

cal. The current practice is to mate a heterozygous diploid *Drosophila* female to several homozygous diploid males and to lump the data from different matings. This procedure would conceal nonrandom assortment of the centromeres (if it occurred) because the frequency of reverse linkage resulting from preferential segregation of recombinant genes would be compensated for in a random sample by an equal amount of direct linkage from other families. The greater the "care" to obtain statistically significant data the more certainly would a random result be obtained.

STURTEVANT<sup>5</sup> reported preferential segregation of chromosomes in triple-IV *drosophilae* in which crossing-over might not be expected to randomize the effect. Preferential segregation has also been observed by RHOADES<sup>6</sup>, LONGLEY<sup>7</sup> and MICHIE<sup>8</sup> in maize and mice. The demonstration that the centromeres of *Saccharomyces* are preferentially segregated suggests the possibility that the phenomenon may be of general occurrence.

C. C. LINDEGREN and E. E. SHULT

Biological Research Laboratory, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, U.S.A., November 15, 1955.

#### Zusammenfassung

Das Vorkommen «umgekehrter Koppelung» (reverse linkage) bei der Hefe deutet auf die Möglichkeit, dass die Zentromeren nicht homologer Chromosomen zu Beginn der Meiose eine Synapsis eingehen und dementsprechend nicht unabhängig voneinander auf die beiden Tochterkerne der ersten meiotischen Teilung verteilt werden.

<sup>5</sup> A. H. STURTEVANT, Proc. nat. Acad. Sci. 20, 515 (1934).

<sup>6</sup> M. M. RHOADES, Genetics 27, 395 (1942).

<sup>7</sup> A. E. LONGLEY, Genetics 30, 100 (1945).

<sup>8</sup> D. MICHIE, Nature 171, 26 (1953).

#### Verhalten von Plasmocytomzellkulturen nach Beimpfung mit Polioviren aller drei Typen

Nach dem Verhalten in Kulturen menschlichen Gewebes haben die Polioviren als ausgesprochen *cytopathogene Viren* zu gelten. ENDERS und Mitarbeiter<sup>1</sup> haben nachgewiesen, dass alle Zellarten menschlicher Embryonen, die in Gewebekulturen gefunden werden können, unter der Wirkung von Polioviren zerstört werden. Chondroblasten waren die einzigen Zellen, die nach längerem Kontakt mit Polioviren einen normalen Aspekt zeigten, wobei es aber nach ENDERS<sup>2</sup> nicht sicher ist, ob diese Zellen noch lebensfähig waren. Gleichermassen scheinen alle bisher untersuchten menschlichen Zellen postnatalen Ursprunges auf den Kontakt mit Polioviren aller drei Typen mit Poliovirusvermehrung zu antworten, wobei die Zellen selber zugrunde gehen. Eine zytopathogene Wirkung der Polioviren ist bis jetzt auf die Zellen folgender Organe in Gewebekultur festgestellt worden: Haut, Unterhaut, Konjunktiva, Darm, Tonsillen, Appendix, Lymphknoten, Arterien, Thymus, Milz, Sternmark, Leber, Nieren, Muskel, Uterus, Herz,

Thyreoiden, Hoden und Hirngewebe, Amnionmembranen und Placentargewebe.

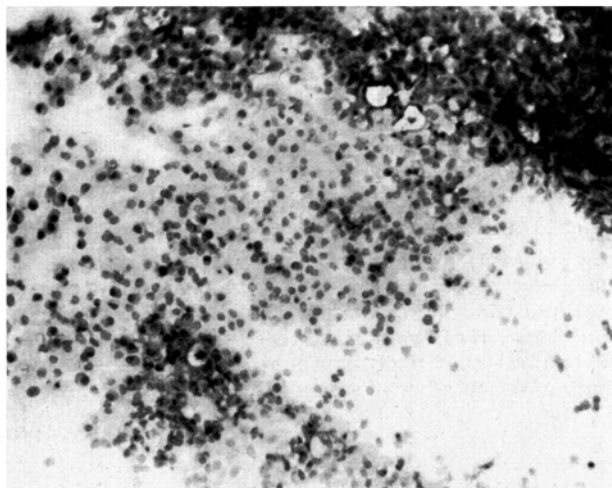


Abb. 1. Aspekt von 15 Tage alten Kulturen, 6 Tage nach Beimpfung mit  $2 \times 10^{-6}$  ID 50 Polioomyelitisvirus Typ I (1a Stockholm). Färbung May-Grünwald-Giemsa. Fibroblasten zerstört. Plasmocytomzellen und Makrophagen überleben ( $80 \times$ ).

Für die Organe postnatalen Ursprunges wurde zudem festgestellt, dass Uterus- und Tonsillengewebe von *sicheren Polioantikörperträgern* ebenfalls zerstört werden.

Gleich wie *normale Zellen* verhalten sich auch alle bisher untersuchten *krebzig entarteten Zellen* gegenüber Polioviren: Cervixkarzinomzellen (HE.-LA-Zellen), wahrscheinliche Lungenkarzinomzellen (Detroit-6-Zellen), Fibrosarkomzellen (A-FI-Zellen), nach eigenen Beobachtungen auch Glioblastomzellen.

Diese Feststellungen führten zu der Annahme, dass in Kulturen menschlichen Gewebes eine absolute zelluläre Resistenz gegenüber Polioviren weder einer bestimmten normalen oder krebzig entarteten Zellart zukommt, noch für gewisse Zellen in Abhängigkeit vom Alter oder der Immunitätslage des Ursprungsorganismus gefunden werden kann.

Trotz unterschiedlichen Lebensbedingungen darf man heute auf eine gewisse, noch nicht genau bekannte Parallelität zwischen der Zellaffinität von Polioviren in Gewebekulturen und im lebenden Organismus schliessen. So ist es bis heute nicht gelungen, menschen- und affenpathogene Polioviren aller drei Typen in anderen Gewebekulturen zu züchten als solchen, die vom Menschen oder Affen stammen.

Allerdings scheint eine ubiquitäre Vermehrung im lebenden menschlichen Organismus, wie sie nach Erfahrungen in Gewebekulturen erwartet werden könnte, wahrscheinlich nicht zuzutreffen. Es kann aber als erwiesen gelten, dass sich Polioviren auch *in vivo* in einer gewissen, noch nicht genau bestimmten Anzahl extraneuraler Gewebe vermehren. Die in Gewebekulturen regelmäßig angetroffene Verbindung von Virusvermehrung und Zellzerstörung dürfte allerdings *in vivo* eine Ausnahme darstellen, indem sie heute nur für bestimmte neurale Zellen und nach Beobachtungen an Schimpansen<sup>3</sup> auch für Zellen des braunen Fettgewebes sichergestellt ist. Die Bestimmung des Ausmasses der Virusvermehrung *in vivo* stösst auch im Tierversuch auf Schwierigkeiten, indem die Polioviren nach Ein-

<sup>1</sup> J. F. ENDERS, T. H. WELLER und F. C. ROBBINS, Science 109, 85 (1949).

<sup>2</sup> J. F. ENDERS, persönliche Mitteilung.

<sup>3</sup> G. SHWARTZMAN, S. M. ARONSON, C. V. TEODORU, M. ADLER und R. JAHIEL, Ann. New York Acad. Sci. 61, 869 (1955).

setzen des virämischen Stadiums in fast allen Organen angetroffen werden können.

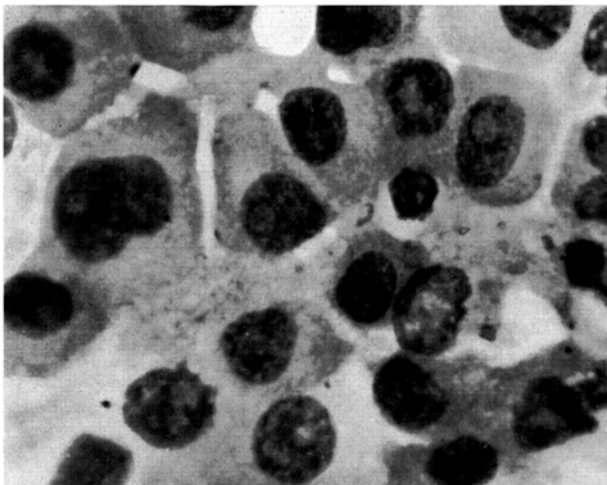


Abb. 2. Gleiches Ausstrichpräparat Plasmacytomzellen von verschiedenem Reifegrad mit grossen Kernnukleolen (1100 ×).

Nach systematischen Untersuchungen an Schimpansen<sup>4</sup> scheint die Virusvermehrung während des prävirämischen Stadiums weitgehend auf eng mit dem Verdauungstrakt verknüpfte lymphatische Strukturen, wie die Tonsillen, die tiefen zervikalen Lymphknoten, die Peyerschen Knötchen des Ileums und die Mesenteriallymphknoten beschränkt zu sein.

Die Faktoren, die das Ausmass der Virusvermehrung im lebenden Organismus bestimmen, sind noch nicht bekannt. Es ist möglich, dass die gegenseitige Geschwindigkeit von Virusvermehrung und Antikörperbildung eine Rolle spielt.

Die Einwirkung der Polioviren auf die Zellen, die an der Antikörperbildung und Infektionsabwehr beteiligt sind, ist bis heute nicht näher untersucht worden. Es ist lediglich bekannt, dass in Gewebekulturen entsprechender Organe, wie Sternalmark und Milz, kein Überleben bestimmter Zellarten nach Poliobeimpfung festgestellt werden konnte. Es ist aber möglich, dass die gesuchten Zellen in fetalem Gewebe nicht genügend zahlreich<sup>5</sup> oder funktionstüchtig sind. Zudem ist die Kultivierung der für die Infektionsabwehr so wichtigen weissen Blutzellen mit Schwierigkeiten verbunden, indem es trotz Einführung neuer Methoden nur schwer gelingt, diese Zellen mit ihren Vorstufen genügend lange am Leben zu erhalten. Dies gilt auch für die *Plasmazellen*, deren Beteiligung an der Antikörperbildung heute unumstritten ist.

Wir entschlossen uns, die Wirkung von Polioviren auf Plasmacytomzellenkulturen zu untersuchen, nachdem es gelang, unter Verwendung eines für Virusuntersuchungen geeigneten Nährmediums, diese Zellen in grosser Zahl, in verschiedenen Stadien der Ausreifung und während verhältnismässig langer Zeit am Leben zu erhalten.

Die sehr nahe Verwandtschaft von Plasmacytomzellen und Plasmazellen von verschiedenem Ausreifungsgrad ist in morphologischer Hinsicht durch vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen kürzlich wieder bestätigt worden, indem beide Zellen eine gemein-

same Struktur aufweisen, die sie von allen anderen Knochenmarkzellen unterscheiden<sup>6</sup>. Was die funktionelle Leistung beider Zelltypen betrifft, so scheinen die Plasmacytomzellen, als abnorm wuchernde Zellen vom Typ der Plasmazellen, im allgemeinen auch abnorme Proteine zu bilden. Es sei aber erwähnt, dass einige Autoren<sup>7</sup> bei vergleichenden physikalischen, chemischen und immunologischen Untersuchungen der Gamma-Globuline typischer Gamma-Myelome, der Gamma-Globuline bei Plasmazellreaktionen im Verlaufe verschiedener Krankheiten und der Gamma-Globuline gesunder, keine sicheren qualitativen Unterschiede finden konnten.

**Untersuchungen.** Plasmacytomzellenkulturen wurden ausgehend von Sternalpunktatmaterial unter Verwendung der Rollertube-Plasmaclotmethode angelegt. Als Plasma verwendeten wir Hühnerplasma, als Ausgangsnährmedium 0,5% Lactalbuminhydrolysat (Nutritional biochemical corporation) mit 10% Pferdeserum in Hanks balancierter Salzlösung und als Unterhaltungsnährmedium Parker 199, 0,5% Bacto Tryptose (Difco). Dies ergab von Polioantikörpern freie Gewebezuchtungsbedingungen. Die Nährflüssigkeit wurde in Abständen von 5 bis 7 Tagen gewechselt. Regelmässige histologische Kontrollen wurden durch Ausstrichpräparate gemacht, die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden.

Wir haben Plasmacytomzellen zweier Myelomfälle in Gewebekultur auf das Verhalten gegenüber Polioviren untersucht. Dabei wählten wir zwei Myelomfälle mit unterschiedlichem Elektrophoresebild. Es handelte sich um einen Myelomfall mit *verminderter Gamma-Globulinsynthese* und *positiver Bence-Jones-Proteinurie* und einen Myelomfall mit *stark vermehrter Gamma-Globulinsynthese* und *negativer Bence-Jones-Proteinurie*.

Das Punktat des ersten Falles enthielt beinahe ausschliesslich Plasmacytomzellen von unreifem Typus mit wenigen anderen Zellen, insbesondere wenigen Fibroblasten.

Dasjenige des zweiten Falles enthielt ebenfalls vorwiegend Plasmacytomzellen, die aber stärker ausgereift waren. Fibroblasten waren schon in den ersten Tagen vereinzelt nachweisbar. Fall II hatte früher eine Poliomyelitiserkrankung durchgemacht; bei ihm liessen sich Antikörper gegen Typ I und III, nicht aber gegen Typ II nachweisen. Fall I weist neutralisierende Antikörper gegen alle drei Poliovirustypen auf.

Serumeiweisswerte	
Fall I	
Gesamteiweiss . . . . .	g 6,3%
Albumin . . . . .	64 %
Alpha-1-Globulin . . . . .	3,1%
Alpha-2-Globulin . . . . .	13,6%
Beta-Globulin . . . . .	12,7%
Gamma-Globulin . . . . .	6,6%
Normalwert 11%.	
Fall II	
Gesamteiweiss . . . . .	g 10 %
Albumin . . . . .	38,8%
Alpha-1-Globulin . . . . .	3,5%
Alpha-2-Globulin . . . . .	6,4%
Beta-Globulin . . . . .	9,6%
Gamma-Globulin . . . . .	41,7%

<sup>4</sup> D. BODIAN, Ann. New York Acad. Sci. 61, 877 (1955).

<sup>5</sup> G. WARNINGHOFF und K. HAUSMANN, Acta haematol. 14, 237 (1955).

<sup>6</sup> M. BRAUNSTEINER, Rev. Hématol. 10, 333 (1955).

<sup>7</sup> P. G. H. GELL, J. clin. Path. 8, 269 (1955). – E. L. SMITH, D. M. BROWN, M. L. MCFADDEN, V. BUETTNER-JANUSCH und B. V. JAHER, J. biol. Chem. 26, 601 (1955).

2, 7, 12 und 17 Tage alte Plasmocytomzellkulturen von Fall I wurden mit bis zu  $2 \times 10^{-6}$  ID 50 aller drei Poliotypen beimpft. Während diese Infektionsdosis Kontrollkulturen von Nierenepithelzellen von Menschen und Affen innerhalb 24 h vollständig zerstört, konnten bei den Plasmocytomzellkulturen innerhalb einer Beobachtungszeit von mehr als 6 Wochen in bezug auf die Plasmocytomzellen keine Veränderungen festgestellt werden, die auf die Wirkung der Polioviren zurückzuführen gewesen wären. Die Plasmocytomzellen schienen sich in den beimpften Röhrchen besser zu entwickeln als in den Kontrollröhrchen. Neben Plasmocytomzellen beobachteten wir in den beimpften Röhrchen auch das Überleben einer ansehnlichen Zahl von Makrophagenzellen. In Kulturen des zweiten Falles haben wir Überleben der Plasmocytomzellen nach Beimpfung mit  $12 \times 10^{-6}$  ID 50 festgestellt.

Soviel uns bekannt ist, sind die beschriebenen Plasmocytomzellen die ersten Zellen, die in der Ausgangskultur eine scheinbar absolute Resistenz gegenüber dem zytopathogenen Effekt aller drei Poliovirustypen aufweisen. Es ist noch nicht abgeklärt, ob diese Resistenz allen Plasmocytomzellen oder allen Zellen der Plasmazellenreihe zukommt – und ob sie durch die spezifische metabolische Aktivität dieser Zellen erklärt werden muss. In Anbetracht eines möglichen Zusammenhanges dieser Resistenz mit der Proteinsekretion der Plasmocytomzellen sei auf den starken zytopathogenen Effekt der Polioviren auf Leberzellen in Gewebekulturen hingewiesen. Die Möglichkeit, dass die beobachteten Zellen unspezifische Inhibitorensubstanzen oder gegen Polio-myelitisviren gerichtete Antikörper bilden, kann gegenwärtig noch nicht ausgeschlossen werden. Die verminderte Gamma-Globulinsynthese im Falle I spricht allerdings nicht für diese Hypothese; denn Polioantikörper scheinen vorwiegend der Gamma-Globulinfraktion anzugehören.

Wir beabsichtigen das Verhalten der Plasmocytomzellen sowie der in diesen Kulturen ebenfalls resistent erscheinenden Makrophagen auch gegenüber anderen Virusarten zu prüfen. Untersuchungsergebnisse über die Poliovirusaktivität und über mögliche funktionelle Leistungen der Zellen in diesen Plasmocytomzellkulturen sollen in einer späteren Publikation erörtert werden.

R. CRAMER

Staatliches bakteriologisches Laboratorium, Stockholm, den 9. Dezember 1955.

#### Summary

The reaction of the plasmocyte cell cultures from a case of myeloma with decreased gamma globulin synthesis and from a case of myeloma with increased gamma globulin synthesis was tested in relation to all 3 types of polio virus.

In both cases the plasmocytoma cells proved to be resistant to the well-known cytopathogenic effect of these viruses in tissue culture. Macrophages in the culture of one case seemed also to be resistant.

### Formation of Asparagine and Increase in the Free Amino Acid Content in Virus Infected Leaves of *Abelmoschus esculentus*<sup>1</sup>

Increase in the formation of free amino acids has been reported by many workers<sup>2</sup>, asparagine formation in virus infected plants is known only in few cases<sup>3</sup>. The present investigation indicates that in alcohol soluble extracts of "Yellow-Mosaic" virus-infected leaves there is an increased formation of asparagine and of a new ninhydrin-reacting substance which separates from asparagine only in one sector where 0.001 ml of sample solution was spotted.

Leaves of *Abelmoschus esculentus* (*Hibiscus esculentus*) were plucked from the third and the fourth nodes at about 11 a.m. (I.S.T.) in the month of September 1955. Equal weights of all the three sets viz., "Green and Healthy", "Yellow-Mosaic and diseased" and "Completely Yellow and Severely Diseased" were frozen at  $-5^{\circ}\text{C}$  for 15 min and the extraction carried out in cold 90% alcohol with constant stirring for 0.75 h. The hydrolysate was prepared by hydrolyzing the residue with 6 N HCl and autoclaving at 15 lb pressure for 1 h. Alcoholic solutions were evaporated and then dissolved in minimum quantity of alcohol. Further, all the solutions were centrifuged at 2000 revolutions per min for 0.50 h and the clear liquid spotted on Whatman No. 1 filter paper discs at their respective places. 0.001 ml, and 0.003 ml of alcoholic extracts of all the three sets of leaves were spotted to ensure the appearance of all those amino acids present in lower quantities as well as to separate the overlapping bands which do so only in dilute solutions.

The amino acids and amides were separated by the horizontal migration-multiple sector chromatographic technique of RANJAN *et al.*<sup>4</sup> and the common bands of glutamic acid + threonine and serine + glycine + aspartic acid were separated using MCFARREN's technique<sup>5</sup> (Solvent: Phenol saturated with buffer of pH 12).

The acid hydrolysate of all the three sets of leaves revealed the same range of amino acids; leucine + isoleucine + phenylalanine (average Rf value 0.83 band No. 1 and 2), valine + methionine (0.72; 3), tyrosine (0.67; 4) and alanine (0.56; 5), glutamic acid + threonine (0.51; 6), glycine + aspartic acid (0.45; 7), arginine (0.39; 8) and histidine + lysine (0.35; 9).

The alcoholic extracts of "Yellow-Mosaic" and "Completely Yellow" leaves showed a general increase in the concentration of the amino acids over that of healthy leaves (*cf.* BAWDEN<sup>6</sup>). Leucines + phenylalanine (av. Rf 0.83; I) and valine + methionine (av. Rf 0.70; II) were new developments in diseased leaves only. However, they were traceable in a sector where 0.003 ml of healthy leaf extract was kept but were in such small

<sup>1</sup> B. N. UPPAL, P. M. VARMA, and S. P. CAPOOR, *Curr. Sci.* 9, 227 (1940).

<sup>2</sup> L. F. MARTIN, A. K. BALLS, and H. H. MCKINNEY, *Science* 87, 329 (1938). – M. MENIGHINI and C. C. DELWICHE, *J. Biol. Chem.* 189, 177 (1951). – B. COMMONER and V. NEHARI, *J. Gen. Physiol.* 36 (6), 791 (1953). – M. M. LALORAYA and GOVINDJEE, *Nature* 175, 907 (1955). – S. RANJAN and T. RAJARAO, *Flora* (Jena) 143, 87 (1956).

<sup>3</sup> M. M. LALORAYA and GOVINDJEE, *Nature* 175, 907 (1955). – M. M. LALORAYA, GOVINDJEE, RAJNI VERMA, and T. RAJARAO, *Exper.* (in press).

<sup>4</sup> S. RANJAN, GOVINDJEE, and M. M. LALORAYA, *Proc. Natl. Inst. Sci. (India)* 21, B 10, 42 (1955).

<sup>5</sup> EARL F. MCFARREN, *Anal. Chem.* 23, 168 (1951).

<sup>6</sup> F. C. BAWDEN, *J. Sci. and Industr. Res.* 13 (3), 196 (1954). – F. C. BAWDEN and N. W. PIRIE, *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 3, 171 (1952).