Ferritins waren in verschiedenen Teilen des Filtrations-Peaks teilweise getrennt⁷.

¹⁴ P. Flodin, Dextran Gels and their Application in Gel Filtration, Uppsala 1962.

Das Verhalten von Ferritin auf DEAE-Cellulose läßt sich ebenfalls zum Teil durch Annahme von Aggregaten erklären. Bei einer homologen Reihe von Molekülen mit gleicher Ladungsdichte ist zu erwarten, daß die größeren Moleküle stärker als die kleineren Moleküle an Ionenaustauscher gebunden werden. Die Chromatographie von Proteinen beweist die Möglichkeit einer Differenzierung nach der Molekülgröße^{15, 16}. Während α -Ferritin aus Pferdemiß bereits mit 0,08 *m*- und 0,12 *m*-Puffer eluiert wird, kommen das dimere bzw. trimere β - und γ -Ferritin erst im Bereich 0,2—0,3 *m* aus der Säule (Abb. 5). Außer der Molekülgröße spielt natürlich auch die Ladung eine Rolle. So zeigt ein Vergleich der DEAE-Auftrennung von Pferdeferritin mit Rinderferritin, daß die Elution in umgekehrter Reihenfolge zur elektrophoretischen Beweglichkeit erfolgt.

Die fraktionierte Extraktion eines Proteinniederschlags ermöglicht eine bessere Auftrennung als das Aussalzen^{17, 18}. Die β -, γ - und δ -Komponenten wurden erst mit geringeren Molaritäten des Salzes extrahiert. Das α -Ferritin war allerdings über den ganzen Extraktionsbereich verteilt. Zwar ist es mit dieser Methode nicht gelungen, einzelne Bestandteile in reiner Form zu isolieren, doch beweisen die Ergebnisse mit der Gelelektrophorese (Abb. 2) und besonders der Gel-Filtration der Ammoniumsulfat-Extrakte (Abb. 9), daß mittels der fraktionierten Extraktion eine gute Anreicherung einzelner Bestandteile möglich ist. Die Methode könnte von präparativer Bedeutung sein.

Austausch mit radioaktivem Eisen hat es ermöglicht, Ferritin bei Auftrennung neben Begleitproteinen spezifisch nachzuweisen, wobei die Verteilung der Aktivität dem Ausmaß der Anfärbung durch das Ferrocyanid-Reagens parallel geht.

Wir danken Herrn Prof. Dr. *E. Broda* für sein Interesse, der Sonnleitner-Stiftung (Österreichische Akademie der Wissenschaften) für finanzielle Unterstützung und der Internationalen Atomenergie-Organisation für ein Stipendium an *B. J. R.*

¹⁵ *J. L. Fahey* und *A. P. Horbett*, *J. Biol. Chem.* **234**, 2645 (1959).

¹⁶ *A. Tiselius*, *S. Hjerten* und *O. Levin*, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 132 (1956).

¹⁷ *R. K. Zahn* und *L. Stahl*, *Z. Physiol. Chem.* **293**, 1 (1955).

¹⁸ *C. A. Zittle* und *E. S. DellaMonica*, *Arch. Biochem. Biophys.* **58**, 31 (1955).