

Binomial action of protein synthesis inhibitors – suppression of viral reproduction and of cell death – is characteristic for puromycine and thienylalanine, but not for ethionine. In the case of thienylalanine, these 2 processes are dissociated at a concentration of $4.7 \cdot 10^{-3} M$ (100% cell death without hemagglutinin formation). With puromycine they are partly dissociated at $1.9 \cdot 10^{-5} M$ to $2.3 \cdot 10^{-5} M$ (accumulation of hemagglutinin and partial protective effect).

The degree of binomial action of the inhibitors is correlated with their ability to suppress protein synthesis. Ethionine, a weak inhibitor, suppresses viral reproduction but does not prevent cell death. Thienylalanine, a moderate inhibitor, readily suppresses viral reproduction, and, in larger concentrations, suppresses cell death. Puromycine, a highly effective inhibitor, prevents cell death even at small concentrations which produce only partial suppression of viral reproduction. It may be inferred that the synthesis of the viral factor responsible for cell death is not sensitive to the action of ethionine, is moderately sensitive to thienylalanine and is highly sensitive to puromycine. The latter suppresses the synthesis of the factor

at a concentration which allows formation of considerable amounts of structural viral protein. These facts suggest that the factor, though of a protein nature, is not identical with structural viral protein. The results obtained with thienylalanine and puromycine allow us to assume a selective antiviral action of these inhibitors.

Выводы. L-этионин подавляет репродукцию вируса энцефаломиокардита, но не предотвращает гибели клеток под действием вируса. D, L-β-2-тиенилаланин кроме подавления вирусной репродукции способен частично защищать клетки от гибели (более, чем на 50%). Пурамицин, подавляя репродукцию вируса, одновременно защищает клетки от гибели. Репродукция вируса более чувствительна к действию ингибиторов синтеза белка, чем процесс гибели клеток под влиянием вирусной инфекции.

G. A. GALEGOV and N. V. KAVERIN

Ivanovski Institute of Virology, Academy of Medical Sciences, Moscow (USSR), August 17, 1966.

Die Veränderungen der Succinodehydrase-Aktivität in Detroit-6 (VA) Zellen, infolge der Infektion mit dem Hepatitis-infectiosa-Virus

In früheren Arbeiten¹⁻⁵ hat einer von uns die Ergebnisse der Isolierung einiger Hepatitis-infectiosa-Virus-Stämme, deren elektronenoptische und immunologische Eigenschaften, Züchtungsmethoden und zytopathogene Wirkung auf in vitro Kulturen von Detroit-6-(D.-6)-(VA) Zelllinien beschrieben. Eine besondere Eigenschaft dieser Zelllinie besteht darin, dass sie eine ausgeprägte SDH-Wirkung besitzt, welche aber ausfällt, wenn die Linie mit H.-infectiosa-Virus infiziert wird. Ausser der Notwendigkeit, dieses Phänomen zu erklären, stellt sich auch das Problem, die Veränderung der SDH-Wirkung zum Zweck der Frühdiagnose der Virusinfektion zu verwenden.

Die Versuche wurden mit D.-6-(VA)-Zellen in 20 Kulturserien auf Objektträger durchgeführt. Nach einer 2tägigen Entwicklung wurde die Hälfte der Kulturen mit 2 ml Virus-Suspension von 10^{-3} infiziert, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Die SDH-Aktivität wurde mit NTC (NBCo), nach RUTENBURG et al.⁶ nachgewiesen. Die ersten Beobachtungen, die 3-4 Tage nach der Infizierung gemacht wurden, haben erwiesen, dass die Virusinfektion auf die SDH-Aktivität eine starke hemmende Wirkung ausübt (Tabelle). Nach 3 Tagen blieb die Aktivität des Enzyms praktisch aus. Nur in zwei Fällen konnte man eine SDH-Aktivität beobachten (Versuch Nr. 13 und 16), was sich wahrscheinlich durch eine abgeschwächte Infektionsfähigkeit der in diesen Fällen angewandten Viren erklären lässt. Die beiden negativen Fälle in den Kontrollkulturen (Versuch Nr. 14 und 17), werden diesem toxischen Einfluss zugeschrieben, welcher wahrscheinlich mit der Qualität des Objektträgers zusammenhängt, da diese Zellen auch die Merkmale einer zytotoxischen Veränderung aufwiesen.

Da das Ausbleiben der SDH-Aktivität 3-4 Tage nach der Infizierung der Zellen keine Erklärung über die

Ursachen und den Mechanismus dieses Phänomens liefert, wurde eine neue Reihe von Versuchen durchgeführt, während denen man das Verhalten des Enzyms von 2 zu 2 h beobachtete. Auf diese Art wurden die ersten Anzeichen einer Verminderung der SDH-Aktivität erst nach 48 h

Versuch No.	Kontrollkulturen	Mit Hepatitis-infectiosa-Virus infizierte Kulturen
1	+++	+ (4)
2	++	- (3)
3	++	- (3)
4	++	- (4)
5	++	+ (4)
6	+++	- (4)
7	+++	- (3)
8	+++	- (3)
9	+++	- (3)
10	+++	- (3)
11	+++	- (3)
12	+++	- (3)
13	+++	+ (3)
14	--	- (3)
15	+++	- (3)
16	++	+++ (3)
17	--	- (4)
18	+++	+ (3)
19	++	- (4)
20	++	- (4)

+++ = Sehr ausgeprägte, in den Kulturen gleichmässig verteilte Aktivität; ++ = Ausgeprägte, in den Kulturen gleichmässig verteilte Aktivität; + = Verminderte Aktivität in kleinen und seltenen Herden; + = Einige isolierte aktive Zellen; - = Keine SDH-Aktivität. Die Zahlen in Klammern geben die Tage an, die seit der Virusinfektion vergangen sind.

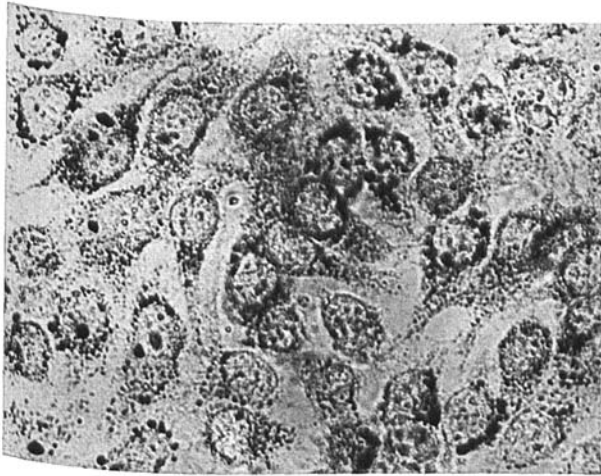


Fig. 1. Kontrollkultur mit sehr ausgeprägter SDH-Aktivität, $\times 700$.

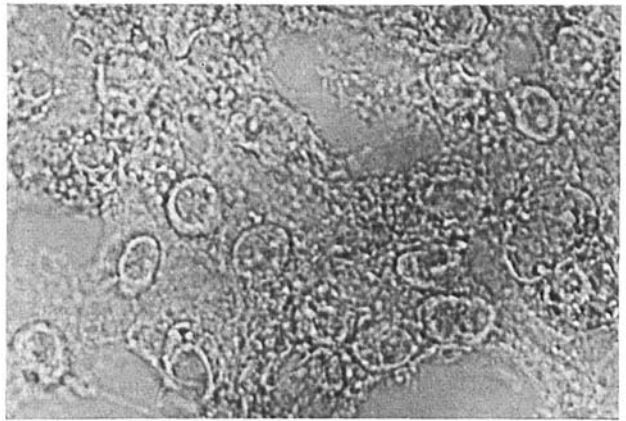


Fig. 2. Mit *Hepatitis-infectiosa*-Virus infizierte Kultur, die keine SDH-Aktivität aufweist, $\times 700$.

beobachtet, während sich die vollkommene Inhibition erst am Ende des 3. Tages nach der Infizierung zeigte.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass die Hemmung der SDH-Aktivität nicht in direktem Zusammenhang mit der Biosynthese des Virus steht. Andererseits haben die elektronenoptischen Untersuchungen erwiesen⁴, dass in den von Viren infizierten Zellen die Mitochondrien tiefgehende Veränderungen erleiden. Es ist also wahrscheinlich, dass die Enzyminaktivierung den Veränderungen im Mitochondrialapparat zuzuschreiben ist. Da die mikroskopischen zytopathogenen Effekte der Virusinfektion erst 6 Tage nach der Infizierung festgestellt werden können, ist es für die frühzeitige Erkennung der Virusinfektion von besonderem Interesse, das Verhalten der SDH-Aktivität zu untersuchen.

Summary. The inhibitory action of *Hepatitis infectiosa* virus on the SDH activity of Detroit-6 (VA) cell lines was investigated. The full inhibition of the SDH activity took place at the end of the third day after the infection. As this phenomenon precedes the cytopathogenetic effect

of viral infection, it may be of some help in the early detection of the infection.

F. WIENER, J. LÁSZLÓ
und K. SZÉKELY

*Institut für Biologie, Mikrobiologie und Virologie des
Medizinischen und Pharmazeutischen Instituts,
Tirgu-Mures (Rumänien), 2. August 1966.*

¹ J. LÁSZLÓ, M. PÉTER, GY. FILEP, A. ABRÁHÁM, E. BÁLINT, GY. PAÁL, L. DOMOKOS, L. KASZA und S. BEDÖ, *Rev. med.*, Tirgu-Mures 8, 47 (1962).

² J. LÁSZLÓ, M. PÉTER, GY. FILEP, A. ABRÁHÁM, E. BÁLINT, L. DOMOKOS, L. KASZA, GY. PAÁL und S. BEDÖ, *Vop. Virus* 2, 221 (1963).

³ J. LÁSZLÓ, M. PÉTER, GY. FILEP, E. BÁLINT, A. ABRÁHÁM, B. IZSÁK, ZS. ALMÁSI, M. SABAU und L. KASZA, *Rev. med.*, Tirgu-Mures 10, 280 (1964).

⁴ J. LÁSZLÓ, E. BÁLINT, V. FILEP, M. PÉTER, A. ABRÁHÁM und S. ALMÁSI, *Nature* 207, 326 (1965).

⁵ J. LÁSZLÓ, M. PÉTER, V. FILEP, E. BÁLINT und S. ALMÁSI, *Z. ges. inn. Med.* 21, 174 (1966).

⁶ A. M. RUTENBURG, M. WOLMAN und A. M. SELIGMAN, *J. Histochem. Cytochem.* 7, 66 (1953).

A Polypeptide Antibacterial Agent Isolated from *Trichoderma viride*

Antibiotic U-22324 was discovered in the culture broth of the fungus *Trichoderma viride*. Fermentations were conducted under submerged culture conditions in a medium containing black strap molasses, 20 g/l; dextrin, 30 g/l; fish meal, 15 g/l; Pharmamedia (Traders Oil Mill Co., Fort Worth, Texas), 15 g/l; and tap water to make 1 l. The final pH of this medium was adjusted to 6.8 prior to sterilization. Antibiotic titers were measured by a microbiological disc-plate assay similar to the one described by HANKA et al.¹, using *Sarcina lutea* as the test organism. The log dose-response curve was linear over a concentration range from 1–5 mg U-22324/ml. Peak titers were usually obtained after 4–5 days' incubation at 25°C and amounted to 8–10 mg/ml. This represents an unusually

high yield for a single peptide to be synthesized by a microorganism.

Antibiotic U-22324 was isolated from a 1600 ml aliquot of filtered fermentation broth by precipitation of the active material at pH 4.6. The precipitate was collected with the aid of 1% (w/v) of Celite and the filter cake extracted with 400 ml of acetone. An oil, recovered by removal of the acetone at 30°C, crystallized upon refrigeration. This crude material (2.7 g) was purified by dissolving it in a minimum amount of absolute ethanol at room temperature, treatment with 200 mg of charcoal (Darco G-60), concentration to 25 ml, and the slow addition of

¹ L. J. HANKA, D. J. MASON, and W. T. SOKOLSKI, *Antibiotics Chemother.* 11, 123 (1961).