

kom 180 der Maus und auf Zellkulturen von Amnion- und HeLa-Zellen herangezogen, sowie die immunogene Wirkung im Kaninchen und Meerschweinchen⁸ und die Verwendung entsprechender Antiseren⁹.

Zur Prüfung auf Einheitlichkeit und zur Identifizierung der wirksamen Fraktionen während der Aufarbeitung sind papierelektrophoretische Methoden unbrauchbar. Die sehr empfindlichen Proteine werden zum Teil irreversibel am Startpunkt adsorbiert. Stärkegel-Oberflächen-elektrophorese zeigt diesen Nachteil nicht, erfordert jedoch zu einer deutlichen Anfärbung relativ viel Substanz, vor allem, da am Protein gebundene Kohlehydrate in gewissen Fällen die typische Proteinfärbung kaschieren können. Das beste Auflösungsvermögen (mehrere scharfe Banden) zeigte bisher die Horizontal-Elektrophorese auf Acetatfolien (AEP)¹⁰, bei der die erforderliche Substanzmenge unter 100 µg liegt. Darüberhinaus gaben sowohl die charakteristischen Sephadex-Elutionskurven (Figur 2) als auch quantitative Aminosäureanalysen weitere Hinweise auf Anreicherungsgrad und Menge an gesuchter Substanz.

Beschreibung des aktiven Proteinkomplexes [8]. Die isolierte Fraktion I [8] ist von hellbrauner bis hellbeiger Farbe. Sie ist in Wasser schwer löslich. In 0,1–0,5 m Natriumacetatpuffer vom pH 5,5 ist sie bis zu Konzentrationen von 0,7% direkt löslich. Durch Anreiben mit wenig Wasser und anschließendes vorsichtiges Verdünnen («Verflüssigung») erreicht man jedoch Konzentrationen bis zu 67% (!). In Lösung beginnt die wirksame Komponente bereits durch zehnminütige Temperatureinwirkung bei 45°C zu denaturieren und teilweise auszuflocken. Der Vorgang ist mit einem raschen Wirkungsverlust verbunden.

Die Elementaranalyse ergab die Zusammensetzung: C 51,40%, H 7,07%, N 14,93%. Der bei der Radikalhydrolyse mit 6*N* HCl (24 h, 105°) anfallende schwarze Rückstand (Kohlehydrate) betrug 11,3%. Der Proteinanteil enthält 16,8% basische Aminosäuren mit Arginin als Hauptkomponente, eine Tendenz, die sich bereits in dem 36prozentigen Argininanteil bei den freien Aminosäuren des Preßsaftes zeigte⁶. Neben dem Verhalten bei der Sephadexchromatographie (Molekularsiebeffekt) deutet auch der Sedimentationskoeffizient der Hauptkomponente $s = 6 \cdot 10^{-13}$ auf ein höheres Molekulargewicht hin¹¹.

Die AEP des aktiven Komplexes (Figur 3) zeigt deutlich die einzelnen in ihren Eigenschaften sehr ähnlichen basischen Protein- bzw. Glycoproteinkomponenten. Erst bei pH-Werten über 11,2 beginnen die ersten Banden zur Anode zu laufen. Stickstoffgehalt, Aminosäureanalyse und elektrophoretisches Verhalten sprechen also für eine relativ hohe Basizität des Gesamtkomplexes.

Neben Tumorstärke und Toxizität (Tabelle) zeigt die Stufe [8] eine starke antigene Wirkung. Dosen von 10 µg pro Kaninchen genügen für eine gute Antikörperbildung. Antiserum vermag noch bei 500facher Verdünnung 3 Letaldosen/ml zu neutralisieren (= 1500 antitoxische Einheiten pro ml). Die Immunität kann passiv durch Antiserum übertragen werden⁸.

Aus der Mistel gewonnene Peptide wie Viscotoxin¹² oder das oben erwähnte, von WINTERFELD³ isolierte Peptid mögen ursprünglich mit unserer hochaktiven Komponente in Beziehung gestanden haben und als Rudimente daher noch Spuren der ursprünglichen Aktivität aufweisen.

Bei Untersuchungen über den noch unbekannten Wirkungsmechanismus ist auf Grund der möglichen Rolle der Tertiärstruktur (hierfür sprechen der Wirkungsverlust durch Denaturierung und das immunologische Verhalten), weiterhin auf Grund des basischen Charakters unserer Substanz (der Assoziationen mit Nukleinsäuren ermöglicht) und nicht zuletzt in Anbetracht der hohen Wirkung kleinster Dosen auch an eine Steuerung fehlgeleiteter Zellfunktionen durch Einschalten in den nuclearen Informationsmechanismus zu denken^{13,14}.

Summary. A protein fraction of *Viscum album*, possessing marked anti-tumour activity in the experimental animal, is described. The isolation procedure and some physical and chemical properties are presented.

F. VESTER und J. NIENHAUS

Institut für organische Chemie der Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe für Proteinforschung, Saarbrücken (Saar, Deutschland), 12. Januar 1965.

⁶ Für die immunologischen Untersuchungen und die Herstellung verschiedener Antiseren sind wir R. JAKUES, Ciba Aktiengesellschaft, Basel, sehr verbunden.

⁹ B. v. BOROS, Saarbrücken, danken wir für die Herstellung von Kaninchenantiserum.

¹⁰ Zu diesen Untersuchungen wurde eine von H. MAJER, Ciba Aktiengesellschaft, Basel, ausgearbeitete Elektrophoresetechnik übernommen. Verwendet wurden Membranfolien der Fa. Schleicher und Schüll.

¹¹ Für die UZ-Analysen danken wir H. MAJER, Ciba Aktiengesellschaft, Basel.

¹² K. WINTERFELD, Naturwiss. 42, 487 (1955). – G. SAMUELSSON, Svensk Farm. Tidsk. 65, 209 (1961).

¹³ F. VESTER, Proc. Intern. Congr. Biochem. 6th, New York, 241 (1964); Biochim biophys. Acta, im Druck (1965).

¹⁴ Der Firma Ciba Aktiengesellschaft, Basel, sind wir für die großzügige Förderung dieser Arbeiten zu grossem Dank verpflichtet. Besonders den Herren Dr. J. M. MÜLLER und Dr. H. MAJER danken wir für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

A New Pseudoabnormal Hemoglobin in Hemolytic Anemias

A hitherto unknown, fast-moving hemoglobin was observed for the first time in a case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Case 1. A 29-year-old female with PNH had a normal hemoglobin pattern, except for a slight increase in Hb F: Hb F 2.1% (norm. < 0.8%), Hb A₂ 1.9%, the remaining Hb being A₁. The activities of the red cell glucose-6-

phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, glutathione reductase and the amount of reduced glutathione were in the normal range. At the time of every hemolytic crisis starch block electrophoresis (pH 8.6) with subsequent benzidine staining showed no abnormal hemoglobin in the hemolysate of washed erythrocytes; in plasma, however, 3 Hb fractions were present: normal free Hb A₁, methemalbumin, and a hemoglobin moving slightly faster than Hb A₁ (Figure). The hemolytic urine contained predominantly this fast-moving component and only

small amounts of Hb A₁. Haptoglobin was absent in the blood.

Considering the normal hemoglobin content of the red cells, we must conclude that the abnormal component in plasma and urine represents a secondary hemoglobin alteration. A similar fast-moving pseudoabnormal hemoglobin was found in 2 other cases of hemolytic anemias.

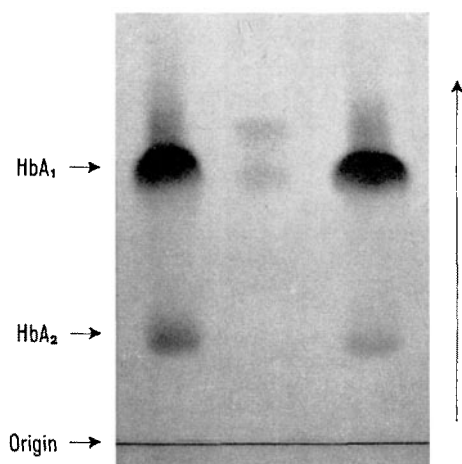
Case 2. By courtesy of Prof. DACIE, London, we received a serum sample from an adult male with hemolytic anemia following cardiac operation. The patient was operated three months previously and a valve prosthesis was placed in the aortic valve region. We found a secondary ahaptoglobinemia and in the starch block electrophoresis two benzidine positive fractions, one with the mobility of methemalbumin and the other migrating slightly faster than Hb A₁. No normal free Hb A₁ was present.

Case 3. In a blood sample deriving from an adult female with a hemolytic crisis of unknown origin, partially deteriorated during transport, a similar fraction was demon-

strable in the hemolysate corresponding to 37% of the total hemoglobin. At pH 6.5 this fraction migrated more slowly towards the cathode than Hb A₁. After the hemolytic crisis no abnormal hemoglobin was detectable in erythrocytes and plasma.

A corresponding hemoglobin fraction can easily be produced in vitro. In a fresh artificial mixture of normal hemolysate with normal plasma no abnormal hemoglobin is demonstrable, but after storage of the mixture at + 4°C for 10 days, a fast-moving hemoglobin component appears with the mobility described here above.

In all these conditions the same fractions were obtained when the hemoglobin was converted into methemoglobin, methemoglobin cyanide or carboxyhemoglobin. We must assume that, after hemolysis with consumption of the whole plasma haptoglobin, a certain alteration or combination of the free hemoglobin is produced slowly in vitro and more rapidly in vivo. Methemalbumin and hemoglobin bound to haptoglobin can be excluded, and the complex of hemoglobin with glutathione formed normally in old hemolysates never represents a fraction with sharp separation in electrophoresis. Further investigations are in progress to clarify the nature of this pseudoabnormal hemoglobin¹.



Starch block electrophoresis pH 8.6. Left and right: normal hemolysate. Middle: plasma after hemolytic crisis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (case 1). The benzidine reaction reveals free Hb A₁ and a fast-moving component. Methemalbumin is removed.

Zusammenfassung. Es wird ein pseudoanomales Hämoglobin beschrieben, das bei Zirkulation von freiem Hämoglobin im Plasma entsteht und im Urin ausgeschieden wird. Es handelt sich um eine sekundäre Veränderung des Blutfarbstoffes, die von der Haptoglobin- und Glutathionbindung verschieden ist.

H. R. MARTI

Medizinische Universitätspoliklinik, Basel (Switzerland), January 18, 1965.

¹ This investigation was supported by a grant from the Swiss National Foundation for the Development of Scientific Research. The technical assistance of Miss L. BARGETZI and Miss C. PERNER is gratefully acknowledged.

Influence of Thiol-Inhibiting Substances on the Effects of Ethyl Methane Sulphonate (EMS) on Chromosomes

Copper and zinc ions were demonstrated to enhance the aberration rate produced by EMS on chromosomes¹. Other ions were also reported to modify the chromosome breaking ability of mutagenic compounds of the mesyloxy group. The modification was stronger for monofunctional than for difunctional compounds².

The problem arises of the possible mechanisms by which ions can modify the chromosome breaking ability of EMS.

On the one hand, for copper and zinc, the possibility of a chemical reaction with EMS leading to a new substance with changed mutagenicity was ruled out³. The maximum synergistic effect was found when the ions were added before EMS treatment³. This effect was pH- and temperature-dependent.

On the other hand, it was supposed that some ions could interact with the activity of some enzymatic sys-

¹ J. and M. MOUTSCHEN-DAHMEN, *Exper.* 19, 144 (1963).

² J. MOUTSCHEN, Thesis, Université Liège (1964).

³ J. and M. MOUTSCHEN-DAHMEN, *Rad. Bot.* 3, 297 (1963).