

ENZYMES OF *MICROSPORON CANIS*

by

F. W. CHATTAWAY AND C. C. THOMPSON

Department of Biochemistry, The University, Leeds (England)

AND

A. J. E. BARLOW

Department of Dermatology, The Royal Infirmary, Huddersfield (England)

Little is known of the enzyme systems of the dermatophytes, although MACFADYEN¹ and BODIN AND LENORMAND² early demonstrated extracellular proteases in *Trichophyton tonsurans* and *Microsporon equinum* respectively. TATE³ found protease, catalase, peroxidase, diastase, urease and amygdalase activity in acetone powders from fungi representative of the main groups of dermatophytes and BENTLEY⁴ also using acetone powders has studied amino acid oxidase and asparaginase activity in *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*. This note reports a preliminary survey of the enzymic activities of crushed mycelium from *M. canis* prepared by means of the press described by HUGHES⁵. The best activities were found with mycelium grown in shake culture for four days in SABOURAUD's maltose broth at room temperature; mycelial pads grown in stationary culture for 10–15 days showed considerably lower activity and all results quoted are for 4-day shake cultures. The mycelium was filtered on a Büchner funnel, well washed with distilled water, pressed and the product suspended in phosphate buffer (0.015 *M*), pH 7.2. Considerable disintegration of the mycelium occurred but the fungus could still be cultivated from the final suspension. None of the recorded enzymic activities were demonstrable with intact mycelium. Ability to oxidise glucose and possible intermediates of carbohydrate metabolism was studied by determining oxygen uptake in the Warburg apparatus at 30° in air in the presence of substrate, methylene blue (1·10⁻³ *M*), adenosine triphosphate (1.5·10⁻³ *M*), Mg⁺⁺ (8·10⁻⁴ *M*), cytochrome *c* (6.6·10⁻⁶ *M*), phosphate buffer pH 7.0 (0.0097 *M*) and mycelial dispersion, with 0.2 ml KOH (3.6 *M*) in the centre cup. Typical results are shown in Table I.

Succinate oxidation was completely inhibited by malonate. Activity of the mycelial dispersions was not increased by suspension in KCl (0.02 *M*), sucrose (0.25 *M*) or versene (2.5·10⁻⁴ *M*). Oxaloacetate decarboxylase activity was shown under the same conditions, with the addition of co-carboxylase (1.46·10⁻⁴ *M*) and co-enzyme I (1·10⁻⁵ *M*) and the omission of the KOH; a typical result showing the evolution of 8.3 μ l CO₂/mg N/h after correction for endogenous and spontaneous CO₂ evolution.

TABLE I

 OXIDATION OF VARIOUS SUBSTRATES
BY MYCELIAL DISPERSIONS OF *M. canis*

All figures corrected for endogenous uptake.

Substrate	μ l O ₂ uptake/mg N/h
Glucose (0.62 mg)	6.0
Succinate (25 μ mol)	6.5
Citrate (25 μ mol)	4.4
Pyruvate (25 μ mol)	5.7
Fumarate (25 μ mol)	nil
Acetate (25 μ mol)	5.5
Oxaloacetate (25 μ mol)	0.1

TABLE II

 AMINO ACID OXIDASE ACTIVITY
OF MYCELIAL DISPERSIONS OF *M. canis*

 Duration of experiment 2 h. Substrate conc. 25 μ mol. All figures corrected for endogenous values.

Substrate	O ₂ uptake μ mol	NH ₃ formation μ mol
DL-Methionine	1.79	1.88
L-Aspartic acid	1.20	0.88
DL-Alanine	1.64	1.47
L-Leucine	0.87	2.12
DL-Glutamic acid	1.06	1.24

Amino acid oxidase activity was shown by determination of oxygen uptake and ammonia formation in the presence of substrate (25 μ mol.), phosphate buffer (0.0097 *M*) pH 7.8 and mycelial dispersion at 30°. Ammonia was determined by the addition of an equal volume of trichloroacetic acid (0.613 *M*) and estimation by the method of CONWAY⁶. Typical results are shown in Table II.

Alkaline phosphatase activity was demonstrated in the presence of substrate (0.033 *M*), MgCl₂ (0.0016 *M*) and Na₂CO₃/NaHCO₃ (0.1 *M*) buffer pH 9.7 and mycelial dispersion suspended in KCl

(0.013 *M*). Inorganic phosphate was determined by the method of FISKE AND SUBBAROW⁷ after the addition of an equal volume of trichloroacetic acid (0.613 *M*). Hydrolysis of di-sodium-phenyl phosphate and sodium- β -glycerylphosphate was 60 % and 44 % respectively after 2 h incubation at 30° using a quantity of mycelial dispersion containing 6.03 mg N. Diastase activity was also found, confirming TATE's observation, showing a 23 % hydrolysis of starch after 22 h incubation at 35° in the presence of NaCl (0.002 *M*). Urease, invertase, acid phosphatase and tryptophanase activities were not present in these preparations. Further work is in progress in attempts to obtain preparations of increased activity and to study some of the enzymic activities in greater detail.

We wish to thank the Agricultural Research Council for a maintenance grant to one of us (C.C.T.).

REFERENCES

- ¹ A. MACFADYEN, *J. Path. Bact.*, 3 (1895-6) 176.
- ² E. BODIN AND C. LENORMAND, *Ann. Inst. Pasteur*, 15 (1901) 279.
- ³ P. TATE, *Parasitology*, 21 (1929) 31.
- ⁴ M. L. BENTLEY, *J. gen. Microbiol.*, 8 (1953) 365.
- ⁵ D. E. HUGHES, *Brit. J. Exp. Path.*, 32 (1951) 97.
- ⁶ E. J. CONWAY, *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, Crosby, Lockwood & Son, London 1947.
- ⁷ C. H. FISKE AND Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.

Received June 23rd, 1954

ZUR ANWENDBARKEIT DES ZELLMODELLS NACH HÖFFMANN-BERLING¹ FÜR DIE ANALYSE VON ZELLBEWEGUNGEN

von

HANS LETTRÉ

*Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität
Heidelberg (Deutschland)*

Im Sinne der Hypothese von BRACHET² konnten wir seit 1949 feststellen³, dass Adenosin-triphosphorsäure (ATP) als energieliefernde Substanz bei der Zellteilung eine Rolle spielt, und zwar einmal durch den Antagonismus von ATP gegen Colchicin⁴ und zweitens durch den Synergismus zum Colchicin von Stoffen, die als Muskelgifte wirken oder den ATP-Haushalt der Zelle verändern⁵. Die synergistische Wirkung einiger Stoffe kann durch Kreatinphosphorsäure aufgehoben werden⁶. Andererseits liess sich bei Zellen mit Formbeständigkeit in der Interphase, wie Fibroblasten und Epithelzellen, durch Farbstoffe mit Affinität zu den Mitochondrien⁷, durch Atmungsgifte⁸ und durch Überführung unter anaerobe Bedingungen⁸ eine Bewegung der Zelloberfläche mit ständiger Formänderung der Zelle herbeiführen. Diese Bewegungsauslösung kann durch Zugabe von ATP unterdrückt werden. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass die Zelloberfläche einer Zelle mit Formbeständigkeit in einem tonusartigen Kontraktionszustand ist und Bewegungen und Formänderungen der Zelle durch lokale Änderungen der ATP-Konzentration und damit des Kontraktionszustandes (Erschlaffung und Wiederkontraktion) zustandekommen. Speziell der Übergang der spindelförmigen Fibroblasten in eine Kugelform, der durch eine Reihe schädigender Faktoren bewirkt werden kann und auch beim Übergang des Fibroblasten in die Teilungsphase eintritt, wurde als eine Erschlaffung der Zelloberfläche gedeutet, die zunächst an den Zellausläufern beginnt und durch lokale Kontraktionsunterschiede zum Mittelteil hin zur Abrundung der Zelle führt, worüber wir inzwischen weitere Experimente durchgeführt haben⁹. Durch Zugabe von ATP zu Fibroblastenkulturen¹⁰ (wir sind neuerdings bis zu extremen Dosen von 40 mg/ml gegangen) lässt sich keine Abrundung der lebenden Fibroblasten herbeiführen; die Zellen kommen in einen Zustand der Starre, die sich erst im Laufe von Stunden mit dem Zerfall der ATP löst.