

Histochemical Localization of Lipids in the Nuclei of Human Blood and Haemopoietic Cells

The chemical analysis reveals considerable quantities of lipids in the nuclei of many blood and haemopoietic cell types such as pus cells¹ and blood leucocytes (both normal and leukaemic)^{2,3}. Phospholipids and free cholesterol and a small amount of neutral fats are present². Since a contamination of 'pure' nuclei fraction by surrounding cytoplasmic particles seems to have been successfully prevented at least in some of the chemical studies quoted above², it may be assumed that lipids are to be considered a normal constituent of the nuclei of blood and haemopoietic cells. Conventional fat-staining methods disclose nevertheless no significant amount of visible lipids in these nuclei, and lipids are not liberated here by most 'unmasking' treatments. Only ACKERMAN⁴ states that in acid-treated preparations the nuclei of leucocytes and erythroblasts are sudanophilic, in contrast to their sudanophobic nature in control non-acid treated Sudan preparations. These findings have not yet been confirmed, and the staining of lipids in cell nuclei of haematic cells has not been submitted to systematic study.

The presence and site of lipids in the nuclei of the blood and haemopoietic cells is therefore a question still to be solved.

Material and Methods. Our investigation was carried out on blood smears, lymph node imprints and bone-marrow smears, obtained from healthy individuals and leukaemic patients. Some tests were also performed on lymph node smears of subjects affected by Hodgkin's malignant granuloma.

The following fixatives, staining procedures, and unmasking methods⁵⁻⁷ were used:

Fixatives: (a) Formalin vapour. (b) Neutral formalin (10%). (c) Baker's formaldehyde-calcium mixture. (d) Weak solution of Bouin's fixative. (e) Mercuric chloride (1%).

Staining procedures: (a) Sudan Black B diluted in 40% or 70% ethanol, or in 60% isopropyl alcohol, or in ethanol-phenol⁸, or in acetone, or in 80% ethanol + acetone. Mayer's carmalum was used as counterstain. (b) Oil Red O in 60% isopropanol. (c) Baker's acid haematin test. (d) Nile blue sulphate test. (e) Phosphomolibdic acid method after Landing. (f) Copper phthalocyanin methods. (g) Performic-acid-Schiff test. (h) O₂ Schiff test. (i) UV Schiff method. (k) Plasmal test. (l) Romieu test. (m) Okamoto's mercury diphenylcarbazone methods. (n) Ueda-Okamoto test for cholesterol. (o) Liebermann reaction after Romieu. (p) Lifschütz test after Everett. (q) Benzpyrene-caffeine solution⁹.

Unmasking treatments: (a) Carboxylic acids⁴. (b) Mineral acids⁴. (c) 1% phenol. (d) Fat solvents. (e) Proteolytic enzymes such as pepsin-HCl and trypsin. (f) Berenbaum's colouring procedures¹⁰.

Results. Among *direct fat-staining methods* consistently positive findings were obtained only with benzpyrene-caffeine mixture after BERG⁹, as a distinct fluorescence of nuclear membrane and nucleoli, if present. Not consistently positive results were obtained with PFA-Schiff test and Nile blue staining. Negative results were found with the other methods.

Most *unmasking methods* failed to reveal a lipid localization in the nuclei. Consistent evidence of sudanophilia was observed with BERENBAUM's 'burnt' Sudan black B method, but the sudanophilia was not prevented by the extraction of lipids by hot pyridine for 48 h. A non-specific reaction is therefore presumable. More convincing proof of the presence of lipids in the nuclei was obtained with

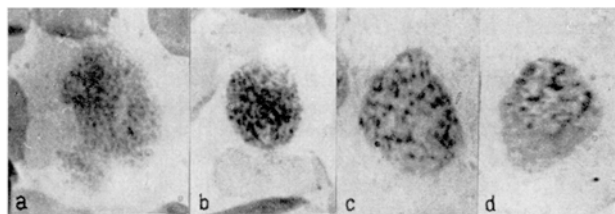
other unmasking procedures, such as acetic acid, hot acetone, hot ether, and cold chloroform-methanol mixture.

The nuclei of all cell types gave a similar pattern (Figure). No differences have been found between normal and leukaemic leucocytes.

Discussion. There is little doubt that the fluorescence obtained with the benzpyrene method is due to the presence of lipids in the nuclear membrane and nucleoli. The nature of the sudanophilic material seen after unmasking treatments is more questionable. Although Sudan black B is undoubtedly a sensitive lipid colorant and a highly selective reagent, it is known that its slightly basic property might result in some staining of non-lipid substances¹¹. Moreover, a decomposition of the dye might occur during the staining of sections previously treated with acid¹². Decomposition products could become attached to cellular acid groups (e.g. in nucleoproteins and mucopolysaccharides). Nevertheless, with the experimental methods adopted, a non-specific staining does not seem probable.

No brown stains have been obtained, as with Sudan black B decomposition products. The sudanophilia of the nuclear material seen after acetic acid treatment can be prevented by hot pyridine extraction. Moreover, the sudanophilia of the nucleus after acetic acid or lipid solvents treatment does not seem to be attributed to an artefact caused by diffusion of the cytoplasmic lipids in the nucleus: in fact, sudanophilia was even found in the nucleus of lymphocytes, lymphoblasts and erythroblasts lacking demonstrable cytoplasmic lipids outside the mitochondria, the stainability of which was conserved and sometimes increased by the unmasking treatment.

Since individual metaphase chromosomes are lacking in histochemically demonstrable lipids, the sudanophilic



Sudanophilia of nuclei after unmasking treatment with acetic acid (a, b) or hot ether (c, d). a: monocyte; b: lymphocyte; c: histiocyte; d: plasmacell.

¹ C. A. STONEBURG, J. biol. Chem. 129, 189 (1939).

² E. POLLI and Q. RATTI, Biochem. Z. 323, 546 (1953).

³ L. VILLA, E. POLLI, and L. BUSSI, Atti XI Congr. Naz. Soc. It. Ematol. (EMES, Roma 1953), p. 82.

⁴ G. A. ACKERMAN, Science 115, 629 (1952).

⁵ A. G. E. PEARSE, Histochemistry (Churchill, London 1961).

⁶ L. LISON, Histochemie et cytochimie animales (Gauthier-Villars, Paris 1960).

⁷ W. G. B. CASSELMAN, Histochemical Technique (Methuen & Co., London 1959).

⁸ E. STORTI and S. PERUGINI, Studia Ghisleriana, Studi Med. Biol. 1, 313 (1949).

⁹ N. O. BERG, Acta path. microbiol. scand., Suppl. XC (1951).

¹⁰ M. C. BERENBAUM, Quart. J. micr. Sci. 99, 231 (1958).

¹¹ W. G. B. CASSELMAN, Quart. J. micr. Sci. 95, 321 (1954).

¹² B. FREDRICSSON, T. C. LAURENT, and B. LÖNING, Stain Technol. 33, 155 (1958).

material in the nuclei seems to be totally or partly due to the nuclear membrane and to the nucleoli, if present.

As suggested by ACKERMAN⁴, it might be assumed that lipids are present in the nuclei as lipoproteins or as a liponucleoprotein complex. As most lipids are presumably conjugated to proteins, only a highly sensitive reagent, such as benzpyrene, is able to demonstrate directly the few reagent hydrophobic radicals. Nuclear lipids become sudanophilic only after denaturation, at least partial, of the protein layer. As for the nuclear sudanophilia observed after treatment with fat solvents, an alternative hypothesis is to assume, that a 'sudanophobic' lipid coating (cholesterol?) must be removed before the sudano-

philic lipid layer of the nuclear membrane becomes accessible to the dye.

Zusammenfassung. Die Anwesenheit von Lipiden im Kern der Zellen des Blutes und der hämopoetischen Organe wurde histochemisch nachgewiesen. Die Lipide scheinen ausschliesslich oder stark überwiegend in der Kernmembran und in den Nukleolen lokalisiert zu sein.

C. MAURI and V. SILINGARDI

Istituto di Patologia Medica, Università di Modena (Italy), May 13, 1963.

Metallionen-katalysierte Hydrolyse von Adenosintriphosphat

Der vor kurzem veröffentlichte Bericht von TETAS und LOWENSTEIN¹ über die Katalyse der nichtenzymatischen Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse durch zweiwertige Metallionen veranlasst uns, über Untersuchungen ähnlicher Art zu berichten, die wir in Verfolgung unserer früheren Beobachtungen^{2,3} durchgeführt haben.

Durch chromatographische Untersuchungen auf Diäthylaminoäthyl (DEAE)-Zellulose konnten wir zunächst leicht feststellen, dass die früher erwähnte^{2,3} Instabilität des Komplexes $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$ im wesentlichen durch dessen Hydrolyse zu $[\text{Cu-ADP}]^-$ und anorganischem Phosphat bedingt ist. Eine weitergehende Hydrolyse findet daneben nur in untergeordnetem Masse statt.

Die Kinetik der Hydrolysenreaktion verfolgten wir durch Messung der Phosphatfreisetzung⁴. Die Hydrolyse des ATP wird bei 50° durch einen Zusatz von Cu^{2+} -Ionen um einen Faktor von etwa 100 beschleunigt. Das Ausmass der Cu^{2+} -Katalyse hängt stark vom pH-Wert der Lösung ab. Wir fanden, wie die genannten Autoren, bei pH 5,5–6 ein Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit. Der Komplex $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$, welcher bei diesem pH-Wert in der Lösung vorliegt, kann einerseits ein Proton mit einem pK-Wert von ca. 4 anlagern^{3,5}, andererseits bei höherem pH ein Proton abspalten^{2,6}. Hierdurch wird die auch von TETAS und LOWENSTEIN geäusserte Vermutung gestützt, dass die Ausbildung von $[\text{Cu-ATP-H}]^-$ bzw. von $[\text{Cu-ATP-OH}]^{3-}$ aus $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$ die starke Verringerung der Hydrolysen- geschwindigkeit zu beiden Seiten des pH-Optimums verursacht. Wir können mithin den Befund bestätigen, dass für die beschleunigte Hydrolyse ein Komplex verantwortlich ist, dessen Protonierungsgrad tatsächlich der Formulierung $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$ entspricht.

Dieser Befund reicht jedoch für eine sinnvolle Diskussion der katalytisch aktiven Komplexstrukturen und der zugehörigen Reaktionsmechanismen nicht aus, denn in der wässrigen Lösung eines Komplexes dieser stöchiometrischen Zusammensetzung treten eine Vielzahl strukturerer Komplexpartikel auf⁶. Um zu entscheiden, welche der vorkommenden Komplexkonformationen die hydrolytische Spaltung der Polyphosphatkette induziert, haben wir eine Reihe weiterer Experimente unternommen, als deren vorläufige Ergebnisse genannt seien: (1) Die Hydrolysenreaktion ist nicht erster Ordnung in bezug auf $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$, sondern zeigt eine starke Konzentrationsabhängigkeit; d.h. in einer Lösung dieses Komplexes muss die reaktive Partikel in einem konzentra-

tionsabhängigen Gleichgewicht mit unreaktiven Partikeln stehen. (2) Hierauf weist auch das Ergebnis einer Untersuchung nach der Jobschen «Methode der kontinuierlichen Variation» hin: Die Hydrolysen- geschwindigkeit zeigt ein Maximum beim Verhältnis $\text{Cu} : \text{ATP} \sim 1,2$. (3) Gleichzeitig mit der Hydrolysenreaktion findet im Nukleotidkomplex, wie die völlige Umkehr der Rotationsdispersion anzeigt, offenbar eine drastische Konformationsumwandlung statt. (4) Der Cu^{2+} -Komplex von Methyltriphosphat ($[\text{Cu-MTP}]^{2-}$) hydrolysiert ca. 60mal langsamer als $[\text{Cu-ATP}]^{2-}$, obwohl in beiden Komplexen IR-spektrophotometrisch die gleichen Bindungsverhältnisse zwischen Metallion und Polyphosphatkette zu beobachten sind⁶.

Eine ausführliche Darstellung und Interpretation unserer Ergebnisse, deren weitere Verfolgung einen Ausblick auf die Mechanismen der dieser «Modellreaktion» entsprechenden enzymatischen Reaktionen erhoffen lässt, soll demnächst veröffentlicht werden⁷.

Summary. Some kinetic and structural data on the catalysis exerted by Cu^{2+} in the hydrolysis of ATP are given.

P. SCHNEIDER,
H. BRINTZINGER und H. ERLÉNMEYER

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 9. September 1963.

¹ M. TETAS und J. M. LOWENSTEIN, *Biochemistry* 2, 350 (1963).

² H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* 44, 1199 (1961).

³ U. HANDSCHIN und H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* 45, 1037 (1962).

⁴ Phosphatbestimmungen nach A. A. HIRATA und D. APPLEMAN, *Analyt. Chem.* 31, 2097 (1959).

⁵ M. M. TAQUI KHAN und A. E. MARTELL, *J. phys. Chem.* 66, 10 (1962).

⁶ H. BRINTZINGER, *Biochim. biophys. Acta* 77, 343 (1963).

⁷ Herrn Dr. H. SEILER danken wir für wertvolle Hinweise für die chromatographischen Untersuchungen. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sei an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung bestens gedankt.