

Einbau von [³²P]Orthophosphat in DNA der Mäuse-Milz unter Antigen-Einfluß

Incorporation of [³²P]Orthophosphate into DNA of the Mouse Spleen under Influence of Antigen

Wilhelm Uecker, Diethard Kubsch, Dieter Lutz* und Hans Kröger

Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Nordufer 20, D-1000 Berlin 65

Z. Naturforsch. **35 c**, 599–604 (1980); eingegangen am 24. Februar/25. April 1980

Orthophosphate, Mouse Spleen, DNA, Antigen, Desoxymononucleotides

Antigens cause an increase of the DNA synthesis in the spleen of mice as shown by the incorporation of [³²P]orthophosphate and [³H]thymidine. In the present paper, the incorporation of [³²P]orthophosphate into the single desoxymononucleotides has been studied under influence of the antigen bovine serum albumin. For this purpose, the labelled DNA was decomposed to the desoxymononucleotides and their specific activities determined. Using [³²P]orthophosphate, it was found that the activity of the DNA increased continuously during an observation period of 8 h. While after one hour the relative specific activity of dTMP was highest and that of dAMP lowest, the relative specific activities of the desoxymononucleotides had become equal after 8 h. Under the influence of bovine serum albumin, the incorporation of [³²P]orthophosphate increased in the main band DNA as well as in the satellite DNA. The antigen had no effect on the distribution of the specific activities of the desoxymononucleotides.

Einleitung

Unter dem Einfluß von Antigenen wurde bei der Verwendung von [³H]Thymidin eine DNA-Synthese-Steigerung in der Milz von Mäusen gefunden [1–3]. Bei analog durchgeführten Untersuchungen mit [³H]Methionin und [¹⁴C]Deoxy-Cytidin kamen wir hingegen zu anderen Resultaten. Der Einbau der radioaktiven Substanzen in die DNA nahm bis zur 24. Stunde ab; erst danach stellten wir eine Steigerung fest [4]. Wir haben deshalb Untersuchungen zur DNA-Synthese nach Antigen-Applikation mit [³²P]Orthophosphat durchgeführt. Die markierte DNA wurde isoliert und zu den Desoxy-Mononucleotiden abgebaut. Diese wurden aufgetrennt und ihre spezifischen Radioaktivitäten ermittelt.

Material und Methoden

Material

Die Versuche wurden mit weiblichen, etwa 20 g schweren Albino-Mäusen (NMRI) durchgeführt. Als

Antigen diente Rinder-Serum-Albumin (RSA) der Fa. Behringwerke, Marburg. Von der Fa. Amersham/Buchler, Braunschweig, wurden die radioaktiven Substanzen [³²P]Orthophosphat PBS 1 (40–140 Ci/mg P) und [³H]Thymidin TRK 61 (26 Ci/mM) bezogen. Das Enzym DNase I aus Rinderpankreas stammte von der Fa. Serva, Heidelberg; die Phosphodiesterase aus *Crotalus terr. terr.* von der Fa. Boehringer, Mannheim. Zur säulenchromatographischen Auftrennung diente Dowex 50 W × 4, minus 400 mesh oder Dowex 1 × 2, Acetatform, der Fa. Serva, Heidelberg. Dimethylsulfoxid (DMSO) lieferte die Fa. Merck, Darmstadt, Aerosil 380 die Fa. Degussa, Frankfurt.

Methoden

1) DNA-Isolierung:

a) Nach *Schmidt-Thannhauser* [5]: Die spezifische Radioaktivität wurde im cpm per mg DNA ermittelt.

b) Nach *Marmur* [6]: Die isolierte DNA wurde in 5 ml 0,015 M NaCl + 0,0015 M Natriumcitrat (pH 7,0) bei 0–4 °C über Nacht gelöst. Die Lösung wurde auf 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat (pH 7,0) eingestellt und nacheinander 1 Std. bei 37 °C mit RNase (50 µg/ml) und 18 Std. bei 37 °C mit Pronase (1 mg/ml) inkubiert. Danach wurde mit Chloroform-Isoamylalkohol (14:1) ausgeschüttelt, DNA aus dem Überstand mit Alkohol präzipitiert

* Gegenwärtige Adresse: Dr. D. Lutz, Hanusch-Krankenhaus, Heinrich-Collin-Str. 30, A-1140 Wien.

Abkürzungen: CsCl, Cäsiumchlorid; dAMP, Desoxyadenosin-5'-phosphat; dCMP, Desoxycytidin-5'-phosphat; dGMP, Desoxyguanosin-5'-phosphat; dTMP, Desoxythymidin-5'-phosphat; DMSO, Dimethylsulfoxid; NaCl, Natriumchlorid; POPOP, 1,4- bis -2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol; PPO, 2,5-Diphenyloxazol; RSA, Rinderserumalbumin; TTP, 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. H. Kröger.

0341-0382/80/0700-0599 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

und in 0,015 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat (pH 7,0) aufgenommen.

2) *DNA-Bestimmung*: Diese erfolgte nach dem Verfahren von Burton [7].

3) Die *Radioaktivitäts-Messung* erfolgte im Tricarb (3380/544) der Fa. Packard. Es wurde, falls nicht anders angegeben, Dioxan-Szintillator verwendet: 7,0 g PPO in 125 ml Anisol, 0,50 g POPOP in 125 ml Äthylenglycoldimethyläther und 750 ml Dioxan.

4) *Enzymatische Hydrolyse der DNA in 5'-Desoxy-Mononucleotide* [8, 9] und deren *Auftrennung* [10]: Die mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitierte und gewaschene DNA wurde in Hydrolysepuffer (pH 7,0; 0,01 M Ammoniumacetat, 0,025 M Magnesiumchlorid, 0,025 M Natriumfluorid) aufgenommen (0,5 mg DNA/ml) und mit DNase I (100 µg/mg DNA) 2 Stunden bei 37 °C inkubiert (Schüttelwasserbad); anschließend wurde Phosphodiesterase (10 µg/mg DNA) dazugegeben und weitere 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, zentrifugiert (10 min 10000 rpm, Sorvall, Kühlzentrifuge) und der klare Überstand abgehoben. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Ammoniumformiatpuffer (pH 2,8) wurde das Hydrolysat auf eine Dowex 50 WX 4 Säule (Ø = 7 mm, h = 400 mm) gegeben. Mit 0,1 M Ammoniumformiatpuffer (pH 2,8) wurden nacheinander die vier Mononucleotide eluiert:

1. = dTMP; 2. = dGMP; 3. = dCMP; 4. = dAMP.

Der Ionenaustauscher wurde vorher in Wasser suspendiert und durch Dekantieren zweimal mit 1 N HCl, dreimal mit konz. NH₄OH und dreimal mit Elutionspuffer gewaschen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 1 ml/min; die Elution fand bei Raumtemperatur statt.

Die einzelnen Fraktionen wurden am Spektralphotometer bei 260 nm gemessen, dann die entsprechenden Fraktionen der einzelnen Desoxy-Mononucleotide zusammengegeben. Aus dem Volumen und der Extinktion (bei E_{\max}) wurde die Menge in µmol bestimmt. Anschließend wurde die gesamte Menge der jeweiligen Desoxy-Mononucleotide in ein Tricarb-Gläschen gegeben und eingedampft (Vakuum über Nacht). Der Salzurückstand konnte in 1 ml DMSO kalt gelöst werden. Zu dieser Lösung wurden 10 ml Toluol-Szintillator mit einem Gehalt von 4% Aerosil 380 hinzugefügt. Die Proben wurden vor der Messung ca. 1 Stunde lang intensiv geschüttelt.

5) *Auftrennung der DNA in Hauptbanden-Satelliten-DNA* [11]: Alle verwendeten Glasgeräte wurden siliconisiert und die Polyallomer-Röhrchen 24 Stunden mit 1%iger RSA-Lösung abgesättigt.

a) *Isolierung der DNA*: Die DNA wurde nach Marmur isoliert. Ihre Konzentration wurde mit verdünntem Natriumcitratpuffer (0,015 M NaCl, 0,0015 M Natriumcitrat, pH 7,0) auf 1 mg/ml eingestellt.

b) *Denaturierung der DNA*: Die DNA-Lösung wurde 15–20 min bei 98–100 °C im Wasserbad belassen.

c) *Reassoziierung der DNA*: Die DNA-Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt (Thermostat) und mit dem gleichen Volumen einer 60 °C warmen Reassoziationslösung (0,785 M NaCl, 0,0185 M Natriumcitrat, pH 7,0) versetzt. Die Pufferkonzentration betrug danach 0,4 M NaCl und 0,01 M Natriumcitrat (pH 7,0); der Ansatz wurde 16 Std. lang bei 60 °C im Thermostaten belassen.

d) *CsCl-Gradientenzentrifugation*: Die so behandelte DNA-Lösung wurde mit festem CsCl auf eine Dichte von 1,6 g/ml eingestellt (Refraktometer 1,3902 η). Die vorbehandelten Polyallomer-Röhrchen wurden mit einem Teil gesättigter CsCl-Lösung (Puffer = 0,4 M NaCl, 0,01 M Natriumcitrat pH 7,0) beschickt, mit zwei Teilen der eingestellten DNA-Lösung vorsichtig überschichtet, mit Öl aufgefüllt und austariert.

Die Zentrifugation wurde bei 20 °C 12–14 Std. mit dem Beckman-Festwinkelrotor 50Ti (35000 rpm) durchgeführt. Die Röhrchen wurden nach dem Zentrifugieren vorsichtig dem Rotor entnommen, von unten angestochen und fraktioniert ausgetropft. Jede Fraktion (3–5 Tropfen) wurde mit 0,5 ml dest. H₂O verdünnt und gemessen: optische Dichte bei 260 nm, ³²P im Tricarb ohne Zusatz von Scintillator (Compton-Effekt).

e) *Säurefällung der DNA*: Die zu den beiden Banden gehörenden Fraktionen wurden jede für sich gesammelt und die DNA im Eisbad durch Zugabe von 21%iger TCA gefällt (Endkonzentration 7% TCA). Nach 10 min wurde abzentrifugiert (12000 rpm) und je einmal mit 7-prozentiger TCA und Äther-Äthanol (1:3) gewaschen. Anschließend wurde die DNA hydrolysiert.

6) *Passive Hämagglutination* [12]: 1,2 ml Hammel-Erythrozyten, vorher dreimal mit 0,15 M Phosphat-Puffer nach Sörensen (pH 7,2) gewaschen, wurden in 10 ml 0,15 M Phosphat-Puffer (pH 7,2) und 10 ml

0,15 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung suspendiert. Dann wurden 22 mg RSA und 2 ml Glutardialdehyd (2,5-prozentig in Phosphat-Puffer, pH 7,2) zugesetzt; alles wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die so beladenen Erythrozyten wurden mit Phosphat-Puffer gewaschen und in 10 ml einer 1%igen Kaninchenserum-Lösung (Serum hitzeinaktiviert, in Phosphat-Puffer, pH 7,2) resuspendiert. Diese Suspension kann 1 Woche bei 0 °C aufbewahrt werden. Zum Test wurden 0,1 ml Serum bzw. Serumverdünnung mit 0,01 ml beladenen Erythrozyten gemischt und der Titer, wie bei Herbert [12] beschrieben, analysiert.

Ergebnisse

A) Versuche ohne Antigen-Einfluß

1. *Kinetik der ^{32}P -Einbaus:* Den Mäusen wurden 5 μCi [^{32}P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Die Milzen wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen, daraus die DNA isoliert und deren spezifische Radioaktivität ermittelt. Aus Abb. 1 geht hervor, daß der Einbau bis zur 8. Stunde der Messung beständig zunimmt.

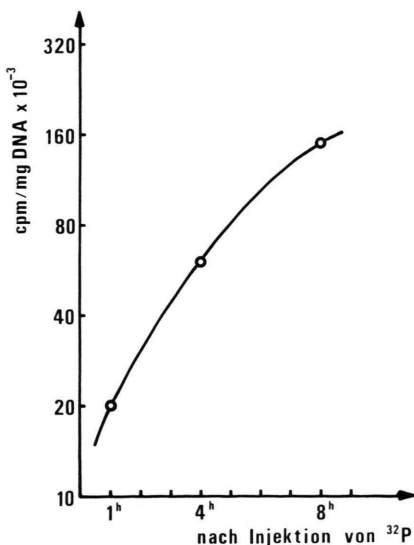


Abb. 1. Kinetik des ^{32}P -Einbaus in Milz-DNA der Maus. Den Mäusen wurde 5 μCi [^{32}P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Milzen entnommen und die DNA nach Marmur isoliert.

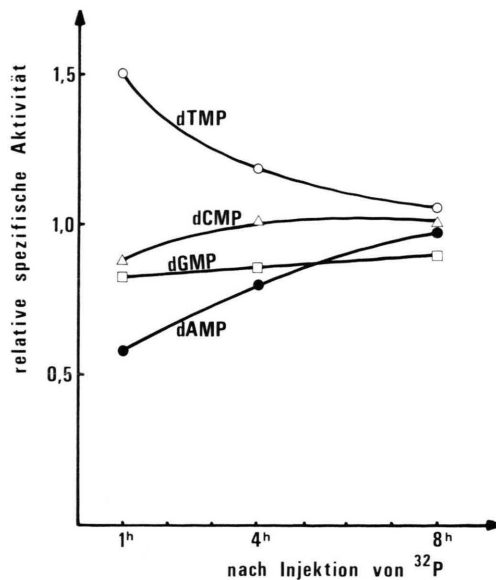


Abb. 2. Relative spezifische Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide aus Milz-DNA nach i. p.-Injektion von ^{32}P . Den Mäusen wurden 5 μCi [^{32}P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Milzen entnommen, die DNA nach Marmur isoliert und zu den Desoxy-Mononucleotiden abgebaut. Die spezifische Aktivität der einzelnen Desoxy-Mononucleotide (cpm/ μmol) wurde ins Verhältnis gesetzt zur mittleren spezifischen Aktivität der gesamten Desoxy-Mononucleotide (Σ cpm/ μmol).

2. *Abbau der DNA zu Desoxy-Mononucleotiden:* Die relativen spezifischen Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide lassen sich aus Abb. 2 entnehmen. Die relative spezifische Aktivität von dAMP steigt beständig an, die von dTMP hingegen nimmt bis zur 8. Stunde ab. Bei dCMP und dGMP zeigt sich zwischen der 1. und 8. Stunde nur eine geringe Veränderung.

3. *Spezifische Aktivität der Desoxy-Mononucleotide in Hauptbanden- und Satelliten-DNA:* Die DNA wurde durch Dichtegradienten-Zentrifugation in Hauptbanden- und Satelliten-DNA aufgetrennt und ebenfalls in die Desoxy-Mononucleotide abgebaut. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß bei der Analyse nach einer und nach vier Stunden das gleiche Bild entsteht: stärkste Markierung von dTMP, geringste von dAMP und Tendenz zum Ausgleich der spezifischen Aktivitäten nach 4 Stunden.

B) Versuche unter Antigen-Einfluß

1. *Einfluß des Antigens auf die Synthese der Gesamt-DNA:* Für die Versuche wurde mikroaggregier-

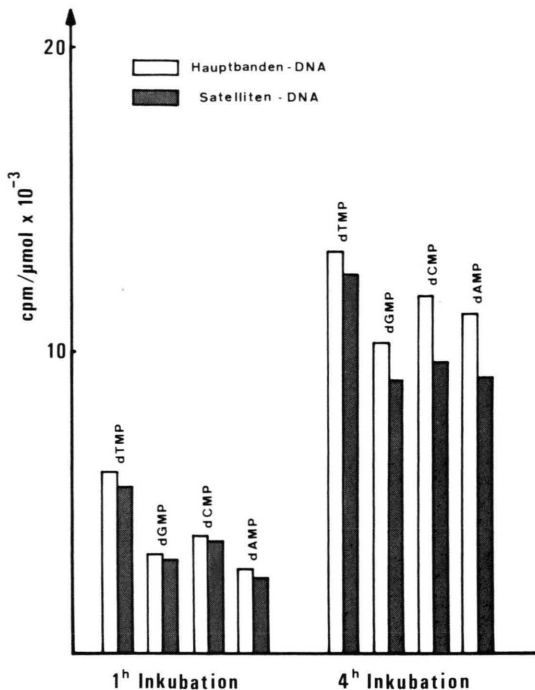


Abb. 3. Spezifische Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide in Hauptbanden- und Satelliten-DNA. Den Mäusen wurde 1 μCi [32 P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Sie wurden 1 Std. bzw. 4 Std. später getötet. Die DNA, nach Marmur aus den Milzen isoliert, wurde in die Hauptbanden- und Satelliten-DNA aufgetrennt und daraus die Desoxy-Mononucleotide gewonnen.

tes Rinderserum-Albumin eingesetzt. 23 Stunden nach i. p.-Applikation von 300 μg RSA pro Maus wurden 1 μCi [32 P]Orthophosphat pro g Körpergewicht der Maus i. p. injiziert, 40 Minuten danach noch 0,2 μCi [32 P]Thymidin pro g Körpergewicht der Maus. Die Tiere wurden zum Zeitpunkt 24 Std. getötet.

Aus Tabelle I läßt sich entnehmen, daß die DNA-Synthese in der Milz in beiden Fällen durch die Immunisierung deutlich gesteigert wird.

2. *Einfluß des Antigens auf die spezifischen Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide:* Bei der Auftrennung von DNA aus immunisierten Tieren zu verschiedenen Zeiten nach i. p.-Applikation von 32 P zeigte sich in Abb. 4 das schon in Abb. 2 aufgezeigte Bild. Zunächst ist das dTMP stark, das dAMP hingegen nur schwach markiert. Nach 8 Stunden ist die Markierung der Desoxy-Mononucleotide fast gleich groß.

Tabelle I. DNA-Synthese in der Mäuse-Milz unter Einfluß von Rinderserum-Albumin.

Radioaktivität	Kontrolle [cpm/mg DNA]	RSA immunisiert [cpm/mg DNA]
[3 H]Thymidin	390	620
[32 P]Orthophosphat	900	2000

Die Mäuse wurden 24 Stunden vor dem Töten mit 300 μg RSA i. p. immunisiert. Eine Stunde vor dem Töten wurde den Tieren 1 μCi [32 P]Orthophosphat/g i. p. injiziert, 20 min vorher 0,2 μCi/g [32 P]Thymidin. Den Mäusen wurde die Milz entnommen und je 3 Milzen wurden zu einer Probe vereinigt. Die DNA wurde nach der Methode von Schmidt-Thannhauser extrahiert. 100 μl des TCA-Hydrolysats wurden in 10 ml Dioxan-Szintillator gelöst und im Tricarb 3880 gemessen (Fixtasten für 3 H- und 32 P-Messung; es streuten nur 2–3% der 32 P-Counts in den 3 H-Kanal ein).

Als Vergleich dienten Mäuse, die nicht immunisiert waren. Ein Teil der immunisierten Mäuse wurde 5 Wochen später entblutet. Im Serum konnten im passiven Hämagglutinationstest Antikörper nachgewiesen werden.

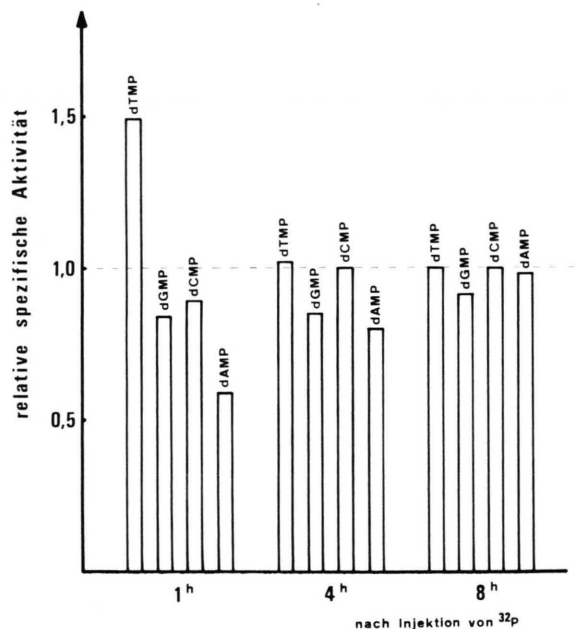


Abb. 4. Relative spezifische Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide unter dem Einfluß von Rinderserum-Albumin. Die Mäuse wurden 24 Std. vor dem Töten mit je 300 μg RSA (mikroaggregiert) i. p. immunisiert. 1, 4 und 8 Stunden vor dem Töten wurde den Tieren 5 μCi [32 P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Die DNA, nach Marmur aus den Milzen isoliert, wurde zu den Desoxy-Mononucleotiden abgebaut. Die spezifische Aktivität der einzelnen Desoxy-Mononucleotide (cpm/μmol) wurde ins Verhältnis gesetzt zur mittleren spezifischen Aktivität der gesamten Desoxy-Mononucleotide (Σ cpm/μmol).

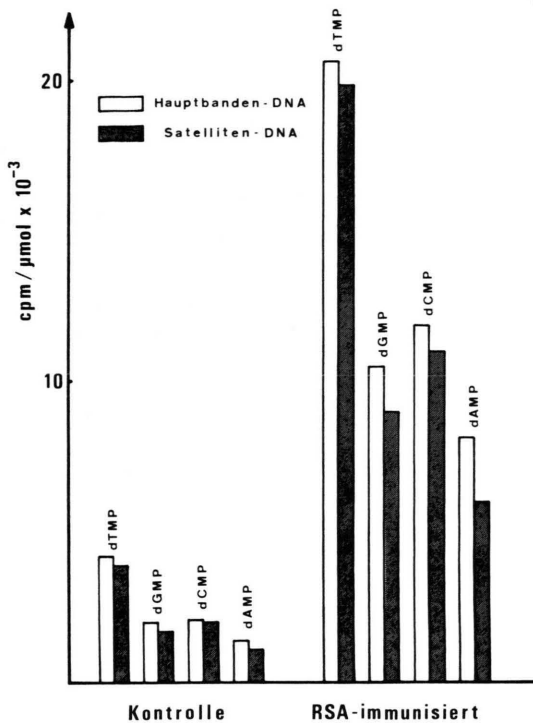


Abb. 5. Spezifische Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide in Hauptbanden- und Satelliten-DNA unter dem Einfluß von Rinderserum-Albumin. Die Mäuse wurden 24 Stunden vor dem Töten mit je 300 μ g RSA (mikroaggregiert) i. p. immunisiert. Eine Stunde vor dem Töten wurde den Tieren 5 μ Ci [32 P]Orthophosphat pro g Körpergewicht i. p. injiziert. Die DNA, nach Marmur aus den Milzen isoliert, wurde in die Hauptbanden- und Satelliten-DNA aufgetrennt und die Desoxy-Mononucleotide durch Hydrolyse gewonnen.

3. *Einfluß des Antigens auf die spezifischen Aktivitäten der Desoxy-Mononucleotide von Hauptbanden- und Satelliten-DNA:* Die DNA wurde in Hauptbanden- und Satelliten-DNA aufgetrennt und danach zu den Desoxy-Mononucleotiden abgebaut. Beim Vergleich von Kontrollen und Proben immunisierter Tiere zeigt sich, daß unter dem Antigen-Ein-

fluß mehr Radioaktivität nachgewiesen werden kann (Abb. 5). Jedoch verhalten sich die beiden DNAs in der Radioaktivitäts-Verteilung ihrer Desoxy-Mononucleotide gleich.

Diskussion

Unter dem Einfluß von Antigen wird die DNA-Synthese in den entsprechenden Organen stimuliert [1–3]. Dies hat die Vermehrung der kompetenten Zellen zur Folge. In den hier beschriebenen Experimenten zur DNA-Synthese mit [32 P]Orthophosphat hat sich herausgestellt, daß die höchste Einbaurrate zunächst in dTMP zu finden ist. Nach 8 Stunden ist jedoch die Radioaktivität über alle Desoxy-Mononucleotide gleich verteilt. Dieses gilt sowohl für die mit RSA immunisierten Tiere als auch für die entsprechenden Kontrollen. Von Bochert *et al.* [13] wurde bei Studien an Ratten-Embryonen beobachtet, daß bei Verwendung von [32]Orthophosphat bevorzugt dTMP markiert wird. Dieses war nicht der Fall, wenn [14 C]Glukose eingesetzt wurde. Bei der Untersuchung der DNA-Synthese mit Hilfe von [3 H]Thymidin fand man unterschiedliche Phasen der DNA-Markierung in *Drosophila melanogaster* [14] und *Oncocryptus fasciatus* [15]. Die Ursache der bevorzugten Markierung von dTMP könnte in Pool-Fragen begründet liegen. Es wurde aufgezeigt, daß Eucaryonten zwei verschiedene Pools an TTP aufweisen [17]; diese sollen sich langsam äquilibrieren, wobei einer bevorzugt für die DNA-Synthese verwendet wird. Zu diskutieren ist aber auch die Frage, ob TTP für die Bildung von kleineren DNA-Bruchstücken eine spezifische Rolle spielt. Von Lutz *et al.* [4] sowie von Zatz und Goldstein [19] wurde gefunden, daß bei der Verwendung von Desoxycytidin als Vorstufe sich nach Applikation von Antigenen zunächst eine Hemmung der DNA-Synthese zeigt. In weiteren Untersuchungen muß geklärt werden, weshalb sich die einzelnen DNA-Vorstufen so unterschiedlich verhalten.

- [1] R. W. Dutton u. R. I. Mitchell, *J. Exp. Med.* **126**, 443 (1967).
- [2] G. Harris u. S. R. Pelc, *Immunology* **19**, 865 (1970).
- [3] D. A. Rowley, F. W. Fitch, D. E. Mosier, S. Holliday, L. W. Coppleson u. D. W. Brown, *J. Exp. Med.* **127**, 983 (1968).
- [4] D. Lutz, H. Kröger, W. Uecker, D. Kubsch u. E. Mertens, *Z. Immun.-Forsch.* **150**, 424 (1975).
- [5] G. Schmidt u. S. J. Thannhauser, *J. Biol. Chem.* **161**, 83 (1945).
- [6] J. Marmur, *J. Mol. Biol.* **3**, 210 (1961).
- [7] K. Burton, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
- [8] D. S. Ray u. P. C. Hanawalt, *J. Mol. Biol.* **9**, 812 (1964).
- [9] R. Wu u. A. D. Kaiser, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **57**, 170 (1967).
- [10] F. R. Blattner u. H. P. Erickson, *Anal. Biochem.* **18**, 220 (1967).
- [11] M. Warring u. R. J. Britten, *Science* **Vol. 154**, 791 (1966).
- [12] W. J. Herbert, *Handbook of Experimental Immunologie*, S. 720, (D. M. Weiß, Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh 1967.
- [13] G. Bocher, P. Mewes u. R. Krowke, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **277**, 413 (1973).
- [14] S. J. Friedman, P. J. Skehan, M. L. Polan, A. Fausto-Sterlin u. P. R. Brown, *Insect. Biochem.* **4**, 381 (1974).
- [15] S. E. Harris u. H. S. Forrest, *Science* **156**, 1613 (1967).
- [16] O. J. Schwarz u. A. H. Haber, *Abstr. Meeting Southern Section, American Soc. Plant Physiol.*, Mobile, Alabama 1972.
- [17] A. Fridland, *Nature (New Biologie)* **243**, 105 (1973).
- [18] R. Lundquist, P. Manlapar-Fernandez u. B. M. Oliver, *J. Mol. Biol.* **83**, 541 (1974).
- [19] M. M. Zatz u. A. L. Goldstein, *Immunol.* **110**, 1312 (1973).