

only 1 nucleolus. These cells have an average length of  $13.4 \pm 1.8 \mu\text{m}$  and were  $4.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$  wide, and their nuclei, an average diameter of  $3.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$ . The second or 'B' type cells (Figure 3) are considerably smaller than the A cells, and their nuclei, often multi-nucleolate, have an average length of  $5.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$  and are  $2.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$  wide.

The relative distribution of the two cell types emigrating from young and old mouse kidney explants is shown in Figures 4 and 5. It can be seen that A cells make up 80–90% of the emigrating population from young explants for the first 16 days, after which they decline and B cells rapidly become the dominant, but never the only, cell type.

In explants taken from old mouse kidneys the A cells never are the predominant cell type, only reaching 50%

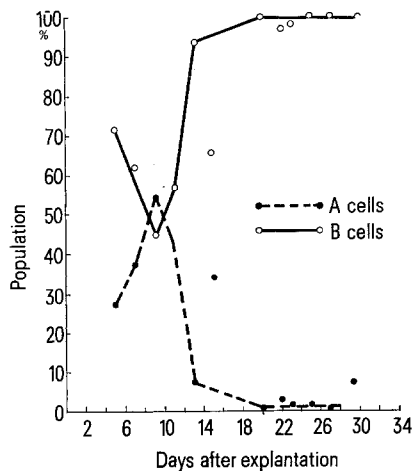


Fig. 5. Abscissa: Time (days); ordinate: average number of cells growing out of explants of old mouse kidney. ---, A cells; —, B cells.

of the total population after 8 days, and declining thereafter. The B cells are dominant from the start and continue to emigrate from the explant after A cells no longer emigrate.

When subcultured in the same medium in which the explants were placed, the A cells were capable of a least 7 population doublings, whereas the B type cells could only double 2, or at most 3, times in this medium. These cells maintained their singular morphologies during growth; we did not observe any morphological instability in either cell isolates.

Our observations lend support to the suggestion first made by SOUKUPOVA and HOLECKOVA<sup>7</sup> that '...explanted tissue looks like a mosaic of more or less active and inactive parts, and the percentage of inactive parts increases with increasing age of the donor of the organ'.

The differences in the in vitro growth ability of the A and B cells supports the hypothesis that the mosaic refers to a combination of cells with low and high growth potential, consonant with the hypothesis expounded by HAYFLICK<sup>8</sup> for the cellular basis for aging.

Before accepting this hypothesis in toto one should remember that the medium used and the ratio between the number of cells in the inoculum and the volume of medium has a powerful effect on the ability of cells to grow in vitro<sup>9</sup>. Furthermore, some cell types have been shown to be unable to survive in the absence of other cell types<sup>10</sup>. Our data are similar to those reported by FRANKS and COOPER<sup>11</sup> who reported that two predominant cell types were found in cell lines originating from human lung embryos.

<sup>7</sup> M. SOUKUPOVA and E. HOLECKOVA, *Expl Cell Res.* 33, 361 (1964).

<sup>8</sup> L. HAYFLICK, *Am. J. med. Sci.* 265, 432 (1973).

<sup>9</sup> R. HAM and L. W. MURRAY, *J. Cell Physiol.* 70, 275 (1968).

<sup>10</sup> L. M. FRANKS, P. N. RIDDLE, A. W. CARBONELL and G. O. GEY, *J. Paht.* 100, 113 (1970).

<sup>11</sup> L. M. FRANKS and T. W. COOPER, *Int. J. Cancer* 9, 19 (1972).

## Untersuchungen über stabile und während der frühen Quellungsstadien neu synthetisierte Poly(A)-RNA von *Agrostemma*-Samen

### Studies on Stable and During Early Imbibition Phases Synthesized Poly(A)-RNA of *Agrostemma githago* Embryos

M. HECKER<sup>1</sup>

Sektion Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Grimmer Strasse 88, DDR-22 Greifswald (Deutsche Demokratische Republik, DDR), 30. Juni 1975.

**Summary.** RNA isolated from dry embryos of *Agrostemma githago* seeds contains poly(A)-sequences, but in very small amounts. In the early phase of imbibition, an intensive synthesis of poly(A)-containing RNA is brought about. The importance of this synthesis of poly(A)-RNA is discussed.

Die Natur der frühen RNA-Synthese quellender Samen und ihre Bedeutung für die Samenkeimung ist umstritten<sup>2</sup>. Nach Befunden mehrerer Autoren setzt die RNA-Synthese erst in der späten Quellungsphase, möglicherweise erst kurz vor dem Radiculadurchbruch ein, so dass die Proteine in diesem Zeitraum ausschliesslich an langlebiger mRNA gebildet werden dürften<sup>3–6</sup>. In ungequollenen Samen sind solche stabilen mRNA, die bereits während der Embryogenese transkribiert wurden<sup>7</sup>, eindeutig nachgewiesen<sup>8–10</sup>. Unmittelbar nach Quellungsbeginn wurden dagegen beim Weizen<sup>11–13</sup>, Roggen<sup>14</sup>,

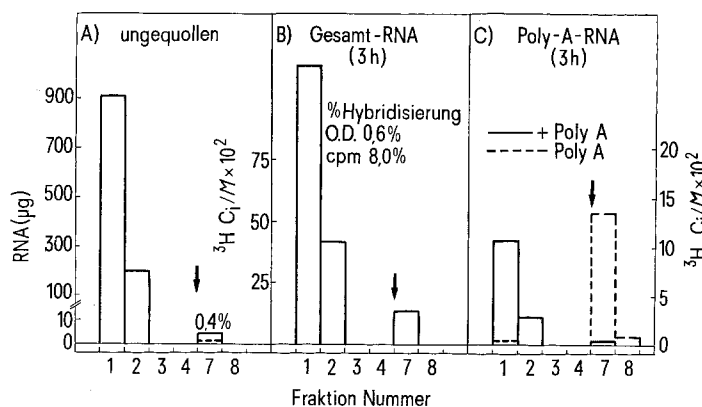
MAIS<sup>15</sup> oder bei *Phaseolus angularis*<sup>16</sup> RNA-Synthesen gemessen. Über die Natur der frühen RNA-Synthese gibt es keine einheitliche Auffassung. CHEN et al.<sup>11</sup> haben bei Weizenembryonen in den ersten Quellungsstunden Prä-rRNA- und rRNA-, aber keine mRNA-Synthesen gefunden. Auch nach ihren Vorstellungen soll die unmittelbar mit Quellungsbeginn einsetzende Proteinbiosynthese<sup>17</sup> durch langlebige mRNA gesteuert werden. Andererseits wurden von einigen Arbeitsgruppen auch Neusynthesen von Hn- bzw. mRNA während der frühen Quellungsstadien von Samen wahrscheinlich gemacht<sup>12, 15, 16</sup>.

In den letzten Jahren ist der Nachweis von Poly(A)-Sequenzen an pflanzlicher mRNA gelungen<sup>18-20</sup>. Es sollte möglich sein, die umstrittene Frage, ob mRNA in den ersten Quellungsstunden gebildet werden oder nicht, mit Hilfe der Affinitätschromatographie von RNA an Oligo-dT-Cellulose oder Poly-(U)-Sephrose eindeutig zu klären. Dabei kann natürlich nur Poly(A)-haltige mRNA erfasst werden; nach jüngsten Befunden muss auch bei Pflanzen mit dem Vorhandensein von Poly(A)-mRNA gerechnet werden<sup>21,22</sup>. In diesem Zusammenhang erscheinen Untersuchungen von BUCHOWICZ et al.<sup>23,13</sup> bemerkenswert, nach denen die früh synthetisierten mRNA quellender Weizenembryonen keine Poly(A)-Sequenzen enthalten sollen. In der vorliegenden Arbeit werden erste Ergebnisse über Poly(A)-RNA-Synthesen quellender Pflanzenembryonen mitgeteilt<sup>24</sup>, ausserdem galt es zu prüfen, ob sich in ungequollenen Embryonen gespeicherte Poly(A)-haltige RNA nachweisen lassen.

**Material und Methoden.** Die Untersuchungen wurden mit Samen von *Agrostemma githago*, Sorte Gatersleben, Ernte 1974 durchgeführt<sup>25,26</sup>. Zur Gewinnung Poly(A)-haltiger RNA wurden Embryonen aus trockenen Samen isoliert und 3 h bei 20 °C im Dunkeln unter sterilen Bedingungen mit (8-<sup>14</sup>C)-Adenin-Sulfat (spez. Akt. 12 mCi/mM, Dresden) und <sup>3</sup>H-Uracil-(5) (spez. Akt. 27,3 Ci/mM, Prag) inkubiert. Die Extraktion der RNA erfolgte mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 9,0, 1% Na-Dodecyl-Sulfat, 0,01 M MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Bentonit, 0,25% 8-Hydroxychinolin, die Präparation der RNA nach BRAVERMAN<sup>27</sup> und PERRY et al.<sup>28</sup>. Die mit Äthanol gefällte (und zum Teil durch Gelfiltration mit Sephadex G 50 gereinigte) RNA wurde in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,0005 M Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,4 M NaCl, 0,1% Na-Dodecylsulfat (Bindungspuffer für Hybridisierung an Oligo-dT-Cellulose) aufgenommen. Zur Anreicherung der Poly(A)-mRNA wurden die Nukleinsäuren auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule (etwa 100 mg) gegeben. Die Kapazität der Säule wurde mit Poly(A) überprüft. Die Elution der Poly(A)-RNA gelang mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,0005 M Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,1% Na-Dodecylsulfat (Elutionspuffer) bei 50 °C. Aliquote Teile der gebundenen und nicht gebundenen RNA wurden auf Filterpapierscheiben aufgetragen, die vor der Radioaktivitätsbestimmung wie früher beschrieben<sup>24</sup> mit Trichloressigsäure, Äthanol

und Äther gewaschen wurden. Die <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-Aktivitäten wurden getrennt im Flüssigkeitsszintillationspektrometer Tri Carb (Packard) gemessen (weitere experimentelle Details vgl. Tabellen und Figur).

- <sup>1</sup> Herrn Dr. E. SERFLING (Gatersleben, DDR) danke ich für methodische Hinweise und für die Überlassung einiger Chemikalien.
- <sup>2</sup> Z. U. AHMED und O. P. KAMRA, FEBS Lett. 51, 277 (1975).
- <sup>3</sup> N. D. HALLAM, B. E. ROBERTS und D. J. OSBORNE, Planta 105, 293 (1972).
- <sup>4</sup> V. WALBOT, Planta 108, 161 (1972).
- <sup>5</sup> B. SIELIWANOWICZ und I. CHMIELEWSKA, Bull. Acad. pol. Sci., Sér. Sci. biol. 27, 399 (1973).
- <sup>6</sup> P. W. MELERA, Plant Physiol. 48, 73 (1971).
- <sup>7</sup> J. N. IHLE und L. DURE, Biochem. biophys. Res. Commun. 36, 705 (1969).
- <sup>8</sup> L. S. DURE und L. C. WATERS, Science 147, 410 (1965).
- <sup>9</sup> D. P. WEEKS und A. MARCUS, Biochim. biophys. Acta 232, 671 (1971).
- <sup>10</sup> G. A. SCHULTZ, D. CHEN und E. KATCHALSKI, J. molec. Biol. 66, 379 (1972).
- <sup>11</sup> D. CHEN, G. A. SCHULTZ und E. KATCHALSKI, Nature New Biol. 231, 69 (1971).
- <sup>12</sup> E. REJMAN und J. BUCHOWICZ, Phytochemistry 12, 271 (1973).
- <sup>13</sup> M. DOBRZANSKA-WIERNIKOWSKA und J. BUCHOWICZ, Bull. Acad. pol. Sci., Sér. Sci. biol. 22, 663 (1974).
- <sup>14</sup> D. J. OSBORNE, B. E. ROBERTS, P. I. PAYNE und S. SEN, in Mechanisms of Regulation of Plant Growth (The Royal Society of New Zealand, Wellington 1974), p. 805.
- <sup>15</sup> C. VAN DE WALLE und R. DELTOUR, FEBS Lett. 49, 87 (1974).
- <sup>16</sup> A. WATANABE, T. NITTA und T. SHIROYA, Plant Cell Physiol. 14, 29 (1973).
- <sup>17</sup> A. MARCUS, J. FEELEY und T. VOLCANI, Plant Physiol. 41, 1167 (1966).
- <sup>18</sup> C. VAN DE WALLE, FEBS Lett. 34, 31 (1973).
- <sup>19</sup> T. J. V. HIGGINS, J. F. B. MERCER und P. B. GOODWIN, Nature New Biol. 246, 68 (1973).
- <sup>20</sup> D. P. S. VERMA, D. T. NASH und H. M. SHULMAN, Nature 251, 74 (1974).
- <sup>21</sup> R. S. S. FRASER, Eur. J. Biochem. 50, 529 (1975).
- <sup>22</sup> V. WALBOT, Plant Physiol. 53, suppl. 38 (1974).
- <sup>23</sup> J. BUCHOWICZ, persönliche Mitteilung.
- <sup>24</sup> M. HECKER, Biochem. Physiol. Pflanzen 166, 461 (1974).
- <sup>25</sup> H. BORRIS, Jb. wiss. Bot. 89, 254 (1940).
- <sup>26</sup> M. HECKER, Biol. Rdschau 12, 275 (1974).
- <sup>27</sup> G. BRAVERMAN, Methods in Cell Biology (Academic Press, New York, London 1973), vol. 7, p. 1.
- <sup>28</sup> R. P. PERRY, J. LA TORRE, D. E. KELLEY und J. R. GREENBERG, Biochim. biophys. Acta 262, 220 (1972).



Hybridisierung von RNA aus trockenen und quellenden *Agrostemma*-Embryonen an Oligo-dT-Cellulose. A) Die aus trockenen Embryonen (400 mg) präparierte RNA wurde auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule gegeben. Die nicht gebundene RNA wurde mit Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Nach 6 Fraktionen (je 2 ml) wurde die Poly(A)-RNA mit Elutionspuffer eluiert (Fraktionen 7 und 8, mit Pfeil gekennzeichnet). Wird die RNA vor der Hybridisierung 10 min bei Zimmertemperatur mit 100 µg Poly(U) geschüttelt, erfolgt keine Hybridisierung (gestrichelte Linie). B) Aus trockenen Samen isolierte *Agrostemma*-Embryonen wurden unter sterilen Bedingungen 3 h mit 200 µCi <sup>3</sup>H-Uracil-(5) inkubiert. 8% der nach BRAVERMAN<sup>27</sup> gewonnenen radioaktiv markierten RNA hybridisieren an Oligo-dT-Cellulose. C) Die Poly(A)-RNA-Fraktion (vgl. B) wurde mit dem gleichen Volumen Bindungspuffer (0,8 statt 0,4 M NaCl) versetzt und erneut auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule aufgetragen; es erfolgt nahezu vollständige Hybridisierung (gestrichelte Linie). Wird die Säule vor dem Experiment mit Poly(A) (100 µg in 1 ml Bindungspuffer) beladen, erfolgt keine Hybridisierung (durchgezogene Linie).

Tabelle I. Hybridisierung  $^3\text{H}$ -Uracil- und  $^{14}\text{C}$ -Adenin-markierter RNA an Oligo-dT-Cellulose

Fraktion	cpm		$^{14}\text{C}$ -Adenin	% Hybridisierung	
	$^3\text{H}$ -Uracil	$^{14}\text{C}$ -Adenin	$^3\text{H}$ -Uracil	$^3\text{H}$ -Uracil	$^{14}\text{C}$ -Adenin
Nicht gebundene RNA	5729	4766	0,83		
Gebundene RNA	590	1116	1,9	9,3%	19%

30 Embryonen wurden aus ungequollenen *Agrostemma*-Samen isoliert und 3 h in 100  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Uracil-(5) und in 2  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Adenin-(8)-Sulfat bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Die Extraktion der RNA und die Hybridisierung erfolgten wie beschrieben (vgl. auch Figur).

Tabelle II. Behandlung von  $^3\text{H}$ -Uracil- und  $^{14}\text{C}$ -Adenin-markierter Poly(A)-RNA mit RNase – Nachweis von Poly(A)-Sequenzen

Fraktion	cpm		$^{14}\text{C}$ -Adeninanteil (%)	$^{14}\text{C}$ -Adenin
	$^3\text{H}$ -Uracil	$^{14}\text{C}$ -Adenin		$^3\text{H}$ -Uracil
1 Poly(A)-RNA	763	1211	100	1,6
2 RNase-behandelt (Papierscheiben nicht gewaschen)	23	750	62	31,9
3 RNase-behandelt (Papierscheiben gewaschen)	0	456	38	$\infty$

Die Präparation der  $^3\text{H}$ -Uracil- und  $^{14}\text{C}$ -Adenin-markierten Poly(A)-RNA erfolgte wie in Tabelle I beschrieben. Die Poly(A)-RNA wurde nach Zugabe von 100  $\mu\text{g}$  Poly(A) und 200  $\mu\text{g}$  Hefe-RNA durch 3 Volumen Äthanol bei –20 °C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde in 1 ml 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5; 0,3 M NaCl aufgenommen und mit 100  $\mu\text{g}$  Pankreas-RNase (Worthington, Biochem. Corpor.) 1 h bei 37 °C inkubiert. Die RNase wurde durch Schütteln mit Chloroform/Phenol (1:1) entfernt und die resistente RNA nach Zugabe von 100  $\mu\text{g}$  Hefe-RNA und 3 Volumen Äthanol bei –20 °C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde in 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und auf Filter papierscheiben aufgetragen. Die  $^3\text{H}$ -Uracil- und  $^{14}\text{C}$ -Adenin-Aktivität wurde sofort (Variante 2) und nach Trichloressigsäure-, Äthanol- und Äther-Behandlung der Scheiben (vgl. <sup>24</sup>, Variante 3) im Tri Carb getrennt bestimmt.

**Ergebnisse und Diskussion.** In trockenen *Agrostemma*-Samen gespeicherte RNA vermag an Oligo-dT-Cellulose nur zu 0,3 bis 0,4% zu hybridisieren, dagegen werden etwa 10 bis 20% (10% bei  $^3\text{H}$ -Uracil-Markierung, 20% bei  $^{14}\text{C}$ -Adenin-Markierung, vgl. Tabelle I) der in den ersten 3 Quellungsstunden gebildeten RNA an Oligo-dT-Cellulose gebunden. Dabei erhöht sich die optische Dichte der gebundenen Fraktion nur geringfügig und die der ungebundenen überhaupt nicht, so dass die neu synthetisierte RNA an der in trockenen Samen gespeicherten mengenmässig nur einen geringen Anteil haben dürfte. Bei Verwendung von Poly(U)-Sepharose waren die Mengen hybridisierbarer RNA ähnlich, wobei sich jedoch die an Poly(U)-Sepharose bei hohen Ionenstärken gebundene RNA schwerer extrahieren liess als bei Verwendung von Oligo-dT-Cellulose. Deshalb haben wir für unsere Untersuchungen Oligo-dT-Cellulose-Säulen vorgezogen.

Folgende Befunde schliessen eine unspezifische Bindung von RNA an die Oligo-dT-Cellulose aus und sollen für den Nachweis von Poly(A)-Sequenzen herangezogen werden: 1. Im Doppelmarkierungsexperiment ist das  $^{14}\text{C}$ -Adenin/ $^3\text{H}$ -Uracil-Verhältnis der gebundenen Fraktion im Vergleich zur nicht gebundenen deutlich erhöht (1,9 zu 0,83, Tabelle I). 2. Wird Poly(A)-RNA auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule gebracht, die vorher mit 100  $\mu\text{g}$  Poly(A) beladen wurde, erfolgt keine Hybridisierung, im anderen Fall (ohne Poly(A)) nahezu vollständige Bindung (Figur C). 3. Wird die nicht gebundene RNA ein zweites Mal auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule gegeben, erfolgt keine weitere Bindung (Ergebnisse nicht dargestellt). 4. Wird die gebundene Fraktion, in der Poly(A)-mRNA zu erwarten ist, mit pankreatischer RNase behandelt, kann nach der Fällung der hochmolekularen RNase-

resistenten Anteile nur noch  $^{14}\text{C}$ -Adenin und nicht mehr  $^3\text{H}$ -Uracil nachgewiesen werden (Tabelle II). Etwa 30 bis 40% der in der gebundenen Fraktion vorliegenden  $^{14}\text{C}$ -Adenin-Aktivität werden nicht von pankreatischer RNase abgebaut. Die genaue Charakterisierung der Poly(A)-Sequenzen erfolgt an anderer Stelle <sup>29</sup>.

Die Hybridisierungsexperimente verdeutlichen, dass in den ersten Quellungsstunden von *Agrostemma*-Samen eine intensive Synthese von Poly(A)-RNA (etwa 10% der Synthesekapazität) stattfindet; andererseits dürfte in trockenen Samen nur sehr wenig Poly(A)-mRNA (etwa 0,4% der Gesamt-Menge oder weniger) gespeichert werden.

Ungequollene Baumwollembryonen enthalten langlebige mRNA, die während der frühen Embryoentwicklung transkribiert wurden <sup>7</sup>. Befunden von WALBOT <sup>28</sup> zufolge sollen diese stabilen mRNA keine Poly(A)-Sequenzen enthalten. WALBOT et al. <sup>30</sup> vertreten die Auffassung, dass die für eine Protease codierende stabile mRNA nach der Transkription im Kern gespeichert wird und dort bis zum Keimungsbeginn vor einer Translation geschützt ist <sup>31, 32</sup>. Erst nach Abschluss der Samenreife und nach Einsetzen der Quellungsprozesse soll im Kern die Polyadenylation der stabilen mRNA (bzw. HnRNA) erfolgen, möglicherweise als Voraussetzung für den Transport der mRNA in das Cytoplasma und für ihre Translation. Dabei erschei-

<sup>29</sup> M. HECKER, in Vorbereitung.

<sup>30</sup> V. WALBOT, A. CAPDEVILLA und L. S. DURE, Biochem. biophys. Res. Commun. 60, 103 (1974).

<sup>31</sup> J. N. IHLE und L. S. DURE, Biochem. biophys. Res. Commun. 38, 995 (1970).

<sup>32</sup> B. HARRIS und L. S. DURE, Biochemistry 13, 5463 (1974).

nen uns Untersuchungen von SLATER et al.<sup>33,34</sup> bemerkenswert, nach denen die während der Entwicklung des Seeigels transkribierte langlebige mRNA über wenig Poly(A)-Reste verfügt; erst nach der Aktivierung und Demaskierung der stabilen mRNA, die mit der Befruchtung des Eis einsetzen, werden die Oligo(A)-Sequenzen im Cytoplasma (nicht im Kern<sup>30</sup>) verlängert.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, ob im quellenden *Agrostemma*-Embryo die Poly(A)-Sequenzen an neu transkribierte Hn-mRNA oder an gespeicherte Poly(A)-mRNA angefügt werden. Um diese aktuelle Problematik einer Klärung näherzubringen, haben wir die Hybridisierung <sup>3</sup>H-Uracil-markierter und <sup>14</sup>C-Adenin-markierter RNA miteinander verglichen. Da auf die Poly(A)-Sequenzen etwa 30 bis 40% der <sup>14</sup>C-Adenin-Markierung entfallen (Tabelle II), ist von vornherein ein erheblich höherer Hybridisierungsgrad der Adenin-markierten RNA zu erwarten. Die erhaltenen Befunde (9% bei <sup>3</sup>H-Uracil-markierter RNA, 19% bei <sup>14</sup>C-Adenin-markierter RNA, Tabelle I) sprechen unseres Erachtens dafür, dass die Mehrzahl der Poly(A)-Reste an neu synthetisierte Hn-mRNA angefügt wird; andererseits schliessen unsere vorläufigen Resultate die Möglichkeit einer Polyadenylation stabiler mRNA nicht völlig aus.

Zu klären bliebe weiterhin, ob mRNA aus trockenen *Agrostemma*-Samen tatsächlich Poly(A)-Sequenzen enthält oder ob die Bindung an Oligo-dT-Cellulose unspezifischer Natur ist. Wird RNA aus trockenen Embryonen vor der Hybridisierung mit Poly(U) geschüttelt, erfolgt keine Hybridisierung. Dieses Experiment (siehe Figur A) kann man als Hinweis auf die Existenz langlebiger

Poly(A)-mRNA gelten lassen, der exakte Nachweis wäre beispielsweise durch Hybridisierung mit <sup>3</sup>H-Poly(U) zu erbringen<sup>35</sup>.

Der geringe Anteil von Poly(A)-RNA an der Gesamt-RNA trockener Samen muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass nur wenig langlebige mRNA in *Agrostemma*-Samen gespeichert wird. Durch die Affinitätschromatographie wird lediglich Poly(A)haltige RNA erfasst. Ob daneben noch Poly(A)-mRNA enthalten ist, wie das von WALBOT<sup>23</sup> bei Baumwollsamens vermutet wird, muss offen bleiben.

Die Synthese Poly(A)-haltiger RNA, die im Gegensatz zu Befunden anderer Autoren<sup>11,13,23,36</sup> bei *Agrostemma* unmittelbar mit der Stoffwechselaktivierung quellender Samen einsetzt, lässt eine wesentliche physiologische Bedeutung vermuten. An anderer Stelle soll gezeigt werden, dass die frühe Proteinbiosynthese quellender *Agrostemma*-Embryonen von einer vorangegangenen RNA-Synthese unmittelbar abhängig ist<sup>37</sup>. Inwieweit an der frühen Proteinsynthese neben neu synthetisierter mRNA auch stabile, in ruhenden Samen gespeicherte beteiligt ist, ist Gegenstand der zur Zeit laufenden Untersuchungen.

<sup>33</sup> D. W. SLATER, I. SLATER und D. GILLESPIE, *Nature Lond.* 240, 333 (1972).

<sup>34</sup> I. SLATER, D. GILLESPIE und D. W. SLATER, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 70, 406 (1973).

<sup>35</sup> M. D. NILSSON und T. HULTIN, *FEBS Lett.* 52, 269 (1975).

<sup>36</sup> M. DOBRZANSKA, M. TOMASZEWSKI, Z. GRZELCZAK, E. REJMAN und J. BUCHOWICZ, *Nature, Lond.* 244, 507 (1973).

<sup>37</sup> M. HECKER, M. WIEDMANN, K.-H. KÖHLER und E. SERFLING, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, im Druck.

## Levels of $\beta$ -Trace Protein and Lysozyme in Human Amniotic Fluids

M. ADINOLFI, SUSAN A. HADDAD, SUSAN E. BECK, ISABELLA LAM FUNG<sup>1</sup> and E. OSSERMAN<sup>1</sup>

*Paediatric Research Unit, Prince Philip Laboratories, Guy's Hospital Medical School, London SE1 9RT (England), and Institute of Cancer Research, Columbia University, New York (N.Y. 10032, USA), 14 July 1975.*

**Summary.** The levels of  $\beta$ -trace protein and lysozyme were estimated in amniotic fluids from normal fetuses and from fetuses with neural tube defects. The values of these proteins in normal amniotic fluids were found to be similar to those detected in fetuses with anencephaly and spina bifida. The levels of lysozyme were shown to be correlated with gestational age.

Studies from BROCK et al.<sup>2,3</sup> have shown that high levels of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) are present in the amniotic fluid of fetuses with anencephaly and/or spina bifida. Consequently, the estimation of this fetal protein in amniotic fluid is widely used as a diagnostic test for the antenatal detection of neural tube defects<sup>4</sup>.

Since the levels of AFP are elevated in the cerebrospinal fluid (CSF) from human fetuses less than 25 weeks old<sup>5</sup> it has been suggested that the abnormal, high values of this protein in the amniotic fluids of fetuses with 'open' neural tube defects are caused by the transfer of AFP from CSF into the amniotic cavity.

Recently high counts of macrophages have been detected in amniotic fluids of fetuses with CNS defects<sup>6,7</sup> and it appears that this test may be useful for the diagnosis of such abnormalities. These observations have prompted us to estimate the amniotic levels of  $\beta$ -trace protein, a major component of CSF<sup>8,9</sup> and compare them with those of AFP, lysozyme (LZM) and albumin.

**Materials and methods.** 46 samples of amniotic fluids were collected by amniocentesis in the course of an in-

vestigation on the incidence of fetal chromosome abnormalities. Only samples from fetuses which were found free from chromosome abnormalities were tested. Soon after being collected, the amniotic fluids were centrifuged and the precipitates discarded.

<sup>1</sup> Institute of Cancer Research, Columbia University, New York, N.Y. 10032, USA.

<sup>2</sup> D. J. H. BROCK and R. G. SUTCLIFFE, *Lancet* 2, 197 (1972).

<sup>3</sup> D. J. H. BROCK, A. E. BOLTON and J. M. MONAGHAN, *Lancet* 2, 923 (1973).

<sup>4</sup> *Lancet* (Leader) *Towards the Prevention of Spina bifida*, 1, 907 (1974).

<sup>5</sup> M. J. SELLER and M. ADINOLFI, *Archs Dis. Childhood* 50, 484 (1975).

<sup>6</sup> G. R. SUTHERLAND, D. J. H. BROCK and J. B. SCRIMGEOUR, *Lancet* 1, 1098 (1973).

<sup>7</sup> G. R. SUTHERLAND, D. J. H. BROCK and J. B. SCRIMGEOUR, *J. med. Genet.* 12, 135 (1975).

<sup>8</sup> G. M. HOCHWALD and G. J. THORBECKE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 109, 91 (1962).

<sup>9</sup> R. PENNY and E. F. OSSERMAN, *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 49, 111 (1971).