

The constancy of the streptomycin resistance in the mutant strain S.M.R.I. was investigated by transferring it to media without streptomycin. Even after 150 transfers, the resistance remained unaltered. Passages through mice were then made to determine the changes of virulence and resistance *in vivo*. After two direct passages from mouse to mouse, using liver and spleen for infection, the strain S.M.R.I. failed to induce the disease and no bacteria could be recovered from the mice. Also with a second technique (isolation and culturing of the strain after each passage, and inoculation of the bacteria from the cultures into mice), no changes either in the resistance or the virulence of the strain could be detected after six passages.

Inoculation of sublethal doses, 0.5 ml of the dilution  $10^{-3}$ , of the S.M.R.I. strain into mice and their subsequent challenge with the virulent strain showed that this quantity of the resistant strain immunized the mice against one million  $LD_{50}$ .

Streptomycin resistant and non-resistant strains were tested for their susceptibility to aureomycin and chloramphenicol, the two other most effective antibiotics for *Bacterium tularensis*. No cross-resistance was found in these experiments.

The results presented in this paper show that the acquisition of streptomycin resistance by *Bacterium tularensis* is not accompanied by alterations in nutritional requirements and immunogenic properties, but seems to be connected with a loss of virulence.

H. YANIV, Y. AVI-DOR, and A. L. OLITZKI

*Israeli Institute for Biological Research and Department of Bacteriology, Hebrew University – Hadassah Medical School, Jerusalem, September 15, 1952,*

*Zusammenfassung*

Von 12 streptomyzinfesten *B. tularensis*-Stämmen wurden 11 in einer 1/160 normalen NaCl-Lösung agglutiniert und waren von niedrigerer Virulenz als die durch dieselbe NaCl-Lösung nicht agglutinable, hochvirulente Ausgangskultur. Einer dieser streptomyzinfesten, nicht virulenten Stämme war fähig, weisse Mäuse gegen eine Million 50%iger tödlicher Dosen des Ausgangsstammes zu immunisieren.

**Die enzymatische Synthese des Glutamins im *Lupinus albus***

Das Vorkommen und die Rolle des Glutamins und Asparagins in Pflanzen bildete seit der Entdeckung dieser Verbindungen den Gegenstand zahlreicher Untersuchungen<sup>1</sup>. Die enzymatische Synthese des Glutamins aus Glutaminsäure und Ammoniak wurde aber erst in den letzten Jahren beinahe gleichzeitig von LEUTHARDT und BUYARD<sup>2</sup> in Meerschweinchen- und Rattenleberhomogenaten und von SPECK<sup>3</sup> in Taubenleberhomogenaten nachgewiesen. Sie bewiesen, dass Adenosintriphosphat (ATP) die Energie zur Synthese liefert und dass Magnesiumionen zur Reaktion nötig sind. Ähnliche Ergebnisse erhielten ELLIOTT<sup>4</sup> und ELLIOTT und GALE<sup>5</sup>

mit Gehirnextrakten bzw. *Staphylococcus aureus*. ELLIOTT berichtet auch kurz darüber, dass im *Lupinus albus* ein Enzym vorkommt<sup>1</sup>, welches aus Glutaminsäure und Ammoniak in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen Glutamin synthetisiert.

Wir haben versucht, das im *Lupinus albus* nachgewiesene glutaminsynthetisierende Enzym zu isolieren, um seinen Wirkungsmechanismus aufzuklären.

Als Untersuchungsmaterial benützten wir 5–6 Tage lang (bei gewöhnlichem Laboratoriumlicht) keimende *Lupinus-albus*-Samen. Die Samen wurden am 5. bis 6. Tage des Keimens im mechanischen Mörser verrieben und abgepresst. Der Pressaft wurde 24 h lang bei 0°C gegen 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,6, dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen von 0,2 M Azetatpuffer, pH 5,2, versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Flüssigkeit wurde bei 0°C mit 0,2 M Essigsäure auf pH 4,2 eingestellt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, dann mit 0,2 M Natriumhydrogencarbonat aufgelöst. Die gewonnene Lösung wurde 24 h lang gegen 0,15-M-Natriumchlorid-, 0,005-M-Natriumhydrogencarbonat- und 0,001-M-Kobaltchlorid-Mischung dialysiert, dann wurde das pH mit 0,2 g Essigsäure auf 5,2 gebracht und der gewonnene Niederschlag abzentrifugiert und wieder in 0,2-M-Natriumhydrogencarbonat gelöst. Auf diese Weise reicher ten wir das Enzym ungefähr 20fach an.

Die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Enzymversuche geschah folgenderweise: die komplette Reaktionsmischung enthielt 0,08 M Succinatpuffer, pH 6,5, 0,005 M Kobaltchlorid, 0,05 M neutralisiertes Hydroxylaminhydrochlorid, 0,05 M Natriumglutamat und 0,006 M ATP. Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 4 ml, Inkubation: 60 min bei 30°C.

In den Experimenten, wo die Amidsynthese geprüft wurde, wurde statt Hydroxylamin Ammoniumchlorid verwendet (150 µg  $NH_3$ -N). Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit Trichloressigsäure abgestellt. Die Bestimmung der Hydroxamsäure wurde nach LIPMANN und TUTTLE<sup>2</sup> durchgeführt. Die Glutaminbestimmung wurde mit *Clostridium Welchii* SR 12 Stamm nach KREBS<sup>3</sup> durchgeführt.

*Tabelle I*

Inkubation	Hydroxylaminbildung in µM	Abgespaltes anorganisches Phosphat in µM
Komplettes System . . . .	8,0	8,6
Ohne Glutaminsäure . . . .	0,0	0,6
Ohne ATP . . . . .	0,0	0,0
Ohne Kobaltionen . . . .	1,0	1,6
Ohne Hydroxylamin . . . .	0,0	0,7

Wie Tabelle I zeigt, wird parallel mit der Hydroxamsäuresynthese aus dem ATP anorganisches Phosphat abgespalten. Das gereinigte Enzym zeigt in Abwesenheit von Kobaltionen fast keine Aktivität. Auf ähnliche Weise aktivieren auch Magnesium und Manganionen. Das Enzym ist streng spezifisch für die 1(+) Konfiguration der Glutaminsäure, es wirkt auf d(–) Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht ein. Die Abbildung zeigt die Ionenaktivierung des Enzyms.

<sup>1</sup> H. E. STREET, Adv. Enzymol. 9, 391 (1949).

<sup>2</sup> F. LEUTHARDT und E. BUYARD, Helv. med. Acta 14, 247 (1947).

<sup>3</sup> J. F. SPECK, J. biol. Chem. 168, 403 (1947).

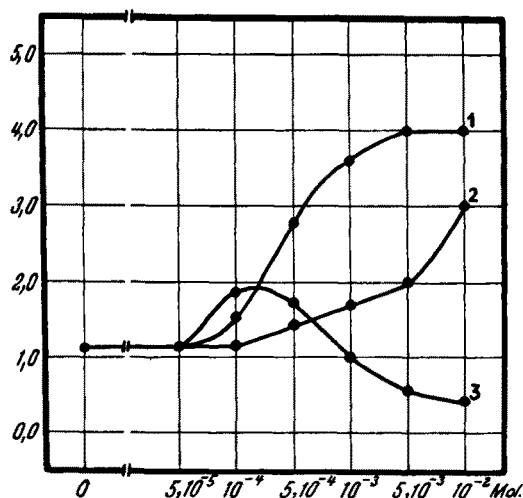
<sup>4</sup> W. H. ELLIOTT, Nature 161, 128 (1948).

<sup>5</sup> W. H. ELLIOTT und E. F. GALE, Nature 161, 129 (1948).

<sup>1</sup> W. H. ELLIOTT, Biochem. J. 49, 106 (1951).

<sup>2</sup> F. LIPMANN und L. C. TUTTLE, J. biol. Chem. 159, 21 (1945).

<sup>3</sup> H. A. KREBS, Biochem. J. 43, 51 (1948).



Ionenaktivierung (Versuchsbedingungen siehe Text). Abszisse: Ionenkonzentrationen in Mol. Ordinate: Hydroxamsäurebildung in Mikromol. Kurven: 1 Hydroxamsäurebildung in Gegenwart von Kobaltionen; 2 dieselbe in Gegenwart von Magnesiumionen; 3 dieselbe in Gegenwart von Manganionen.

Der nähere Mechanismus der Teilnahme des ATP. in der Glutaminsynthese ist heute noch nicht klar. Es ist aber möglich, dass das Enzym eine Reaktion zwischen Glutaminsäure und ATP. katalysiert, wobei Glutaminsäure- $\gamma$ -Azyolphosphat entsteht. Diese Verbindung reagiert nicht enzymatisch mit Ammoniak oder Hydroxylamin, und es entsteht Glutamin, bzw. Hydroxamsäure, wobei anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Dafür spricht die Beobachtung, dass das von uns nach einer unveröffentlichten Methode synthetisierte Glutaminsäure- $\gamma$ -Azyolphosphat auch in Abwesenheit des Enzyms mit Ammoniak und Hydroxylamin reagiert.

Tabelle II

Inkubation	Hydroxamsäurebildung in Mikromol	Glutaminbildung in Mikromol
25 $\mu$ M Glutaminsäure- $\gamma$ -Azyolphosphat + 50 $\mu$ M Hydroxylamin . .	24,2	—
25 $\mu$ M Glutaminsäure- $\gamma$ -Azyolphosphat + 50 $\mu$ M Ammoniumchlorid . . . . .	—	24,4

Unter Freisetzung von anorganischem Phosphat entsteht Glutamin bzw. Glutaminsäure-Hydroxamsäure. In diesem Falle wäre das Enzym, welches die Synthese katalysiert, als eine Phosphophorase zu betrachten. Eine ausführlichere Mitteilung über diese Experimente wird in *Acta Physiologica Hungarica* erscheinen.

G. DÉNES

Medizinisch-Chemisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest, den 15. September 1952.

## Summary

Purified extracts of germinated *Lupinus albus* seeds catalyse the reaction between A.T.P., glutamate and ammonia or hydroxylamine in the presence of cobalt ions, with the formation of glutamine and hydroxamic

acid, respectively. The preparation and some properties of the enzyme are described. In this system 1 (+) glutamic acid cannot be replaced by d (–) glutamic or aspartic acid. Cobalt ions can be substituted by magnesium or manganese ions.

Synthetic  $\gamma$ -glutamyl phosphate reacts non-enzymatically with ammonia or hydroxylamine, whereby glutamine, respectively hydroxamic acid is formed. If the enzyme reaction involves the intermediate formation of  $\gamma$ -glutamyl phosphate – as is generally supposed – it seems most probable that the synthesis of glutamine and hydroxamic acid requires no further enzyme action. Once the  $\gamma$ -phosphate is formed, the mixed anhydride is simply split in the presence of any nitrogenous base. In this case the enzyme catalysing the synthesis of glutamine may be considered to be a phosphophorase.

### Fécondation artificielle de *Xenopus laevis* sans sacrifice du géniteur mâle<sup>1</sup>

Dans certaines conditions, le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* peut toute l'année se reproduire en captivité et il présente de nombreux autres avantages: élevage facile<sup>2</sup>, développement embryonnaire rapide<sup>3</sup>, les animaux peuvent rapidement atteindre leur maturité sexuelle (6-8 mois)<sup>4</sup>, les œufs sont relativement peu chargés de vitellus et leur gangue muqueuse est peu épaisse.

Toutefois, l'amplexus durant plusieurs heures, les embryons se trouvent à des stades très différents à un temps donné. Quant à la fécondation artificielle des batraciens en général, elle ne se pratique qu'en obtenant le sperme par prélèvement des testicules<sup>5</sup>, c'est un procédé peu économique, et l'élimination d'un des géniteurs met en cause l'éventualité du back-cross. L'obtention d'œufs fécondables de *X. laevis* par injections de gonadotrophines est bien connue<sup>6</sup>. Notre problème essentiel consistait à disposer d'une suspension spermatique où les spermatozoïdes soient en concentration suffisante et doués d'une bonne motilité. Plusieurs endocrinologistes ont montré qu'il était possible d'amener l'émission de spermatozoïdes chez les batraciens par injection de petites quantités d'adrénaline<sup>7</sup> ou de gonadotrophines<sup>8</sup>. Nous avons pu obtenir des spermatozoïdes répondant aux exigences du problème en opérant de la façon suivante:

1° *Prétraitement*. Les femelles et les mâles étant élevés séparément dans des bassins dont l'eau courante est à la température de 12-15°C, des mâles adultes, à jeun depuis au moins une semaine, reçoivent de la

<sup>1</sup> Note préliminaire.

<sup>2</sup> O. HARJOLA et S. TOIVONEN, Ann. Chirurg. Gynaec. Fenniae 38, sup. 3, 68 (1949).

<sup>3</sup> P. B. WEISZ, Anat. Rec. 93, 161 (1945).

<sup>4</sup> L. R. ARONSON, Amer. Nat. 78, 131 (1944). – R. GASCHÉ, Rev. suisse Zool. 50, 262 (1943).

<sup>5</sup> R. RUGH, *Experimental embryology, A manual of techniques and procedures* (Burgers Pub. Co., Minneapolis, 1948) 481 pp.

<sup>6</sup> H. ZWARENSTEIN, N. SAFEIKA et H. A. SHAPIRO, *Xenopus laevis, a Bibliography* (Cape Town 1946). – G. ANDRES, A. BRETSCHER, F. E. LEHMANN et D. ROTH, Exper. 5, 83 (1949).

<sup>7</sup> LI MIN-HSIN et CHANG HSI-CHUN, Chinese J. Physiol. 17, 201 (1949). – S. L. ROBBINS et F. PARKER JR., Endocrinology 44, 384 (1949).

<sup>8</sup> A. L. HASKINS et A. I. SHERMAN, Endocrinology 44, 542 (1949). – L. GALLIEN, C. r. Acad. Sci. 226, 1141 (1948). – J. CREZE, C. r. Soc. Biol. 143, 1391 (1949).