



Kinetic of induction of plaque formation in cell monolayers by isolated RNA from poliovirus (average of three experiments), Curve 1 at 36°C, Curve 2 at 20°C.

The interaction of the RNA with the cells is stopped by applying the agar overlay or by washing with physiological saline (Hanks solution). Identical results are obtained with both procedures.

The results of our experiments are shown in the Figure. The interaction of viral RNA with the host cell leads to a rapid initial increase of infected plaque forming units during the first 8 to 10 min after seeding and thereafter to an ever-decreasing rate of further induction of cells to plaque forming units. The rate of plaque induction by RNA does not differ significantly when cell monolayers are incubated at 20° or 36°C after seeding, and an almost identical number of plaques/plate is obtained by a given sample of RNA at these temperatures.

We have also followed the induction of plaque formation by RNA at 0° to 4°C. The results have been erratic from one experiment to another. In all experiments the increase in the number of plaques between 0 and 20 min after seeding was somewhat lower than at 20°C, but otherwise identical with respect to the rate of uptake. The RNA infectivity at 4°C was variable over a wide range from one experiment to another and showed an infectivity of the order of 1 to 70% of its infectivity in parallel experiments at 20°C. No explanation can be offered so far for the erratic results obtained at 4°C.

The time-dependent differences in the rate of induction of plaques by RNA in cell monolayers are understandable by either one of the following assumptions: (1) The cells are sensitive to RNA only for a short interval after exposure to hypertonic saline and become less and less sensitive with time after seeding. Not all potentially infective RNA is taken up by the cells according to this hypothesis. (2) The cell monolayers are not free from RNase or RNA inhibitors. (3) The isolated RNA from poliovirus is heterogeneous with regard to the ability to interact with cells.

Experiments are being undertaken in our laboratory to prove or disprove these assumptions. Results obtained so far strongly favour hypothesis 1.

G. KOCH

Babies Hospital and Department of Pediatrics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, and Laboratorium der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf (Germany), July 22, 1960.

Zusammenfassung

Die Kinetik der Induktion von Plaques in Einschichtenzellkulturen wurde bei 20° und 36°C bestimmt. Es nimmt die Zahl der durch RNS induzierten Plaques in den ersten 8 bis 10 min nach Kulturbimpfung schnell und dann allmählich langsamer zu. Die möglichen Ursachen dieses Verhaltens werden diskutiert.

Thermische Denaturierung von Kaltblüter-Enzymproteinen

Die Adenosintriphosphatase aus Karpfenmuskulatur zeigt eine bemerkenswerte hohe Hitzelabilität (PARTMANN¹). Versuche einer Hitzedenaturierung bei der Reinfektion von Kathepsin aus Dorschmuskulatur anzuwenden, waren ohne Erfolg (SIEBERT und v. MALORTIE²). Der Dorsch, *Gadus callarias* (= *morrhua*) L., lebt üblicherweise bei einer Wassertemperatur von + 5 bis + 10°C. Es erhebt sich daher die Frage, ob es eine generelle Eigenschaft von Kaltblüter-Enzymproteinen ist, dass sie bereits bei wesentlich niedrigeren Temperaturen denaturiert werden als es der allgemeinen Erfahrung mit Warmblüter-enzymen entspricht. Die nachstehend beschriebenen Versuche wurden zur Klärung dieser Frage unternommen.

Methodik. Im allgemeinen werden thermische Denaturierungen von gelösten Proteinen so vorgenommen, dass für den Effekt sowohl die Zeitdauer der Erhitzung als auch die erreichte Temperatur wichtig sind. In den hier zu beschreibenden Versuchen hat es sich bewährt, den Zeitfaktor dadurch zu eliminieren, dass grundsätzlich die gewünschte Temperatur in einer wassergefüllten Durchströmungsapparatur während voller 60 min zur Einwirkung kam. Kontrollversuche haben gezeigt, dass im allgemeinen 10–15 min, höchstens jedoch 30 min ausreichen, um ein bestimmtes Denaturierungsmaß herzustellen, das sich bei Ausdehnung der Erhitzungszeit auf 60 min nicht mehr wesentlich ändert. Die nach so definierter Hitzeeinwirkung messbare Enzymaktivität wurde in % des Ausgangswertes ausgedrückt und gegen die angewandte Temperatur graphisch aufgetragen. Als Kriterium der thermischen Resistenz diente die durch Extrapolation von mindestens 4 – auf einer Geraden liegenden – Messpunkten erhaltenen Temperatur, bei der 50% der Anfangsaktivität des betreffenden Enzyms zerstört sind. Als Untersuchungsmaterial wurde in fangfrischem Zustand (auf See) tiefgefrorenes Dorschfilet benutzt, das zur Extraktion der Enzymproteine der Glykolyse mit 1%iger KCl-Lösung, zur Extraktion proteolytischer Enzyme mit 1%iger LiBr-Lösung homogenisiert wurde. Aktivitätsbestimmung der Enzyme: Kathepsin nach LASKOWSKI³, Glycylglycindipeptidase nach SMITH⁴, Ninhydrinreaktion nach MOORE und STEIN⁵, Isocitricodehydrogenase nach SIEBERT *et al.*⁶, Milchsäuredehydrogenase nach BÜCHER

Die Untersuchungen wurden dankenswerterweise durch eine Beihilfe des Bundeswirtschaftsministeriums Bonn unterstützt. Herrn DEGENER, i. Fa. Hanseatische Hochseefischerei A.G., Bremerhaven-F., verdanken wir das Untersuchungsmaterial.

¹ G. NEMITZ und W. PARTMANN, Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 109, 121 (1959).

² G. SIEBERT und R. v. MALORTIE, unveröffentlicht.

³ M. LASKOWSKI, Methods Enzymol. 2, 27 (1955).

⁴ E. L. SMITH, Methods Enzymol. 2, 93 (1955).

⁵ S. MOORE und W. H. STEIN, J. biol. Chem. 211, 907 (1954).

⁶ G. SIEBERT, J. DUBUC, R. C. WARNER und G. W. E. PLAUT, J. biol. Chem. 226, 965 (1957).

Tab. I. Aktivität und Hitzedenaturierung verschiedener Enzyme in der Dorschmuskulatur

Enzym	Enzymquelle	Mess-temperatur °C	Aktivität		Temperatur, bei der nach 1 stündiger Einwirkung 50%ige Denaturierung erfolgt
			gesamt μMol/h/g Frischgewicht	spezifisch μMol/h/mg Protein	
Kathepsin, Rohextrakt	Dorschmuskel	37	2.9(Tyrosin)	0,17	44
Kathepsin, teilgereinigt	Dorschmuskel	37	—	5,3	52
Glycylglycindipeptidase	Dorschmuskel	40	420	158	42
Glycylglycindipeptidase	Rindermuskel	40	185	35	46
Milchsäuredehydrogenase	Dorschmuskel	25	20 100	750	52
Aldolase	Dorschmuskel	25	1 250	43	41
Triosephosphatdehydrogenase	Dorschmuskel	25	4 600	180	51
Enolase	Dorschmuskel	25	3 080	128	45
Pyruvatkinase	Dorschmuskel	25	3 410	141	51
Isocitricodehydrogenase	Dorschmuskel	25	202	8,4	30

Tab. II. Q_{10} -Werte von zwei Enzymen aus Dorschmuskulatur

Messbereich in °C, der zur Berechnung benutzt wurde	Glycylglycin- dipeptidase	Kathepsin, teilgereinigt
von 37 bis 27		
32 22	1,66	2,03
27 17	1,84	
22 12	1,97	1,86
17 7	2,13	
12 2	2,17	2,13
7 — 3	2,67	
— 3 — 13		2,41
		2,45

et al.⁷, Aldolase, Triosephosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase nach BÜCHER et al.⁸, Enolase nach BÜCHER⁹, Proteinbestimmung nach LOWRY et al.¹⁰.

Ergebnisse. Die in Tabelle I enthaltenen Versuche zeigen, dass der Bereich 50%iger Denaturierung in sehr weiten Grenzen, zwischen 30 und 52°C, schwankt. Die von PARTMANN untersuchte Adenosintriphosphatase fällt mit etwa 38°C in den unteren Bereich. Gesetzmäßigkeiten bezüglich der Lebensweise als Kaltblüter lassen sich aus diesen Daten daher nicht ableiten. Proteinchemische Konsequenzen hinsichtlich besonders geringer thermischer Stabilität (etwa im Gegensatz zu den hochgradig hitzeresistenten Enzymproteinen thermophiler Bakterien) können erst erörtert werden, wenn die betreffenden Enzyme in gereinigter Form vorliegen. Reinigungseffekte durch Erhitzung haben wir beobachtet bei Milchsäuredehydrogenase (2fach), Enolase (2,2fach), Pyruvatkinase (2,8fach) und Triosephosphatdehydrogenase (3,5fach), jedoch nicht weiter verfolgt. Von den verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten, warum gereinigtes Kathepsin (SIEBERT und v. MALORTIE²) eine grösse Hitzeresistenz als das im Rohextrakt vorliegende Enzym aufweist, wird keine durch die bisher vorliegenden experimentellen Erfahrungen gestützt.

Wie zu erwarten, sind die thermodynamischen Qualitäten der Kaltblüterenzyme gleich denen der Warmblüterenzyme. Dies geht aus Tabelle II hervor, in der für Glycylglycin-dipeptidase und für Kathepsin aus Dorschmuskulatur die Temperaturkoeffizienten Q_{10} zusammengestellt sind. Der im Messbereich 37–27°C aus der Reihe fallende Wert für Kathepsin, der einen im Verhältnis zu geringen Umsatz bei 37°C anzeigt, dürfte auf bereits beginnende thermische Denaturierung zurückzuführen sein,

obwohl erfahrungsgemäss bei den hier untersuchten Enzymen Substratgegenwart vor der Hitzedenaturierung in gewissem Umfang zu schützen vermag.

G. SIEBERT, A. SCHMITT,
R. v. MALORTIE und E. ADLOFF

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Mainz
(Deutschland), 14. Juli 1960.

Summary

The temperature, which leads to 50% reduction of catalytic activity by heat denaturation, has been determined for 8 different enzymes from cod muscle, as being in the range between 30 and 52°C. Therefore, there are no indications of a generally different heat resistance of enzymes from cold-blooded animals as compared with those from warm-blooded animals. The same conclusion is derived from calculations of Q_{10} -values, measured between + 37 and - 13°C for cathepsin and glycylglycine dipeptidase.

⁷ A. DELBRÜCK, E. ZEBE und T. BÜCHER, Biochem. Z. 331, 273 (1959).

⁸ R. SCHOLZ, H. SCHMITZ, T. BÜCHER und J. O. LAMPEN, Biochem. Z. 331, 71 (1959).

⁹ T. BÜCHER, Methods Enzymol. I, 427 (1955).

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

Release of 5-Hydroxytryptamine and Histamine from Neoplastic Mast Cells by Alkaline Tissue Extracts¹

The pharmacological release of biogenic amines from a number of tissues by reserpine and related compounds is now a well-documented phenomenon^{2,3}. In the intact anesthetized dog, without pharmacological intervention, 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) has been shown to be released from the gastro-intestinal tract, but the natural stimulus responsible for this release is not known⁴.

¹ Aided in part by grant B-940 from National Institute of Neurological Diseases and Blindness, and in part by the James Hudson Brown Memorial Fund of Yale Medical School.

² B. B. BRODIE, in *5-Hydroxytryptamine* (Ed. by G. P. LEWIS, Pergamon Press, New York and London 1958, p. 64.)

³ M. K. PAASONEN and M. VOGT, J. Physiol. 131, 617 (1956)

⁴ C. C. TOH, J. Physiol. 126, 248 (1954).