

so that the final cell concentration was 5×10^6 /ml medium. They were aerated with 96% O_2 + 4% CO_2 and cultivated at 37°C for 6, 12, 24, 48 h up to 9 days. At the same time, a control series was always started, prepared under the same conditions, and kept at 4°C; 200 ml of medium were used in each experiment. The number of lymphoid cells counted in a Bürcker chamber and the viability test with trypan blue were determined every day of cultivation. After terminating cultivation at the times indicated above, the medium was concentrated and analysed for antibodies using agglutination with *Brucella suis* antigen. γ -Globulin was determined electrophoretically. After centrifugation, the cultivated cells were adjusted to the same concentration as for transfer to infant rabbits, i.e. to 60×10^6 cells/ml. This suspension of cultivated cells was again transferred to newborn rabbits.

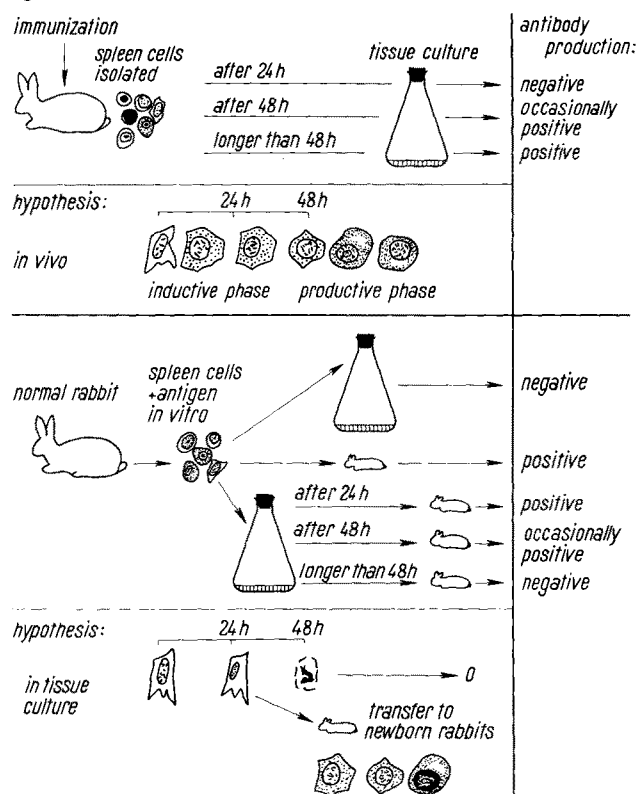


Fig. 2

Antibodies were never found in any experiment with cultivation of cells together with the antigen *in vitro*, not even after concentrating the culture medium 40 times. If, however, the cultivated cells were transferred after 6, 12, 24, and occasionally also 48 h cultivation to infant rabbits, antibody formation was induced (titre 1:32–256). If cells were transferred after longer cultivation (72 h to 9 days) formation of antibodies could never be demonstrated after transfer to infant rabbits.

Figure 2 summarizes the results of cultivation and the conclusions of the experiment. If spleen cells were taken from an immunized donor, antibodies could only be demonstrated if cells already producing antibodies were used for tissue culture. If isolated cells from a non-immunized donor were cultivated with an antigen *in vitro*, antibody formation in the tissue culture could never be demonstrated under any of the experimental conditions. Mixing the same cells *in vitro* with the antigen and subsequently transferring them to infant rabbits always resulted in antibody formation. If these cells were cul-

tivated and transferred after certain time intervals into infant rabbits it was demonstrated that the ability to form antibodies in a tissue culture is maintained for only 24–48 h after explantation; then it disappears.

The results are interpreted to indicate that contact of the antigen with primitive mesenchymal cells¹² and their further division and differentiation¹³ are necessary for antibody formation to commence – for the inductive phase. As long as the formation of productive cells is not terminated under conditions permitting these changes, i.e. *in vivo*, formation of antibodies in tissue cultures does not occur. Cells able to commence antibody formation do not lose this ability *in vitro* and survive there for a certain period. Formation of antibodies is only realised if they are transferred to suitable conditions, i.e. when cultivated *in vivo*.

J. ŠTERZL

Division of Immunology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Praha, September 20, 1958.

Zusammenfassung

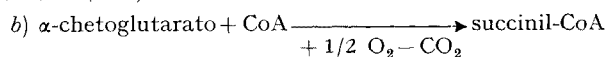
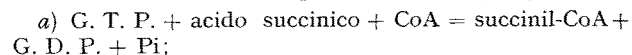
Aus einem normalen, nicht immunisierten Kaninchen isolierte Milzzellen, welche *in vitro* 6, 12, 24 und 48 h kultiviert und nachher zusammen mit *Brucella-suis*-Antigen in das Peritoneum neugeborener Kaninchen übertragen wurden, erzeugen Antikörper. Die Antikörper werden im Serum der Empfänger, das heisst neugeborener Kaninchen, welche selbst noch nicht zur Antikörperbildung befähigt sind, festgestellt. Falls die Milzzellen nach 72stündiger oder längerer Kultivierung auf neugeborene Kaninchen übertragen werden, ist diese Übertragung niemals von Antikörperbildung begleitet.

¹² J. ŠTERZL, *Mesenchymal tissue during immunisation and infection* (Praha 1954).

¹³ R. W. WISSLER, F. W. FITCH, M. F. LAVIA, and C. A. GUNDERSON, *J. cell. comp. Physiol.* 50, Suppl. 1, 265 (1957).

Meccanismo dell'azione attivatrice esplicata dal Guanosintrifosfato (G.T.P.) sui sistemi enzimatici ossidasici dei grassi. Nota IV

I sistemi enzimatici ossidasici dei grassi preparati dal fegato di cavia sono attivati dall'A.T.P., dal G. T. P. e dall' α -chetoglutarato¹⁻³. Il G. T. P. e l' α -chetoglutarato sembrano agire con meccanismo analogo, diverso da quello esplicato dall'A. T. P. Poichè il processo di attivazione consiste nel fornire energia al sistema enzimatico ossidasico dei grassi per la sintesi degli acil-Coenzima A – sintesi indispensabile affinché il processo ossidativo possa svolgersi – si può prospettare che tale energia possa essere fornita dal G. T. P. e dall' α -chetoglutarato con due meccanismi: 1) o indirettamente nel senso che sia il G. T. P. che l' α -chetoglutarato forniscono energia per la sintesi del succinil-CoA secondo le seguenti reazioni a) e b):



e a sua volta il succinil-CoA potrebbe trasferire il CoA direttamente all'acido grasso secondo la seguente reazione c):

¹ M. SACCHETTO e C. R. ROSSI, *Exper.* 14, 253 (1958).

² C. R. ROSSI e M. SACCHETTO, *Exper.* 14, 254 (1958).

³ M. SACCHETTO e C. R. ROSSI, *Exper.*, in corso di pubblicazione.

μM O_2 consumate per l'ossidazione dell'acido caprilico nello spazio di tempo di 20 min da 100 mg di estratto enzimatico secco. Caprilato $0,7 \times 10^{-3} M$, α -chetoglutarato $1 \times 10^{-3} M$, Mg^{++} $1 \times 10^{-2} M$, G. T. P. $10 \mu M$, AsO_4^{---} $40 \mu M$. Tampone-Na-K pH 7,4 cm³ 2,4. Preparato enzimatico secondo LEHNINGER 0,2 cm³

Attivatori	A O_2 totale consumato dal sistema enzimatico	B O_2 impiegato per la formazione di acido acetacetico
α -chetoglutarato	12,20	8,50
α -chetoglutarato + AsO_4^{---}	0,00	0,00
G. T. P.	9,80	7,10
G. T. P. + AsO_4^{---}	8,30	6,00

c) succinil-CoA + R-COOH \longrightarrow R-CO-CoA + ac. succinico;

2) oppure l'energia per la sintesi degli acil-CoA potrebbe essere fornita al sistema enzimatico dal G. T. P. in maniera diretta, e dall' α -chetoglutarico indirettamente tramite il G. T. P.: infatti dall'ossidazione dell' α -chetoglutarato si forma succinil-CoA [reazione b)] e l'energia del legame tioestereo di questo può essere trasferita in quello anidridico del G. T. P. [reazione a) decorrente da destra a sinistra].

Il fatto che l'arseniato blocchi l'azione attivatrice dell' α -chetoglutarato² può accordarsi con tutte due le ipotesi su riferite: infatti in presenza di arseniato il succinil-CoA che deriva dall'ossidazione dell' α -chetoglutarato subisce un processo di scissione arsenolitica e quindi non può essere utilizzato nè per il trasferimento diretto del CoA all'acido grasso [ipotesi 1)] nè per la sintesi del G. T. P. [ipotesi 2)]. Ora, con le ricerche qui riferite l'azione dell'arseniato è stata determinata impiegando, quale attivatore del sistema enzimatico, non più α -chetoglutarico, come si era fatto nelle ricerche precedenti, ma G. T. P.: è evidente che in questo caso l'arseniato, provocando la scissione arsenolitica del succinil-CoA eventualmente formatosi secondo la reazione a), avrebbe inibito il potere attivatore del G. T. P. soltanto se questo si fosse svolto tramite il succinil-CoA.

Metodi. L'intensità di azione del sistema enzimatico ossidasico degli acidi grassi è stato determinato mediante il metodo precedentemente descritto¹⁻³, con il quale si misura sia la quantità di O_2 consumata globalmente dal sistema per ossidare l'acido caprilico (Tabella, colonna A) sia la quantità di O_2 impiegata per la formazione dell'acido acetacetico (Tabella, colonna B). L'arseniato è stato aggiunto in quantità di $40 \mu M$, concentrazione che nelle precedenti ricerche è risultata sufficiente a bloccare completamente l'azione attivatrice dell' α -chetoglutarato.

Risultati e discussione. I risultati ottenuti dimostrano che l'arseniato nel mentre inibisce completamente l'azione attivatrice esplicata dall' α -chetoglutarato sul sistema enzimatico ossidasico dei grassi, invece non modifica in maniera statisticamente significativa l'azione attivatrice del G. T. P. Ora, poichè in presenza di arseniato avviene la scissione arsenolitica del succinil-CoA eventualmente formatosi utilizzando l'energia del legame anidridico del G. T. P., si deve concludere che il potere attivatore di questo non si esplica tramite il succinil-CoA, ma piuttosto che il G. T. P. attiva i sistemi enzimatici fornendo direttamente energia per la sintesi degli acil-CoA.

C. R. ROSSI e M. SACCHETTO

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova (Italia), 20 ottobre 1958.

Résumé

Dans le foie de cobaye l'arseniato ne modifie pas l'activation provoquée par le G. T. P. sur le système enzymatique des acides gras. De ces résultats on peut conclure que le G. T. P. donne directement l'énergie pour la synthèse des acyl-CoA.

Il succinato ed il fumarato quali regolatori dei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi. Nota V

EMMELOT e Bos¹ riferiscono numerosi dati sperimentali in appoggio all'ipotesi che nei tessuti animali l'intensità di ossidazione degli acidi grassi sia regolata da un lato dalla concentrazione dell'A. T. P., utilizzato per la sintesi degli acil-CoA, d'altro lato dalla concentrazione dell'A. D. P., utilizzato per i processi di fosforilazione legati all'ossidazione dell'acido grasso stesso. Ora nei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi le concentrazioni dell'A. T. P. e dell'A. D. P. possono essere regolate da alcune reazioni concomitanti allo svolgersi del processo ossidativo a carico dell'acido grasso: diminuzione di A. D. P. e corrispettiva sintesi di A. T. P. tramite la fosforilazione ossidativa di un acido del ciclo di Krebs o per azione del sistema fosfocreatina-transfosforilasi, diminuzione di A. T. P. e corrispettiva formazione di A. D. P. per azione dell'esocinasi, dell'atipiasi o di altre fosfatasi aspecifiche. Secondo EMMELOT e Bos tali sistemi esercitano la massima attività sull'ossidazione dell'acido grasso quando le reazioni su descritte si svolgono con intensità tale da mantenere continuamente nel sistema enzimatico una opportuna concentrazione di A. T. P. e di A. D. P. Con le ricerche qui riferite si è tentato di convalidare o meno tale ipotesi determinando il comportamento dell'intensità di azione dei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi in rapporto al variare della concentrazione dell'A. T. P. e dell'A. D. P. Questo è stato ottenuto variando nel sistema la concentrazione del succinato o del fumarato: tali metaboliti vengono ossidati contemporaneamente all'acido grasso e con intensità variabile in rapporto alla loro concentrazione, quindi varia in maniera corrispondente anche la quantità di A. T. P. sintetizzata e quella di A. D. P. tolta al sistema enzimatico.

Metodi. Il sistema enzimatico ossidasico dei grassi è stato preparato dal fegato di cavia con il metodo di LEHNINGER². Come attivatore si è impiegato A. T. P. ($10 \mu M$). Si sono aggiunte inoltre quantità variabili (da 1 a $100 \mu M$) di succinato o fumarato. Mediante la tecnica manometrica di Warburg, e seguendo le modalità prece-

¹ P. EMMELOT e C. J. Bos, Enzymologia 17, 13 (1954); Biochim. biophys. Acta 16, 620 (1955); 18, 281 (1955); 19, 565 (1956).
² A. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 161, 437 (1945).