

VERGLEICHENDE HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG
DER NUKLEOPROTEIDE IN DEN BLUTZELLEN]
VON WIRBELTIERARTEN
I. UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG PROTEOLYTISCHER
ENZYME

GY. RAPPAY und GY. BALOGH

(Eingegangen am 26. März 1960)

Im letzten Jahrzehnt sind über die Nukleoproteide (NP) ständig mehr vergleichende Arbeiten erschienen, die teils auf qualitativen, teils auf quantitativen histochemischen und biochemischen Methoden beruhen. Besondere Bedeutung kommt den Versuchen von MIRSKY und RIS (1949) zu, die sie an den isolierten Chromosomen von Individuen verschiedener Arten durchgeführt haben, weiterhin den Arbeiten von GERZELI, CASATI und MENEGETTI GENARO (1956), die einen entschiedenen Zusammenhang zwischen dem Desoxyribonukleinsäuregehalt (DNS), dem Kernvolumen und dem Verhältnis des Kern-Plasmavolumens der Erythrozyten mehrerer Wirbeltierarten festgestellt haben. Hierzu rechnen sich auch die von PERUGINI und Mitarbeitern (1958) an Erythroblasten und von VIALLI (1957) an den Erythrozyten zahlreicher Wirbeltierarten vorgenommenen quantitativen DNS-Bestimmungen. Bereits aus dieser sehr kurzen Literaturübersicht ergeben sich zwei Hauptzüge der erwähnten vergleichenden Versuche. Erstens handelt es sich fast ausnahmslos um quantitative Untersuchungen, was zweifellos den immer stärker verbreiteten und von vielen für grundlegend gehaltenen zytometrischen Methoden zu verdanken ist. Zweitens fällt auf, daß sich die Forscher — von wenigen Ausnahmen abgesehen — am intensivsten mit einem Bestandteil des Desoxyribonukleoproteidkomplexes (DNP), mit der DNS, befassen. Nur sehr wenige haben die andere DNP-Komponente, das basische Eiweiß, zum Objekt ihrer Versuche gewählt. Daß die Erforschung der Kerneiweiße noch sozusagen in den Kinderschuhen steckt, beruht wahrscheinlich darauf, daß die Eiweiß-Histochemie auch heute nur über wenig Methoden verfügt, mit denen in dieser wichtigen Frage zuverlässige Angaben gewonnen werden können.

Im Rahmen voriger Versuche (RAPPAY, 1959) haben wir das Verhalten der mit proteolytischen Enzymen (Trypsin, Pepsin) behandelten Säugertymusdrüse und -Lymphgewebe untersucht. Nach der Enzymbehandlung wurde die DANIELLISCHE Tetrazonium- und die FEULGENSCHE Reaktion durchgeführt. Bei der Auswertung der Resultate stellte sich heraus, daß die unsererseits benutzten proteolytischen Enzyme nicht gleichartig wirken und diese

Methode zur Durchführung weiterer vergleichender Untersuchungen geeignet ist.

In der hier zu besprechenden Untersuchungsserie waren die Versuchsobjekte die Erythrozyten von Wirbeltieren, die verschiedene Klassen und Ordnungen repräsentieren. Die Zellen wurden nach Fixierung verschieden lange mit proteolytischen Enzymen inkubiert und anschließend die Tetrazonium- und Feulgen-Reaktion ausgeführt. Wie die Untersuchungen ergaben, werden die Blutzellen der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Tiere nach kürzerer Enzymwirkung verdaut als die Zellen der höheren Tiere. Aus den Versuchsergebnissen ziehen wir den Schluß, daß in den NP des Kerns der Blutzellen im Verlauf der Phylogenese Veränderungen eintreten.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an folgenden Tierarten vorgenommen: *Fische* = Karpfen (*Cyprinus carpio*); *Amphibien* = Rippenmolch (*Pleurodeles waltlii*), Frosch (*Rana esculenta*); *Reptilien* = Eidechse (*Lacerta agilis*); *Vögel* = Taube (*Columba domestica*), Huhn (*Gallus domesticus*). Das Blut gewannen wir von den Versuchstieren durch Dekapitation oder Venenpunktion. Die Blutgerinnung wurde mit Natriumzitrat verhindert. Im Verlauf der Behandlungen waren wir bestrebt, dieselben Bedingungen so gut wie möglich zu gewährleisten, weshalb wir Ausstriche in der Weise herstellten, daß drei oder vier Blutarten auf ein und demselben Objektträger aufgetragen wurden. Diese Ausstriche wurden 15 Minuten in Carnoy-Lösung fixiert. Sowohl an den Kontrollpräparaten als auch an den mit proteolytischen Enzymen behandelten Präparaten wurde die Daniellische Tetrazonium-Reaktion (unter Anwendung vom stabilisierten Diazoniumsalz Diazo Fast Blue B und H-Säure, laut PEARSE, 1954) und die Feulgensche Reaktion ausgeführt. Außer diesen Reaktionen kam Sudanschwarz-Färbung mit in 70%igem Alkohol gesättigter Sudan Black B-Lösung zur Anwendung.

Zusammensetzung der Inkubationsflüssigkeiten: a) Trypsin-Lösung. 1 ml des 0,05 M Phosphatpuffers pH 6,7 enthielt 0,3 mg Trypsin B. D. H. b) Pepsin-Lösung. 0,02 N HCl enthielt je ml 2 mg Pepsin cryst. (Ph. Hung. V). Die Kontroll-Lösung war in beiden Fällen enzymfreie Inkubationslösung. Die Inkubation erfolgte mit Trypsin-Lösung 1–25 Minuten, mit Pepsin-Lösung 1–60 Minuten im Thermostaten bei 37° C.

Versuche

Die mikroskopische Untersuchung der ohne vorherige Behandlung ausgeführten Tetrazonium-Reaktion ergab, daß in den Erythrozyten sämtlicher unsererseits untersuchten Arten das Zytoplasma eine schwache und der Kern eine sehr intensive Reaktion zeigte. Eine sehr auffallende, starke Reaktion gaben die weißen Blutzellen sämtlicher Arten, insbesondere die Lymphozyten. In den Kontrollpräparaten trat die Feulgensche Reaktion typischerweise im Kern in Erscheinung. Eine gleichmäßig intensive Reaktion trat nach 10 Minuten dauernder Salzsäurehydrolyse zutage. Nach Sudanschwarz-Färbung war im Zytoplasma der Fisch-Erythrozyten sehr blasse Färbung und im Bereich der Kernmembran und Zellgrenze in den Erythrozyten sämtlicher Arten, insbesondere aber in den Zellen der Fische, mittelstarke Reaktion zu beobachten.

1. Wirkung der Trypsinbehandlung

Bereits nach sehr kurzer Behandlung (nach 60 Sekunden) war zu sehen, daß die Tetrazonium-Reaktion, mit den Kontrollpräparaten verglichen, in den Erythrozyten diffuser wurde, das Zytoplasma stärker gefärbt war und die Kerne in den Zellen sämtlicher untersuchten Arten geschwellt waren. Die intensivste Zytoplasmafärbung fanden wir in den Blutzellen der Amphibien. Farbintensität und Lokalisation der Tetrazonium-Reaktion änderten sich parallel mit der Erhöhung der Inkubationsdauer. Nach 4 Minuten währen-

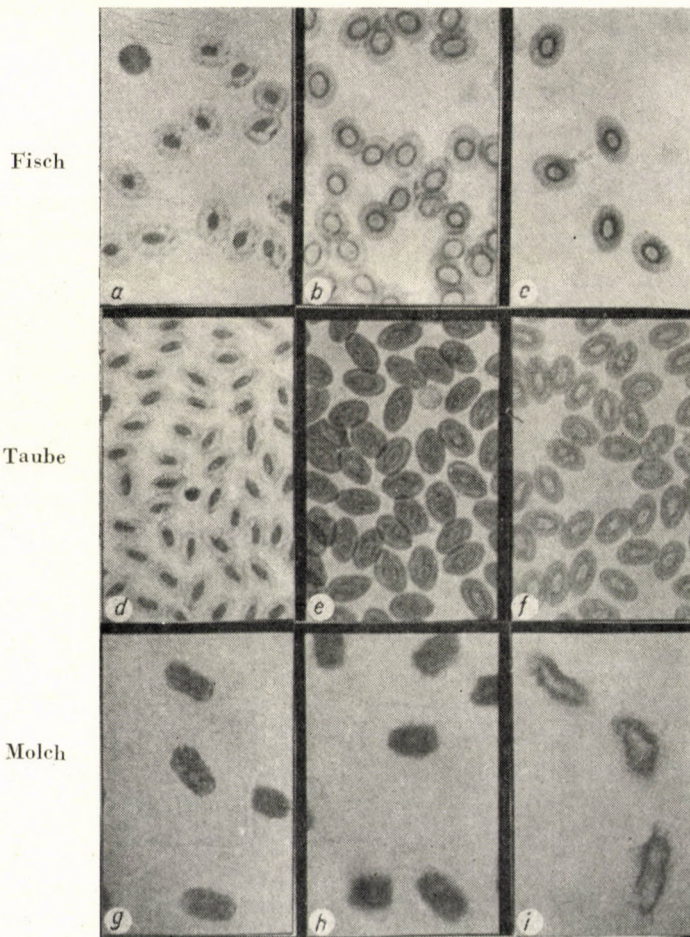


Abb. 1. Blutausstrich von Fisch, Taube und Rippenmolch. *a-f* — Tetrazonium-Reaktion, *g-i* — Feulgen-Reaktion. 40× Obj. *a, d, g*) Kontrolle; *b, e, h*) 4 Minuten mit Trypsin verdaut; *c, f, i*) 25 Minuten mit Trypsin verdaut

der Verdauung war die auffallendste Veränderung in den Fisch-Erythrozyten zu beobachten. Die starke Tetrazonium-Reaktion im Kern war verschwunden, d. h. eine sehr blasse Reaktion im Kern zu sehen. Dagegen wies die Kernmembran eine sehr intensive Reaktion auf. In den Blutzellen der anderen Tiere war die Farbreaktion im Zytoplasma intensiver, während die Tauben-Lymphozyten interessanterweise ihre Färbung verloren. In bezug auf die Färbung verhielten sie sich wie die Erythrozytenkerne des Fisches. Eine wesentliche Veränderung trat im weiteren erst nach der Inkubationsdauer von 18 Minuten ein. Zu diesem Zeitpunkt war der Erythrozytenkern bei allen untersuchten Arten blasser gefärbt, nur bei den Fischen war die Zellfärbung unverändert. Nach 25 Minuten dauernder Inkubation hatten sämtliche Zellkerne ihre Färbung verloren, aber das Zytoplasma der Zellen gab eine unverändert starke Tetrazonium-Reaktion (Abb. 1, a-f).

Die parallel durchgeführte Feulgensche Reaktion zeigte ein ähnlich variables Bild. Bis zur 3.—4. Minute fanden wir im Vergleich mit den Kontrollen keine Veränderung. Nach einer Inkubation von 4 Minuten war die Feulgensche Reaktion bei den Kernen der Fisch-Erythrozyten nur an den peripheren Randabschnitten zu beobachten. Dieselbe Veränderung sahen wir in den Zellen der anderen Arten erst nach längerer Behandlung, nach 25 Minuten (Abb. 1, g-i).

Die Sudanschwarz-Färbung wurde nach einer Verdauung von 25 Minuten vorgenommen. An der der Zell- und Kernmembran der Fisch-Erythrozyten entsprechenden Stelle war ein intensiv dunkel gefärbter Ring anzutreffen. Diese Färbung trat in den Zellen der anderen Spezies weniger charakteristisch zutage (Abb. 2).

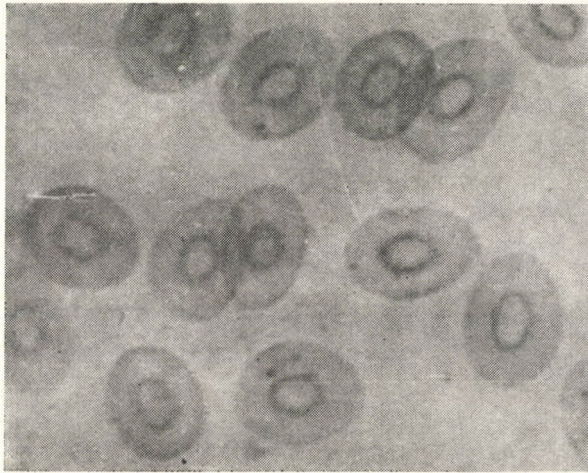


Abb. 2. Blutausstrich vom Fisch. Sudan Black B-Färbung, 40× Obj. 25 Minuten mit Trypsin behandelt

2. Die Wirkung der Pepsinbehandlung

Bei den mit Pepsin vorgenommenen Versuchen wurde die Inkubationsdauer verlängert, weil die Zelleiweiße anlässlich ähnlicher Untersuchungen an anderen Objekten erst nach längerer Inkubationsdauer verdaut worden waren. In den ersten 15 Minuten der Inkubation trat im Bild der Zellen, mit den Kontrollpräparaten verglichen, überhaupt keine Veränderung ein. Nach 20 Minuten dauernder Inkubation war das Zytoplasma der Zellen aller Arten — mit Ausnahme der Amphibien-Erythrozyten — blasser gefärbt, die Tetrazonium-Reaktion der Zellkerne jedoch völlig intakt geblieben. Nach einer Inkubation von 25 Minuten war die Färbung im Zytoplasma sämtlicher Zellen verschwunden, lediglich die bloßen Kerne traten hervor. Auch nach der längsten Inkubationsdauer (60 Minuten) zeigten die Zellkerne intensive Tetrazonium-Reaktion.

Die Farbintensität der Feulgenschen Reaktion blieb von der ersten bis zur letzten Minute der Inkubation gleichmäßig intensiv.

Besprechung

Trypsin und Pepsin sind Endopeptidasen mit bekannter proteolytischer Wirkung. Nach neueren biochemischen Untersuchungsergebnissen (HAUROVITZ, 1950) besitzen diese beiden Enzyme einen unterschiedlichen Angriffspunkt. Unter entsprechenden Bedingungen werden von Trypsin die basischen, von Pepsin die an aromatischen Aminosäuren reichen Eiweiße gespalten. Mit der unsererseits angewandten Daniellischen Tetrazonium-Reaktion lassen sich sowohl die basischen wie die aromatische Aminosäuren enthaltenden Eiweiße nachweisen; nach dem heutigen Stand unseres Wissens ist diese Reaktion zum Nachweis der tyrosin-, tryptophan- und histidinhaltigen Eiweiße geeignet.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate fiel anlässlich der Untersuchung der trypsinbehandelten Präparate auf, daß sich die Farbintensität der Tetrazonium-Reaktion im Erythrozytenkern der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Exemplare (Fisch) nach sehr kurzer Enzymbehandlung wesentlich verringerte. In denselben Zellen der phylogenetisch höher entwickelten Tiere blieb die Eiweißreaktion des Kerns längere Zeit intakt und glich erst nach 25 Minuten wärend der Verdauung der an den Fischzellen beobachteten Reaktion. Dieses Verhalten der Reaktion läßt sich unseres Erachtens auf mehrere Ursachen zurückführen. Vor allem ist anzunehmen, daß sich die Aminosäurezusammensetzung des Kerneiweißes in den Blutzellen der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Lebewesen — im vorliegenden Fall des Fisches — von der Zusammensetzung bei den höher entwickelten Tieren unterscheidet. Unser Versuch bietet aller-

dings keinen Beweis für diese Annahme, weil aus der Farbintensitätsveränderung der Reaktion in keiner Weise auf die Aminosäurezusammensetzung geschlossen werden kann. Viel plausibler erscheint die Vermutung, daß die Ursache der beobachteten Veränderungen auf das wechselseitige Verhältnis der Komponenten im Eiweiß-Nukleinsäurekomplex der verschiedenen Tierarten, d. h. auf die eventuellen quantitativen Beziehungen dieser beiden Komponenten der NP zurückgeführt werden muß.

Bei der Untersuchung der quantitativen Beziehungen zwischen dem Residualeiweiß und der DNS in den Chromosomen, die aus Zellen verschiedener Arten bzw. gleicher Arten, aber verschiedener Organe gewonnen wurden, haben MIRSKY und RIS festgestellt, daß in den aus Erythrozyten — und interessanterweise aus der Thymusdrüse — isolierten Chromosomen die Residualeiweißmenge im Verhältnis zum DNS-Gehalt sehr gering, demgegenüber in den aus Leber-, Nieren- und Pankreaszellen isolierten Chromosomen das Verhältnis umgekehrt ist. Angesichts dieser Literaturangabe wirkt unsere vorhin erwähnte Annahme bereits wahrscheinlicher, d. h. im Verlauf der Phylogenese kommt es offenbar zu einer Veränderung der Residualeiweißmenge, und vielleicht manifestiert sich diese Veränderung in unseren trypsinbehandelten Präparaten. Darauf scheint auch unsere Beobachtung hinzuweisen, daß sich der Kern der phylogenetisch höher entwickelten Tauben-Lymphozyten bei gleicher Behandlungsdauer ebenso verhielt wie der Kern der Fisch-Erythrozyten.

Im Rahmen unserer Versuche erscheint weiterhin die Wahrnehmung interessant, daß sich die Farbintensität und Lokalisation der Feulgenschen Reaktion parallel zur Trypsinbehandlung veränderte. Aus dieser Veränderung geht unzweifelhaft hervor, daß die feulgenpositive Kernsubstanz allmählich verschwand bzw. nur an gewissen Stellen — an den Randabschnitten der Zellkerne — erhalten blieb. Auch diese Veränderungen führen wieder zu Hypothesen. Diese Veränderung der Feulgenschen Reaktion könnte so erklärt werden, daß wir die Spezifität der Reaktion in Zweifel ziehen, d. h. annehmen, nur die Eiweißfraktion der intakten NP sei imstande Leukofuchsin wieder rot zu färben, und daß die eigentliche Reaktion nicht von der DNS verursacht werde. Gegen diese Annahme lassen sich zahlreiche Angaben anführen, welche die Spezifität der Feulgenschen Reaktion beweisen. Man könnte auch die Frage stellen, ob das Trypsin nicht mit Nuklease verunreinigt gewesen und das Verschwinden der Feulgenschen Reaktion auf die Wirkung der verunreinigenden Desoxyribonuklease zurückzuführen sei. Gegen diese Annahme spricht unsere bei anderen Untersuchungen gemachte Beobachtung, wonach die Objekte von chemisch reiner Desoxyribonuklease erst nach 16stündiger Inkubation verdaut wurden, während zugleich die Eiweißreaktion der untersuchten Zellen intakt geblieben ist. Die in den vorliegenden Untersuchungen angewandte Trypsinverdauung war von so kurzer Dauer, daß eine etwaige

Verunreinigung keine wesentliche Wirkung auf die DNS ausgeübt haben kann. Letzten Endes müssen wir die Hypothese akzeptieren, daß der NP-Komplex im Verlauf der Trypsinverdauung eine Veränderung erleidet. Es kommt zur Spaltung der Eiweißkomponente, wodurch notwendigerweise die Stabilität der DNS beeinträchtigt oder ganz aufgehoben wird, so daß das DNS-Molekül zerfällt und die Feulgensche Reaktion verschwindet. Wenn es sich nur um eine geringe oder partielle Stabilitätsverminderung handelt, so tritt noch eine gewisse Farbreaktion in Erscheinung.

Die Auswertung der mit Pepsin behandelten Präparate ergab, daß das Zytoplasma der Erythrozyten aller unserer untersuchten Arten auf gleiche Weise verdaut wird. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der früher am Säugergewebe durchgeführten eigenen Untersuchungen überein.

Zusammenfassung

Die Erythrozyten von Tieren, die verschiedene Wirbeltierklassen und -Spezies repräsentieren, wurden mit proteolytischen Enzymen inkubiert. Die Untersuchungen ergaben, daß von Trypsin die Kernsubstanz der Erythrozyten von phylogenetisch auf niedrigerer Stufe stehenden Arten rascher gespalten wird, während Pepsin auf das Zytoplasma der untersuchten Zellen gleichmäßig wirkt.

LITERATUR

1. GERZELI, G., CASATI, C., MENEGHETTI GENARO, A. (1956): I volumi nucleari e cellulari in relazione di acido desossiribonucleico in eritrociti al tenore di alcune specie dei Vertebrati. *Riv. Istochim. norm. pat.* 2, 149—153.
2. HAUROVITZ, F. (1950): *Chemistry and Biology of Proteins*. Academic Press, New York.
3. MIRSKY, A. E., RIS, H. (1949): Variable and Constant Components of Chromosomes. *Nature (London)* 103, 666.
4. PEARSE, A. G. (1954): *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Churchill, London.
5. PERUGINI, S., SOLDATI, M. u. TORELLI, U. (1958): Cytoplasmatic Studies on the Desoxyribonucleid Acid and Histone Content of Normal Human Erythroblasts. *Acta histochem.* 6, 133—138.
6. RAPPAY, GY. (1959): Das Verhalten des Thymusgewebes gegenüber proteolytischen Enzymen. *Magy. Tud. Akad. biol. orv. Oszt. Közl. (Budapest)* 10, 129—134.
7. VIALLI, M. (1957): Volume et contenu en ADN par noyau. *Exp. Cell Res. Suppl. IV*, 284—293.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИ-
ДОВ В КРОВЯНЫХ ТЕЛЬЦАХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПОЗВОНОЧНЫХ. I

ДЬ. РАППАИ и ДЬ. БАЛОГ

В своих экспериментах авторы применяли ядерные эритроциты животных, представляющих различные классы и отряды позвоночных. Эритроциты инкубировались протеолитическими энзимами, причем было установлено, что трипсин разлагает быстрее ядерное вещество индивидуумов, находящихся на филогенетически более низкой ступени, в то время как пепсин воздействует в одинаковой мере на цитоплазму исследованных клеток.

NUCLEOPROTEINS IN THE BLOOD CELLS OF VERTEBRATES. I

GY. RAPPAY and GY. BALOGH

Nucleated erythrocytes of animal species representing different classes and orders of vertebrates were incubated with proteolytic enzymes. The nuclear substance in the erythrocytes of phylogenetically higher animals was found to have an increased sensibility to trypsin. Pepsin exerted an identical effect of the cytoplasm of all examined cells.

Dr. György RAPPAY
György BALOGH

} Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Ungarn