

La pénicillinase purifiée (VIII) présente un pH situé entre 4,8 et 5,2. Elle se dénature lentement (insolubilisation irréversible) dans la limite de ces pH. Les protéines de la fraction VI et de la fraction VIII représentent environ 1% et 0,5% respectivement du poids de la poudre acétonique (stade I).

On peut augmenter le rendement en produit purifié ($A_{N_t} = 500\,000$ à $700\,000$) en reprenant la fraction insoluble du stade V dans du sulfate d'ammonium à 0,60 de saturation et la fractionner à nouveau par addition de sulfate d'ammonium en solution saturée.

La présence d'une quantité notable de Ca^{++} (provenant de la peptone bactériologique UCLAF, Romainville, Seine, France, utilisée pour la production de la pénicillinase) dans la poudre acétonique (stade I) détermine pour une part la qualité du fractionnement. Il semble que la solubilité de l'enzyme dans le sulfate d'ammonium soit augmentée de ce fait, facilitant ainsi sa purification.

La méthode de purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus* que nous venons d'exposer permet d'obtenir l'enzyme sous une forme très purifiée, avec des rendements élevés.

P. BAUDET et G. HAGEMANN

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique, Ecole de Chimie, Genève (Suisse) et Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen, Romainville, Seine (France), le 24 février 1954.

Summary

A method for purification of Penicillinase from *Bacillus cereus* is described whereby we obtain the enzyme in a very pure form and in excellent yields. Starting from a crude acetone precipitate, the purification is obtained by using successive separations with ammonium sulphate, in controlled conditions, and final ion exchange.

Spezifische Wirkung einiger tierischer und bakterieller Polysaccharide auf Leucocyten *in vitro*

Nachdem es gelungen war, in Fraktionen von Proteuskulturen¹, die KAHNT in unserer chemischen Abteilung bearbeitet hat, solche zu finden, die in Konzentrationen bis zu 10^{-8} eine starke emigrationsfördernde Wirkung auf Leucocyten ausüben, schien es interessant, in der Literatur beschriebene, zum Teil hochgereinigte polysaccharidartige Bakterienprodukte und analoge Gewebeffaktoren zu prüfen. Dank dem Entgegenkommen verschiedener Forscher konnten wir eine grösse Reihe derartiger Stoffe untersuchen: Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Phosphatide und einzelne Kohlehydratsulfosäuren.

Arbeiten über die Wirkung von Bakterienextrakten auf die Emigration von Leucocyten *in vitro* ergeben nur wenige Befunde. MEIER² hat den Nachweis chemotaktisch wirksamer Produkte in Bakterienkulturen erbracht³. LASFARGUES⁴ beschreibt Emigrationsförderung mit cytotoxischen, hitzelabilen Fraktionen aus grampositiven Bakterien. KUNA und CHAMBERS⁵ erwähnen eine 1%-Endotoxinlösung aus pyrogenen Bakterien als

chemotaktisch wirksam (siehe auch zusammenfassende Arbeit von McCUTCHEON⁶). Chemotaxis wie planimetrisch erfasste Leucocytenmigration charakterisieren offenbar die gleiche Wirkung.

Für Fibroblasten sind alle untersuchten Substanzen, mit Ausnahme von Pyromen (Ampullenware), bei kurzer Einwirkungsdauer wenig wirksame Produkte. Eine morphologisch sichtbare Schädigung der Mitosen und Interphasenzelle liess sich nicht nachweisen. Über Einzelheiten wird später in anderem Zusammenhang berichtet. Das Ergebnis der Leucocytentests zeigt eindeutig, dass unter den geprüften Substanzgruppen nur eine Gruppe eine ausserordentlich hohe spezifische Wirkung auf Wanderzellen ausübt. Die Polysaccharide aus *S. marcescens*, Shiga und *Proteus* wirken über einen breiten Konzentrationsbereich wanderungsfördernd, wobei mit abnehmender Konzentration die Wirkungsstärke zuerst zunimmt, nach Erreichung eines charakterisierten Maximums (im Mittel bei 10^{-6} g/cm³) fällt die Wirkung mit weiterer Konzentrationsabnahme zum Werte der Kontrolle wieder ab. Lipopolysaccharide und Phosphatide aus Mycobakterien zeigen im Vergleich mit den Polysacchariden aus grammnegativen Keimen keine oder nur geringe Wirksamkeit (siehe dazu WARTMAN und INGRAHAM²).

Mucin, Mucopolysaccharid und Mucoprotein haben keine Wirkung auf die Auswanderung; Chondroitinschwefelsäureester und Polysaccharid A (Heparin) zeigen eine mässig fördernde Wirkung. Heparin³ wirkt an menschlichen Leucocyten nur unter besonderen Versuchsbedingungen. Nach CHAMBERS ist es 1%ig ohne Wirkung. Schwangernharnextrakt⁴ ist die wirksamste der geprüften «körpereigenen» Substanzen. Auf Grund der vorliegenden Befunde lassen sich folgende, allgemeine Schlussfolgerungen ziehen. Nur bestimmte Bakterien-Polysaccharide sind emigrationsfördernd hochwirksam. Dass sowohl Shigaantigen wie Polysaccharid wirken, spricht dafür, dass zum mindesten Teilkomponenten beider Stoffe identisch sein müssen. Ob die Unterschiede zwischen Extrakten aus grammnegativen Bazillen und Mycobakterien bereits so zu deuten sind, dass nur die Bakterien, die auch lebend chemotaktische Wirksamkeit besitzen, die hier nachgewiesenen Stoffe enthalten, während Tuberkelbazillen, die lebend diese Wirkung nicht haben, solche nicht besitzen, mag vorläufig dahingestellt bleiben. Die ausserordentlich hohe Wirksamkeit von Polysacchariden aus grammnegativen Keimen, verglichen mit der relativ geringen oder fehlenden Wirksamkeit anderer «Mucopolysaccharide», lässt annehmen, dass es sich bei den wirksamen Stoffen um andersgeartete chemische Individuen handeln muss.

Wegen der Konzentrationswirkungsverhältnisse ist anzunehmen, dass für die Verhältnisse bei Infektion im Gewebe nur die hochwirksamen Bakterienstoffe und analoge Stoffe als massgebend für direkte chemotaktische Wirkung in Frage kommen.

Wir sind verschiedenen Forschern, Prof. W. P. J. MORGAN, Dr. M. J. SHEAR, Dr. E. LEDERER, Dr. J. F. McCREA, Dr. A. GOTTSCHALK, Dr. H. SMITH, für die Zurverfügungstellung von Substanzen, die diese Untersuchung ermöglicht hat, zu grösstem Dank verpflichtet.

R. MEIER und B. SCHÄR

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 15. Juli 1954.

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953).

² R. MEIER, Z. exp. Med. 87, 283 (1939).

³ R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134 E (1941).

⁴ E. LASFARGUES, Rev. Immunol. 10, 45 (1946).

⁵ A. KUNA und R. CHAMBERS, J. Clin. Invest. 32, 436 (1953).

⁶ M. McCUTCHEON, Phys. Rev. 26, 319 (1946).

² W. B. WARTMAN und E. S. INGRAHAM, Arch. Path. 29, 773 (1940).

³ M. ALLGÖWER, Schweiz. med. Wschr. 77, 131 (1947).

⁴ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 7, 308 (1951).

	Hersteller	Präparate	Wirkung an Fibroblasten 8h	Wirkung auf die Auswanderung von Leucocyten (16h)						
				10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Stoffe bakterieller Herkunft	KAHNT	Proteus-Polysaccharid-Fraktion	Ø				+	+	+	+
	SHEAR	<i>S. marcescens</i> , Polysaccharid	Ø		+	+	+	+	+	Ø
	MORGAN	Shiga specific Polysaccharide	Ø				+	+	+	Ø
		Shiga full antigen	Ø				+	+	+	+
	Travenol Labs.	Pyromen	toxisch 10 ⁻⁶				-	±	+	(+)
	LEDERER	Lipopolysaccharide	aus Brévannes		-	Ø				
			aus BCG			Ø				
		Phosphatide	aus H ₃₇ Rv Tb	Ø	+	+	Ø			
			aus Brévannes		+	Ø	Ø			
			aus M. phlei	Ø	-	+	Ø			
			aus M. smegmat	Ø	-	-	Ø			
Stoffe tierischer Herkunft	BENZ	Schwangerenharnextrakt	Ø	+	+	+	+	Ø		
	MEYER	Chondroitinschwefelsäureester			+	+	Ø			
	SMITH	Polysaccharid A (Heparin)			+	+	Ø			
		Bloodgroup substances	High A, Low H		+	Ø				
			Low A, High H		Ø	Ø				
	HERRMANN	Gastric Mucin Polysaccharid			-	Ø				
	MC CREA	Sheep Salivary Mucoid			Ø	Ø	Ø			
	GOTTSCHALK	Virus Receptor aus Speicheldrüsen	Ø	Ø	Ø	Ø				

Legende: + Förderung der Leucocytenemigration; -- Hemmung der Leucocytenemigration; Ø keine Wirkung.

Summary

Different purified polysaccharides, mucopolysaccharides, phosphatides and carbohydrat-sulfonic acids have been investigated for their effect on stimulation of leucocytic migration *in vitro*. The bacterial polysaccharides of proteus, *S. marcescens*, shiga and shiga full antigen, have been found to be of high specific activity. All other compounds have much less or no activity. Therefore it might be concluded that the type of bacterial polysaccharides which promote leucocytic migration belong to a highly specific group.

X-Ray Inactivation of *Saccharomyces* During the Budding Cycle

A previous study of ultraviolet inactivation of baker's yeast during the budding cycle¹ established biological

referents for all aspects of the ultraviolet survival curve. It was shown that the target value and rate of logarithmic inactivation are related to the desoxyribosenucleic acid (DNA) content of the cell and that the length of the shoulder portion of the curve prior to the onset of logarithmic inactivation is conditioned by the nucleoplasm/cytoplasm ratio. The remarkably great resistance of baker's yeast to X-rays made difficult the extension of such an analysis to the X-ray survival curve. However, conditions have been determined for obtaining the comparatively sensitive tetraploid yeast, 11294 \times 11296, of the Carbondale Breeding Stocks in an unbudded condition so that the first budding cycle proceeds in good synchrony.

Cells were grown for 48 h at 30°C in 25 ml of the following broth contained in a 250 ml flask: Budweiser liquid yeast extract, 25 ml; glucose, 30 g; KH_2PO_4 , 2 g; MgSO_4 , 0.5 g; distilled water to 1 l. Following incubation the culture exhibited less than 5 per cent budding and each cell possessed a complement of numerous prominent mitochondria indicating physiologic quiescence. In order to obtain yeast populations at various stages of

¹ A. SARACHEK, Exptl. Cell Res. 6, 45 (1954).