

Isolierung der tuberkulinaktiven Proteine aus dem Tuberkulin mit Hilfe von Dextran-Gel

Im Rahmen unserer Untersuchungen¹⁻³ über die Spezifität der Tuberkuloproteine in erhitzten humanen, bovinen und aviären Tuberkulosebakterien-Kulturfiltraten trat das Problem auf, die biologisch aktiven Substanzen aus dem Tuberkulin in grösseren Mengen rasch, exakt und ungefährlich für den Untersuchenden isolieren zu können. Die Trennung der spezifischen tuberkulinaktiven Proteine von den im Tuberkulin noch enthaltenen Lipiden, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Nährbodenbestandteilen mit den bisher üblichen Fällungsmitteln wie Trichloressigsäure, Methanol, Ammonsulfat u.a. ist nicht nur umständlich und gelegentlich mit einer Verminderung der biologischen Wirksamkeit verbunden, sondern die gefällten Fraktionen enthalten auch noch grössere Mengen an Fremdstoffen⁴.

Eine Reihe von Arbeiten der letzten Zeit zeigten, dass die Methode der Gelfiltration mittels Dextran-Gel ein einfaches Verfahren darstellt, die einzelnen Bestandteile biologischer Gemische je nach den Unterschieden in ihren Molekülgrössen rasch zu trennen oder zu fraktionieren. Da ausserdem das Dextran-Gel sich gegen biologische Substanzen indifferent verhält und deren Aktivität erhalten bleibt, versuchten wir, die tuberkulinaktiven Proteine durch Gelfiltration aus den erhitzten Kulturfiltraten zu isolieren.

Als Dextran-Gel benutzten wir Sephadex G 50 medium (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Präparation der Säule erfolgte nach den Angaben der Herstellerfirma. Für die Aequilibration der Chromatographiesäule und die Elution der aufgetragenen Tuberkulosebakterien-Kulturfiltrate wurde isotone Natriumchloridlösung verwendet. Hitzekonzentriertes albumosefreies Tuberkulin musste vor der Filtration mit derselben Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt werden, da dieses Präparat zu viskös ist und infolge von Schwanzbildung die Säule unregelmässig durchläuft. Das Eluat wurde in 3 ml-Fractionen aufgefangen.

Die Untersuchungen der einzelnen Fraktionen ergaben, dass aus einer Sephadex-G-50-Säule zuerst die Tuberkuloproteine austreten. Die Menge des in die Säule eingebrachten Tuberkuloprotein-Stickstoffes konnte verlustfrei in dieser Zone wiedergefunden werden. In den letzten Fraktionen des Proteinbereiches jedoch waren neben den Eiweisskörpern bereits Lipide und Spuren von Polysacchariden nachweisbar. Alle Fraktionen dieser Tuberkuloproteinzone erwiesen sich im Tierversuch bei mit humanen, bovinen und aviären Tuberkulosebakterien sensibilisierten Meerschweinchen und bei tuberkulösen Rindern als biologisch hoch aktiv, wobei Wirkungsmaxima im ersten und zweiten Drittel dieses Bereiches festzustellen waren.

Die der Eiweisszone folgenden Fraktionen zeigten bei der Auswertung an sensibilisierten Meerschweinchen und tuberkulösen Rindern in keinem Fall biologische Aktivität. Desgleichen war Tuberkuloprotein-Stickstoff nicht mehr nachweisbar. Bei der qualitativen Untersuchung konnten Lipide, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Aminozucker und Nährbodenbestandteile, insbesondere Asparagin und Glycerin festgestellt werden.

Summary. By filtering heated filtrates of the cultures of *Mycobacterium tuberculosis* human, bovine and avian type respectively through the dextran-gel Sephadex 50, it is possible to separate the tuberculo-proteins from the other inactive constituents in a simple manner.

W. STÖCKL, W. KROCZA und H. MATHOIS

Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Mödling bei Wien und Bundesanstalt für Virusseuchenbekämpfung bei Haustieren in Wien-Atzgersdorf (Österreich), 2. Juli, 1962.

¹ W. STÖCKL und H. MATHOIS, Wien, tierärztl. Mschr. 47, 683 (1960).

² H. MATHOIS, H. SPADIUT und W. STÖCKL, Wien, tierärztl. Mschr. 47, 833 (1960).

³ W. STÖCKL, Berliner Medizin 12, 177 (1961).

⁴ D. S. P. PATTERSON, Tubercle 40, 71 (1959); 41, 186 (1960).

Studies on the Action of some Enzymes on the Cuticle of *Fasciola hepatica* L.

The cuticle of trematodes has been studied only to a limited extent from a biochemical and histochemical point of view. Protein¹, mucopolysaccharides² and polyphenols³ have been described in the cuticle of the liver fluke and in *Fasciola indica* V. The cuticle was shown to be proteinaceous with 1:2 glycol groups but lacking unsaturated lipids³. Supposing that a fasciolicidal effect of a substance could be due to its action on or solubility in the cuticle, it was of interest to get information on the nature of the cuticle of *Fasciola hepatica*. Thus the following study with protein-, carbohydrate-, and lipid-splitting enzymes was made:

(1) For each enzyme or enzyme mixture, 3 living adult flukes were placed in 3 ml 0.15 M NaCl (containing < 0.004% Ca²⁺) and 0.01 g enzyme (see Table). Controls were run without enzymes. The experiments were performed under sterile conditions at + 37°C and pH 5.5–6.0. Observations were made, 3 times with intervals of 1 h, in a stereomicroscope at 80×. A disintegrating effect on the surface of the flukes was indicated by + and a negative or vague effect by – as shown in the Table.

The results indicate that the cuticle of the liver fluke consists of protein, since it is disintegrated by a series of proteolytic enzymes. Since the other tested enzymes had no visible effect on the cuticle with the technique used, the carbohydrate- and lipid-splitting enzymes were tested on histological sections.

(2) For studying components of carbohydrate nature, the flukes were fixed in Carnoy's fluid. Sections were treated with the carbohydrate-splitting enzymes, listed in the Table, for 1 and 3 h at pH 5.5–6.0 and + 37°C and subsequently stained according to the periodic acid-Schiff (PAS) method. Other sections were stained without previous treatment with enzymes. Some of these sections were stretched on ethanol and provided with a film of collodion before staining, whereas others were prepared without these precautions.

In untreated sections the cuticle was lined by a distinctly PAS-positive rim, whereas the inner part of it was faintly PAS-positive with small, strongly PAS-positive granules

¹ A. PASSATH, Wien, Tierärztl. Monatsschr. 49, 376 (1957).

² L. MONNÉ, Arkiv Zool. 12, 343 (1959).

³ M. B. LAL and S. C. SHRIVASTAVA, Exper. 16, 185 (1960).

scattered in it (Figure 1). In sections treated with amylase the PAS-positive granules had mostly disappeared and the outer and inner parts of the cuticle seemed to show a slightly weaker PAS-positive reaction than the untreated sections (Figure 2). Almost the same results as

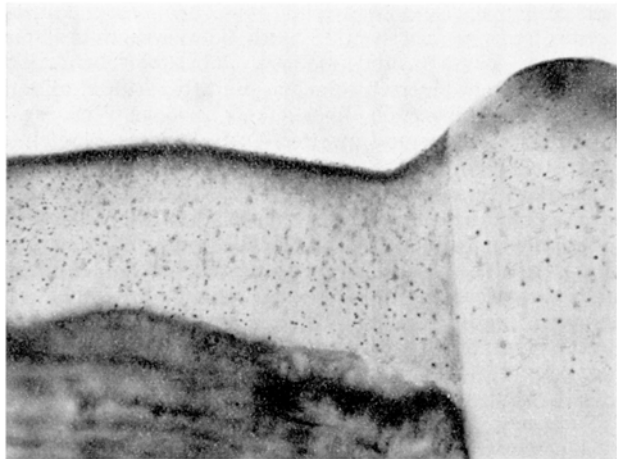


Fig. 1. Cuticle from liver fluke showing glycogen granules and a PAS-positive rim. Part of a spine is seen to the right. Stained with PAS after 3 h treatment with distilled water at + 37°C. 800 ×.

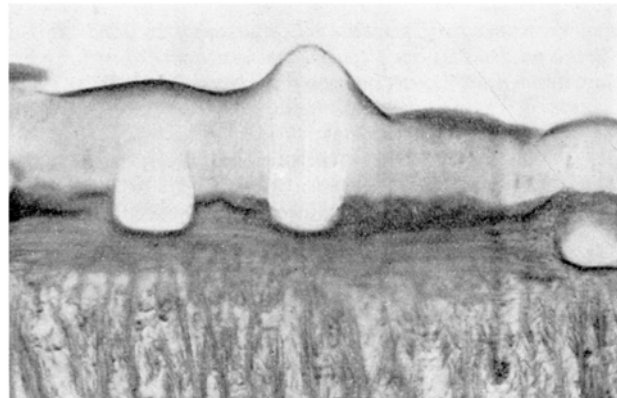


Fig. 2. Cuticle stained with PAS after 3 h treatment with amylase. 335 ×.

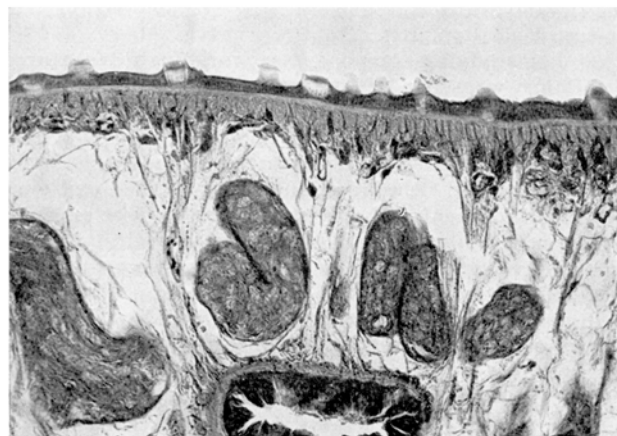


Fig. 3. Part of liver fluke stained with Sudan Black B. The cuticle is diffusely sudanophilic. 75 ×.

those described in amylase-treated sections were obtained in sections treated with lysozyme or hyaluronidase, though small irregular patches of PAS-positive material were seen in the cuticle, especially in the lysozyme-treated sections.

The granular PAS-positive material in the cuticle may be interpreted as glycogen. If the lysozyme and hyaluronidase used only act upon chitinaceous substances containing acetylhexosamin-glycosidic bonds⁴ and hyaluronic acid like substances, that could mean that the glycogen granules are associated with such components, split by the used enzymes making the glycogen water-soluble.

For the study of lipid components in the cuticle, flukes were fixed in 10% formaldehyde solution. Frozen sections were treated for 1 or 3 h at pH 5.5–6.0 and + 37°C with the lipid-splitting enzymes listed in the Table and subsequently stained with Sudan Black B or Sudan III. Sections without added enzymes were also stained.

The untreated sections showed a marked diffuseness of lipid but no droplets in the cuticle (Figure 3). After treatment with enzymes the cuticle partly lost its sudanophilia but the reaction was uneven. Among the enzymes used, phospholipase C showed the strongest effect. Fixation with Carnoy's fluid, which presumably would dissolve lipids present in the tissue, made the cuticle almost negative to Sudan dyes.

The findings suggest that the cuticle contains material of lipid nature. However, the interpretation is difficult as Sudan Black B is a weak base⁵ and Sudan III a weak acid⁵. Thus the Sudan dyes might in addition react with different acid or basic components in the cuticle

	Acti- vators ⁶	pH- optimum ⁶	Effect
<i>Protein-splitting enzymes</i>			
Trypsin, Worthington, 1 × cryst. 1961		≈7.0	—
Papain, Pharm.		4.0–8.1	+
Ficin, Worthington 1961		4.0–8.5	+
<i>Aspergillus oryzae</i> protease, cryst. (T. Astrup)		6.0–7.0	+
Pronase, Calif. Corp. Biochem. Res. 1961		≈7.0	+
<i>Carbohydrate-splitting enzymes</i>			
α-Amylase, saliva, purified ⁷	NaCl	4.5–7.0	—
α-Amylase, Zymola, DDS		4.5–5.5	—
Lysozyme, Worthington 1961		4.5–7.0	—
Hyaluronidase, Worthington 1961		4.5–7.0	—
<i>Lipid-splitting enzymes</i>			
Lipase, Worthington 1961	Ca ²⁺	6.0–7.6	—
Phospholipase C, Worthington 1961		5.1–5.9	—
Phospholipase D, Calif. Corp. Biochem. Res. 1961			—
<i>Enzyme mixture</i>			
<i>Helix pomatia</i> hepato-pancreas ⁸ homogenate (Chitinase amongst others)			—

⁴ M. R. J. SALTON, *Microbial Cell Walls* (J. Wiley & Sons, Inc., New York 1960), p. 59.
⁵ H. J. CONN, *Biological Stains* (Williams & Wilkins Co., Baltimore 1953), p. 86, 93.
⁶ P. D. BOYER, H. LARDY, and K. MYRBÄCK, *The Enzymes* (Academic Press, New York 1959–1961).
⁷ K. H. MEYER, E. H. FISCHER, A. STAUB, and P. BERNFELD, *Helv. chim. Acta* 31, 2158 (1948).
⁸ W. KÜENTHAL, *Leitfaden für das zoologische Praktikum* (G. Fischer Verlag, Stuttgart 1959), p. 161.

and not only give the staining effect through a solution mechanism.

In conclusion. The cuticle of *Fasciola hepatica* is proteinaceous in nature. It is provided with a rim containing mucopolysaccharides or mucoproteins. The cuticle contains glycogen and sudanophilic substances which might be of lipid nature.

Zusammenfassung. Die Cuticula von *Fasciola hepatica* ist von proteinähnlicher Natur und von einem Saum aus

Mucopolysacchariden oder Mucoproteiden umgeben. Sie enthält Glycogen und sudanophile, wohl lipidähnliche Substanzen.

N. BJÖRKMAN, W. THORSELL, and E. LIENERT

Department of Anatomy and Histology and Department of Chemistry, Veterinary College, Stockholm (Sweden), and Pharmakologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Wien (Austria), September 4, 1962.

Adénosine triphosphatase et pyrophosphatase des chloroplastes

Diverses recherches concernant l'activité de l'adénosine triphosphatase (ATPase)¹ des chloroplastes de feuilles vertes ont donné lieu jusqu'à présent à des conclusions contradictoires. Contrairement à AVRON et JAGENDORF^{2,3} et à ARNON⁴, WESSELS et BALTSCHIEFFSKY⁵ ont montré que les chloroplastes de feuilles d'épinards contenaient une ATPase et de plus une pyrophosphatase, chacun de ces deux enzymes étant caractérisé par un pH optimum différent et bien défini. Par ailleurs, FORTI⁶ a purifié à partir d'homogénats de feuilles d'épinards une phosphatase possédant une activité hydrolytique vis-à-vis à la fois de l'ATP et du pyrophosphate. La présente note confirme les résultats de WESSELS et BALTSCHIEFFSKY⁵ et apporte des arguments supplémentaires en faveur de la présence dans les chloroplastes de deux enzymes distincts hydrolysant respectivement l'ATP et le pyrophosphate.

Matériel et méthodes. Les chloroplastes de feuilles d'épinards sont préparés selon ARNON et al.⁷, lavés deux fois par une solution de NaCl 0,35 M et finalement mis en suspension dans une solution de NaCl 0,03 M. Le contenu en chlorophylle des chloroplastes est déterminé d'après la valeur de la densité optique à 652 mμ⁸. Sauf indication contraire, les milieux d'incubation sont constitués ainsi: ATP ou pyrophosphate 3 μmoles, MgCl₂ 1 μmole, Tris 20 μmoles, pH final 7,6. La réaction commence avec l'addition de la suspension de chloroplastes. Le volume total varie selon les expériences entre 400 μl et 600 μl. L'incubation se fait à l'obscurité et est arrêtée par addition de 100 μl d'acide trichloracétique à 30%. L'activité de l'ATPase et celle de la pyrophosphatase sont évaluées

d'après la quantité d'orthophosphate libéré à partir de l'ATP ou du pyrophosphate. Les techniques d'isolement et de dosage de l'orthophosphate sont analogues à celles décrites dans un article précédent⁹.

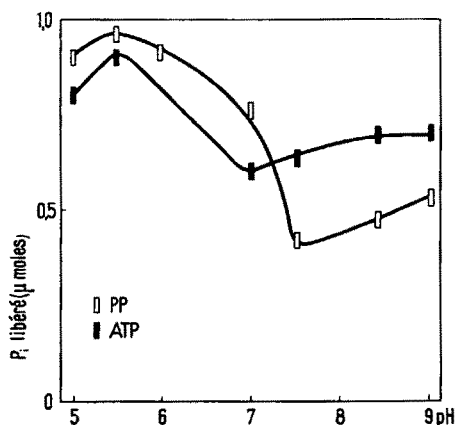
Résultats. Effet du pH: En présence d'ions Mg²⁺, le pyrophosphate est hydrolysé plus rapidement que l'ATP de pH 5 à pH 7 et moins rapidement de pH 7,5 à pH 9 (Figure). Ces résultats sont en accord avec ceux de WESSELS et BALTSCHIEFFSKY⁵.

Effet de la concentration en ions Mg²⁺: Lorsque l'ATP et le pyrophosphate sont utilisés à pH 7,6 et à des concentrations saturantes¹⁰, leur vitesse d'hydrolyse est dépendante de la concentration en ions Mg²⁺. Les données du Tableau I montrent que la vitesse d'hydrolyse de

Tab. I. Influence de la concentration en ions Mg²⁺ sur l'hydrolyse de l'ATP et du pyrophosphate par les chloroplastes

Exp.	Contenu en chlorophylle des chloroplastes mg	ATP ou PP μmoles	MgCl ₂ μmoles	P _i libéré à partir d'ATP μmole	P _i libéré à partir de pyrophosphate μmole
1	1,75	3	0	0,17	0,19
		3	0,5	0,45	0,35
		3	1,0	0,81	0,48
		3	1,3	0,55	0,47
		3	2,5	0,32	0,47
2	2,80	1,5	0,7	0,35	
		2,1	0,7	0,58	
		2,5	0,7	0,48	

Conditions: voir Matériel et méthodes. - Expérience 1: Volume total 600 μl, Incubation 18 min à 30°. Expérience 2: Volume total 500 μl, Incubation 15 min à 30°.



Conditions: voir Matériel et méthodes. - Contenu des chloroplastes en chlorophylle 3.6 μg. Volume total 550 μl. Incubation 18 min à 30°.

¹ *Abréviations:* Tris: Tri(hydroxyméthyl)aminométhane, FMN: Flavine mononucléotide, PMS: phénazine méthosulfate, PCMB: Para-chloromercuribenzoate de sodium, ATP: adénosine triphosphate de sodium, PP: pyrophosphate.

² M. AVRON et A. T. JAGENDORF, J. biol. Chem. **234**, 967 (1959).

³ M. AVRON, Biochim. biophys. Acta **40**, 257 (1960).

⁴ D. I. ARNON, Ann. Rev. Plant Physiol. **7**, 325 (1956).

⁵ J. S. C. WESSELS et H. BALTSCHIEFFSKY, Acta chem. scand. **14**, 233 (1960).

⁶ G. FORTI, Biochim. biophys. Acta **48**, 200 (1961).

⁷ D. I. ARNON, M. B. ALLEN et F. R. WHATLEY, Nature **174**, 394 (1954).

⁸ D. I. ARNON, Plant Physiol. **24**, 1 (1949).

⁹ P. V. VIGNAIS et P. M. VIGNAIS, Biochim. biophys. Acta **43**, 431 (1960).

¹⁰ A pH 7,6, la constante de Michaelis relative à l'ATP est de 1.1×10^{-3} M; celle relative au pyrophosphate est de 1.8×10^{-3} M.