

Sphingolipide und Glykolipide von Pilzen und höheren Pflanzen

IV. Mitt.:<sup>1</sup> Isolierung eines Inositfreien Phytosphingoglykolipids aus der Grünalge *Scenedesmus obliquus*

H. WAGNER, P. POHL und A. MÜNZING

Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Z. Naturforsch. 24 b, 360 [1969]; eingegangen am 21. Januar 1969)

Durch Chloroform-Methanol- und anschließende Methanol-Extraktion, Fällung mit Aceton, milde Alkalihydrolyse und Chromatographie an einer Formaldehyd-Zellulose-Säule wurde aus dem gefriergetrockneten Algenmaterial von *Scenedesmus obliquus*\* eine weiße Substanz gewonnen, die sich auf Formaldehyd-Papier im System Bu-Ei-Wa (4 : 1 : 5) wie ein Phytoglykolipid aus Erdnuß oder Soja verhielt und zwischen 196 bis 240° unter Zersetzung schmolz.

Die Substanz enthält Phosphor und Stickstoff und zeigt im IR-Spektrum die für eine Säureamidgruppierung typischen Banden bei 1640 und 1520 cm<sup>-1</sup>. Durch Säurehydrolyse erhält man folgende Spaltprodukte:

I. *Sphingosinbasen*: C<sub>18</sub>- bzw. C<sub>20</sub>-Phytosphingosin [D(+)-erythro-1.3-Dihydroxy-2-amino-4-trans-octadecen san) und C<sub>18</sub>-Sphingosin sowie C<sub>18</sub>-Dihydrophingosin [D(+)-rythro-1.3-Dihydroxy-2-amino-4-trans-octadecen (octadecan)].

II. *Zucker*: Galaktose, Mannose, Rhamnose, Glucosamin und einen noch nicht identifizierten Zucker vom RM-Wert = 1,96 (bezogen auf Glucosamin = 1,0, Bu-Ei-Wa, 4 : 1 : 5).

III. *Fettsäuren*: Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol-, Arachin-, Behen- und Lignocerin-Säure.

Bei zwei weiteren Fettsäuren mit den rel. Ret.-Zeiten 6,5 und 11,6 (bezogen auf C<sub>18:0</sub>-Methylester, Gas-Chr. 15% EGSSX auf Gaschrom. P., Temp. = 185°) han-

delt es sich um C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Monoensäuren. Die auffälligsten Unterschiede in der Zusammensetzung des Algen-phytoglykolipids zu der von Erdnußsamen<sup>2</sup> und Sojabohne<sup>3</sup> (s. Tab. 1) bestehen in dem Fehlen von

Zusammensetzung	Scenedesmus obliqu. gef. [%]	Erdnußsamen gef. [%]
C	52,6	51,66
H	8,76	8,21
N	1,72	1,99
P	1,01	1,98
Zucker (Hexosen- Pentosen)	44,0,6	8,42
Glucosamin	11,0	9,9
Inosit	—	10,55
Glukuronsäure	—	18,0
Sphingosinbasen	19,5	20,1
Fettsäuren	23,3	23,71
Zersetzungspunkte	196–240 °C	200–240 °C

Tab. 1. Proz. Zusammensetzung von Erdnuß- und *Scenedesmus*-Phytoglykolipiden.

Inosit und Glucuronsäure, dem um die Hälfte geringeren Phosphorgehalt (1,01%) und in der Abwesenheit von Hydroxyfettsäuren.

Der niedrige Phosphorgehalt und die im Vergleich zu den CO-Zuckerbanden schwach ausgeprägten Säureamidbanden im IR-Spektrum des Algen-Phytoglykolipids lassen vermuten, daß auf 1 Mol Phosphorsäure mehr als nur eine Oligosideinheit trifft.

Über die genaue Struktur dieses erstmals in einer niederen Pflanze aufgefundenen Phytosphingoglykolipids berichten wir zu gegebenem Zeitpunkt.

Herrn Prof. Dr. KRAUT von der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation e. V. Dortmund, danken wir für die freundliche Bereitstellung des Algenmaterials.

<sup>3</sup> H. E. CARTER, W. D. CELMER, D. S. GALANOS, R. H. GIGG, W. E. LANDS, J. W. LAW, K. L. MUELLER, T. NAKAYAMA, H. H. TOMIZAWA u. E. WEBER, J. Amer. Oil Chemist's Soc. 35, 335 [1958].

\* Gezüchtet in einer mit „Ammonium“ gesättigten, anorganischen Nährsalzlösung.

<sup>1</sup> III. Mitt.: H. WAGNER u. E. FIEGERT, Z. Naturforsch. 24 b, 359 [1969].

<sup>2</sup> H. WAGNER u. W. ZOFCSIK, Z. Naturforsch., im Druck.

Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen

W. DITTRICH und W. GÖHDE

Institut für Strahlenbiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

(Z. Naturforsch. 24 b, 360–361 [1969]; eingegangen am 2. Januar 1969)

Im Rahmen medizinisch-diagnostischer und populationskinetischer Untersuchungen kommt der Mengen-

verteilung bestimmter Zellsubstanzen besondere Bedeutung zu. Die gebräuchlichen Verfahren, an Einzelzellen (z. B. Ehrlich Ascites Tumorzellen, Zellen des Vaginalsmears, Blutzellen, einzellige Algen usw.) an Hand von Ausstrichpräparaten Aussagen über solche Mengenverteilungen (Histogramme) zu gewinnen, sind insgesamt zeitraubend. Dies gilt gleichermaßen für die Mikrospektrophotometrie<sup>1,2</sup>, wie für die Mikroautoradiographie und für die Mikrofluorometrie<sup>3</sup>. Allen diesen Verfahren ist die Impulsfluorometrie, ein neu-

<sup>1</sup> T. CASPERSSON, Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn. 53, 403 [1936].

<sup>2</sup> S. BHASKARAN u. W. DITTRICH, Atomkernenergie 14, 12, 51 [1969].

artiges Durchflußverfahren, an Schnelligkeit weit überlegen. Die Impulsfluorometrie ermöglicht in der Sek. 100 und mehr Einzelmessungen an verschiedenen Einzelzellen. Ihre Anwendbarkeit ist allerdings u. a. an zwei Voraussetzungen geknüpft, nämlich an eine 1. ausreichend intensive und 2. auch ausreichend selektive Fluorochromierbarkeit der in Frage kommenden Zellbestandteile.

Das apparative Kernstück des Verfahrens, die Durchflußkammer, ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Das die Fluoreszenz anregende, zumeist kurzwellige Licht erleuchtet die kreisrunde Düsenöffnung (Durchmesser

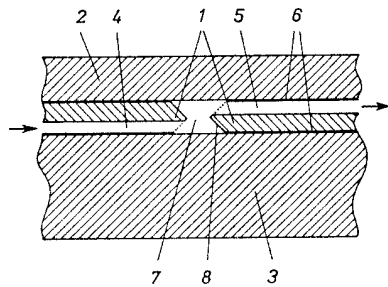


Abb. 1. Durchflußkammer (schematisch). 1 Düsenplatte, 2 Deckglas, 3 Objektträger, 4 Zuflußkanal, 5 Abflußkanal, 6 Kittstellen, 7 Düsenöffnung, 8 Eintrittskonus.

etwa  $80 \mu\text{m}$ ) gleichmäßig und weist in der Ebene der Düsenöffnung ein Intensitätsmaximum auf, da die Leuchtfeldblende in diese Ebene scharf abgebildet und ihr Bild mit der Düsenöffnung zur Deckung gebracht wird. Beim Durchfluß der Zellsuspension durch die Düsenöffnung entsteht, entsprechend jeweils dem Durchtritt einer Einzelzelle, ein Fluoreszenzlichtimpuls, der über Mikroskop und Erregerlicht-Sperrfilter auf einen Fotomultiplier gelangt. Er löst dort einen Fotostromimpuls aus. Zweckmäßigerweise wird auch die Meßblende des Fotomultipliers in die Ebene der Düsenöffnung scharf abgebildet und ihr Bild mit der Düsenöffnung zur Deckung gebracht. Die elektrischen Impulse des Fotomultipliers lassen sich im einfachsten Fall mittels eines Vielkanalanalysators entsprechend ihrer Höhe registrieren oder aber, kostenmäßig weniger aufwendig, zunächst einem Analogspeicher, z. B. einem Magnetbandspeicher, zuführen und von diesem über einen Impulshöhen-Diskriminator mit variabler Schwelle abrufen.

<sup>3</sup> N. BÖHM u. E. SPRENGER, *Histochem.* **16**, 100 [1968].

<sup>4</sup> J. B. LE PECQ and C. PAOLETTI, *J. molecular Biol.* **27**, 87 [1967].

Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung an Ehrlich Ascites-Tumorzellen (Linie ELD<sub>d1</sub> am 6. Tag nach Verimpfung auf NMRI-Mäuse), die nach der Gefriersubstitutions-Methode mit Alkohol fixiert und anschließend mit einem Nucleinsäuren intensiv<sup>4</sup> und weit-

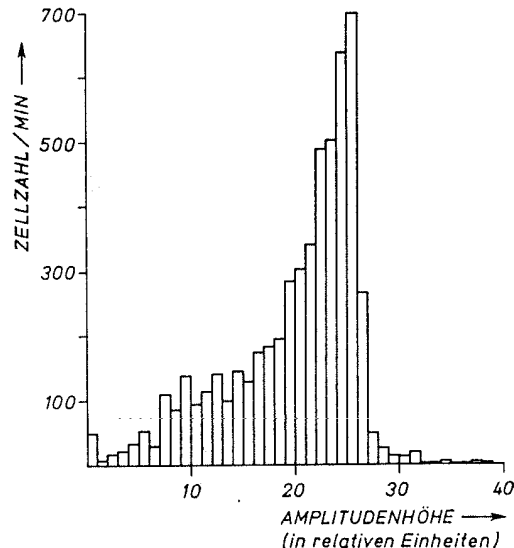


Abb. 2. Amplituden-Histogramm der Fluoreszenzlicht-Impulse.

gehend selektiv anfärbenden Farbstoff (Ethidium-bromide \* 1 : 10000) fluorochromiert worden waren. Die Zelldichte der Suspension betrug 16600 Zellen/ml, die Durchflußgeschwindigkeit  $0,33 \text{ ml/min}$  und die Durchflußzeit 1 Minute. Gemessen wurden die Fluoreszenzlicht-Impulse von insgesamt 5528 Zellen. Das eingipfelige, extrem rechtsschräge Histogramm der Impulshöhen entspricht dem Histogramm der Nucleinsäuremenge pro Tumorzelle. Nach Ribonuclease-Behandlung fluorochromierte Tumorzellen ergeben ein Histogramm der DNS-Werte. Hierüber und über Simultanmessungen an mehrfach fluorochromierten Zellen wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Herrn Elektro-Ing. S. KIEGLER danken wir für seine wertvolle Beratung in elektronischen Fragen und für seine aktive Mitarbeit beim Aufbau der Meßapparatur. Fräulein A. STIPROWEIT und Fräulein H. THOMSEN danken wir für ihre technische Assistenz. Der Fa. Leitz Wetzlar schulden wir Dank für die leihweise Überlassung optischer Geräte.

\* 2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenylphenanthridinium-bromid der Fa. Calbiochem, Los Angeles, California.