

ossalacetico, o comunque diversa da quelle classiche conosciute per il metabolismo microbico e animale.

M. LORINI e V. MORET

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Padova, il 3 novembre 1958.

Summary

In a strain of *Aspergillus niger* grown in Bernhauer medium, oxalacetic decarboxylase activity increased, while citric acid accumulated in the medium. The mechanism of citric acid accumulation is discussed.

Protein Turnover in Glycine-C¹⁴-labelled Landschütz Ascites Tumor Cells

Previous investigations in this laboratory¹ showed that the protein of the tetraploid Ehrlich ascites carcinoma exhibits different degrees of metabolic stability depending on the radioactive amino acid used for labelling. Methionine-S³⁵-labelled protein remained 'stable' during the growth of the tumor, whereas glycine-C¹⁴-labelled protein lost about 67% of its activity during this time. Moreover, the behaviour of methionine-labelled protein in the hyperdiploid Ehrlich-Landschütz ascites tumor was of a third type, showing instability only during the first few days of growth. The present experiments were designed to afford a detailed study of the metabolic stability of glycine-labelled protein in Landschütz ascites cells.

Glycine-2-C¹⁴ and generally labelled leucine- and valine-C¹⁴, all having specific activities of 64–69 μ C/mg, were administered intraperitoneally in 0.1 ml of isotonic saline. Usually 5 μ C were injected per mouse 6–7 days after inoculation with the tumor, and the ascitic fluid was collected 2 days later.

Mice were inoculated with 0.15 ml of undiluted ascitic fluid, labelled as described above, and sacrificed at various times thereafter. The criterion of metabolic stability was that used in earlier studies^{1,2}, namely the relative constancy of the product of free tumor cells/mouse $\times$ specific activity of the tumor cell protein – a valid criterion since the amount of intracellular protein per cell does not change during the experiment^{3,4}. The number of tumor cells in the original inoculum and per mouse on subsequent days was determined by counting in a Buerker haemocytometer⁵ or in a Casella automatic particle counter and sizer, results of the two counting methods agreeing closely. Chemical preparations and measurements of radioactivity were carried out as described previously^{6,7}.

The loss of radioactivity from the glycine-labelled protein was continuous with time and approximately linear (Table I), amounting to 7.8%/day. This value falls between that reported for the early stages of growth of the

Table I

Metabolic Stability of Cell Protein During Tumor Growth
Relative Product:
Cells/mouse $\times$ Protein Specific Activity $\pm$ Standard Error

Days After Inoculation	Glycine-Labelled*	Valine-Labelled**	Leucine-Labelled**
0	100	100	100
4	62 $\pm$ 6	62 $\pm$ 9	64 $\pm$ 9
8	38 $\pm$ 4	36 $\pm$ 19	47 $\pm$ 12

* Four experiments.

** Two experiments.

glycine-labelled TA3 ascites tumor⁸ and that given for the later stages of the glycine-labelled Ehrlich tetraploid line¹. Protein labelled with valine or leucine also showed metabolic instability (Table I), but values were more variable; this instability was at least as great as that exhibited by methionine-labelled protein in Landschütz cells¹.

Table II

Distribution of Radioactivity in Glycine-Labelled Tumor

Cells (89%–99%)*	Protein Nucleic Acid Acid-Soluble	58%–62% 35%–41% 1%–3%
Serum (1%–11%)*	Protein Acid-Soluble	82%–95% 5%–18%

* % of total tumor activity.

The distribution of radioactivity within glycine-labelled tumors is given in Table II. Most of the serum activity was found in the protein fraction, suggesting that some or all of the activity lost by the protein left the cells in the form of intact protein, either by cell rupture or through the cell membrane. The former possibility would bring about a constant apparent instability of all cellular constituents (viz., DNA, RNA, protein), which is not the case¹. The latter possibility was ruled out in the following manner.

Since the mice were inoculated with *intact* labelled tumor, the inoculum contained a considerable amount of radioactive serum protein. It was first shown that the serum protein activity/mouse 8 days after inoculation was much less than that on day 0. Then an experiment was carried out in which the ascites cells and serum were separated by centrifugation, the cells washed in Krebs-Ringer phosphate buffer, and a suspension of cells in buffer injected. Control mice were injected with a volume of intact ascitic fluid containing the same number of tumor cells. Measurements at several stages of growth showed that the specific, as well as the total activity of the serum protein was much lower in the group which had received cells suspended in buffer. Moreover, it had been shown that the activity lost by the cells of the Landschütz tumor was taken up, but not accumulated, by the tissues of the host, the specific activity of the liver being closer to that of the total carcass than any other organs⁴. Therefore, in the previous experiment, comparison of the specific activities of liver protein and ascites serum protein was made in the groups inoculated with intact tumor

¹ A. FORSSBERG and L. RÉVÉSZ, *Biochim. biophys. Acta* 25, 165 (1957).

² L. RÉVÉSZ, A. FORSSBERG, and G. KLEIN, *J. nat. Cancer Inst.* 17, 37 (1956).

³ L. LEDOUX and S. H. REVELL, *Biochim. biophys. Acta* 18, 416 (1955).

⁴ J. S. FINLAYSON and A. FORSSBERG, Unpublished observations.

⁵ G. KLEIN and L. RÉVÉSZ, *J. nat. Cancer Inst.* 14, 229 (1953).

⁶ A. FORSSBERG and G. KLEIN, *Exp. Cell Res.* 7, 480 (1954).

⁷ A. FORSSBERG, J. S. FINLAYSON, and G. DREYFUS, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

⁸ J. GREENLEES and G. A. LE PAGE, *Cancer Res.* 15, 256 (1955).

or cells plus buffer. On day 8 the liver/serum ratio was 0.5 in the former group but was 0.9 in the latter, indicating that in the absence (or near-absence) of serum protein in the inoculum an equilibrium was established between the active protein of the liver and (via the protein of the blood plasma⁹) that of the ascites serum. These findings give no evidence for any escape of active protein from the cells to the serum, indicating that the radioactivity lost from the protein fraction left the cells in the form of acid-soluble glycine. It is therefore concluded that the proteins of the Landschütz tumor undergo intracellular turnover during growth. Attempts to enhance the loss of activity from the tumor protein by injecting physiological amounts of unlabelled glycine or leucine were unsuccessful, though injecting alanine or large amounts of glycine could cause cell damage.

This work was supported by the Swedish Cancer Society, the Wallenberg Foundation, and the National Cancer Institute, U. S. Public Health Service, of which one author (J. S. F.) was a post-doctoral research fellow.

J. S. FINLAYSON, A. FORSSBERG,
and G. DREYFUS

Institute of Radiophysics, Stockholm (Sweden), November 17, 1958.

Zusammenfassung

Untersuchungen über die Stabilität der Eiweißstoffe von Landschütz-Aszites-Tumoren wurden an C¹⁴-Glykoll, -Valin oder -Leucin markierten Zellen durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass während der Zellteilung und des Wachstums kontinuierlich etwa 5–10% pro Tag der einmal gebundenen C¹⁴-Aktivität als niedrigmolekulare Komponenten in die Aszitesflüssigkeit ausgeschieden wird. Diese Instabilität kommt offenbar durch intrazelluläre Umsetzung der Eiweißstoffe und nicht durch Ausscheidung ganzer Eiweissmoleküle zustande.

⁹ R. L. STRAUBE, *Cancer Res.* 18, 57 (1958).

Nachweis von Nahrungsmittel-Antikörpern mittels der Hämagglutination

Immunantikörper gegen Kuhmilch können sowohl mittels der Präzipitinreaktion wie mit der Methodik der Komplementbindung aufgedeckt werden. In der Praxis, das heisst bei dem Versuch des Nachweises von Kuhmilchantikörpern beim Mensch, versagt jedoch häufig das erste Verfahren, weil der Titer ein geringer ist. Überlegen ist die Methodik der Komplementbindungsreaktion, und zwar besonders dann, wenn das Gemisch aus Antigen-Kuhmilchverdünnung, Prüfungsserum und Komplement über Nacht bei Eisschranktemperatur gehalten wird. Bei der Verwendung der Komplementbindungsreaktion ergab sich, dass während der ersten 12 Lebensmonate bei Säuglingen und Kleinkindern, die mit Kuhmilch oder mit kuhmilchhaltigen Produkten ernährt waren, ein hoher Prozentsatz der Probanden mit der Bindung von Kuhmilch-Antikörpern reagierte. Die Zahl der von den einzelnen Autoren erhaltenen positiven Antikörper-Befunde ist jedoch Schwankungen unterworfen, über die an anderer Stelle zusammenfassend berichtet wurde¹. Bei diesem Bericht wurde auch darauf hingewiesen, dass bei Säuglingen und Kleinkindern der Übertritt von Kuhmilch aus

dem Magen-Darmtrakt in die Blutbahn mit Antikörperbildung fast ein physiologisches Phänomen darstellt, welches nur selten zu Krankheitserscheinungen führt.

Als Nachteile der Komplementbindungsreaktion sind die Schwierigkeiten der Ablesungen zu erwähnen, die darin bestehen, dass in den starken Antigenkonzentrationen das Reaktionsgemisch ein so trübes ist, dass Fehlen oder Eintritt von Hämolyse als Indikator zustandegekommer oder ausgebliebener Antigen-Antikörper-Reaktion sich kaum beurteilen lässt. Auch die Tatsache, dass man bei der Komplementbindungsreaktion den Antikörper-Titer nicht dadurch ermittelt, indem man das zu prüfende Serum verdünnt, sondern indem man Dilutionen der Kuhmilch herstellt, deren Antikörper-Bindungsvermögen als Titer bezeichnet wird, liess es als wünschenswert erscheinen, die bisherigen Verfahren durch eine Methodik zu ergänzen bzw. zu ersetzen, welche zu einer direkten Aussage über den Gehalt an Antikörpern im Serum berechtigt.

Zu diesem Zwecke bedienten wir uns der Hämagglutinationsmethode in der von BOYDEN² angegebenen Technik, in welcher die auf ihre Agglutinierbarkeit zu prüfenden Blutkörperchen durch Versetzen mit Tannin so sensibilisiert wurden, dass ihre Ausflockung besonders leicht erfolgte. VON BOYDEN zeigte, dass Schafblutkörperchen nach Sensibilisierung durch Tannin die verschiedensten Antigene adsorbieren und in Gegenwart der korrespondierenden Immunsereen durch hochgradige Dilutionen zur Agglutination gebracht werden. Auch bei dem von WITEBSKY³ *et al.* neuerdings erbrachten Nachweis, dass die Entstehung bestimmter Formen chronischer Schilddrüsenentzündung auf eine Autoantikörperbildung zurückzuführen ist, spielte die Verwendung von Null-Erythrozyten, die mit Tannin sensibilisiert waren, eine entscheidende Rolle.

Unser Vorgehen bei dem Ansetzen des Hämagglutinationsversuches zwecks Nachweis von Kuhmilchantikörpern in Seren von Säuglingen und Kleinkindern gestaltete sich folgendermassen:

1. Wir verwendeten Null-Blutkörperchen, die aus den Blutproben des eingehenden Untersuchungsmaterials gewonnen waren und keinerlei Zusätze enthielten. Nach Entfernung des Blutkuchens wurden die restlichen Blutkörperchen dreimal mit isotonischer veronalhaltiger Kochsalzlösung gewaschen und mit ihr wieder aufgefüllt, so dass eine etwa 5% ige Suspension von Erythrozyten resultierte.

2. Mit *acidum tannicum* wurde in destilliertem Wasser eine 0,5-prozentige Lösung hergestellt, aus der wir durch Aufnahme in Veronal-Kochsalz-Lösung eine Verdünnung von 1:25000 gewannen (0,1 cm³ *acidum tannicum* 1:100 plus 12,4 cm³ Veronal-NaCl-Lösung).

3. Zwecks *Sensibilisierung* der Null-Erythrozyten wurden 5 cm³ der nach 1 hergestellten Suspension mit 5 cm³ der nach 2 präparierten *acidum tannicum*-Lösung versetzt, das Gemisch 30 min bei Zimmertemperatur gehalten und anschliessend 4mal mit Veronal-NaCl-Lösung so gewaschen, dass wieder eine 5%ige Erythrozyten-Suspension resultierte.

4. Diese Erythrozyten-Aufschwemmung wurde zu gleichen Teilen mit Kuhmilch versetzt, welche zuvor mit Veronal-NaCl-Lösung in eine 1%ige Dilution gebracht worden war. Das Gemisch hielten wir 60 min bei 37°C, zentrifugierten es, wuschen es einmal mit Veronal-NaCl-

² S. V. BOYDEN, *J. exp. Med.* 93, 107 (1951).

³ E. WITEBSKY, N. R. ROSE, K. TERPLAN, J. R. PAINE und R. W. EGAN, *J. Amer. med. Assoc.* 164, 1439 (1957).

¹ E. BERGER, *Ann. Paediat.* 181, 295 (1953).