

increase of 30S and 50S subunits as evidenced by sucrose density gradients and analytical ultracentrifugation studies. In the present experiments we have noted a significant decrease of activity in incorporation systems composed of ribosomes derived from cells ground with alumina and S-105 fractions from cells disrupted in the pressure cell. The possibility of ribosomal impairment by sharp abrasives was already stressed as a disadvantage of the otherwise simple and convenient method of bacterial cells disruption in a mortar⁸.

In our experiments these destructive influences were of limited extent, so that the effects were masked in homologous systems (taking into account standard deviations from replicate samples). These destructive effects, however, may be particularly important in detailed functional studies of enzyme systems at the subcellular level.

Zusammenfassung. Der Einfluss verschiedener Desintegrierungsmethoden von Tuberkelbazillen auf die biologische Aktivität von isolierten subzellulären Fraktionen wird beschrieben.

L. TRNKA⁹ and D. W. SMITH

Department of Medical Microbiology, University of Wisconsin, Madison (Wisconsin 53706, USA), 22 April 1968.

⁸ D. E. HUGHES and V. R. CUNNINGHAM, *Biochem. Soc. Symp.* 23, 8 (1963).

⁹ Present address: Tuberculosis Research Institute, Praha, Czechoslovakia.

Mangelnde Reaktivierung reduzierter RNase durch Zajdela-Hepatom-Ascites-Zellen

Unter geeigneten Bedingungen können aktive Enzyme in inaktive Proteine umgewandelt und anschliessend wieder in ihre ursprüngliche Form regeneriert werden. Es wurde gezeigt^{1,2}, dass nach Reduktion der Disulfid-Brücken und Auflösung der tertiären Struktur der RNase die Reoxydation unter Wiedererlangung der biologischen Aktivität möglich ist. VENETIANER und STRAUB³ wiesen in Tauben- und Hühnerpankreas und GOLDBERGER et al.⁴ in Rattenlebermikrosomen ein Enzym nach, das den Prozess dieser Reaktivierung beschleunigt. Ausser den Mikrosomen werden noch Faktoren aus dem Überstand benötigt, die keine Proteine sind.

Es erschien daher interessant zu untersuchen, ob die Reaktivierung auch bei Hepatomen möglich ist. Dabei wurde das Verhalten von Hepatom-Ascites-Zellen auf die Fähigkeit zur Umwandlung einer inaktiven ungeordneten RNase in eine aktive Form geprüft. Die zur Enzymreaktion verwendeten Zellfraktionen wurden nach GOLDBERGER et al.⁴ hergestellt (Modifikationen: Durchspülung der Lebern, Homogenisierung im Messer-Bühler-Homogenisator). Die RNase (Boehringer p.A.) wurde in Analogie zu ANFINSEN et al.² reduziert. Die RNase-Bestimmung erfolgte bei pH 5,0 nach SPAHR und HOLLINGWORTH⁵.

Die Zajdela-Hepatom-Zellen waren auf Mäuse transplantiert. Die Normalleber stammt von Sprague-Dawley-Ratten. Das Reaktionsgemisch bestand nach GOLDBERGER et al.⁴ aus reduzierter RNase 0,010 mg, in 0,05 M Tris Puffer pH 7,4 Mikrosomenfraktion 8,25 mg Proteingehalt und Überstand 23,6 mg Protein, gemessen nach LOWRY et al.⁶ im Gemisch. Endvolumen 5,5 ml, welches bei 37 °C 20 min inkubiert wurde. Es wurde jeweils gegen einen Leerwert reduzierter RNase in gleicher Konzentration, in Puffer gelöst, gemessen. Angegeben sind

Mittelwerte aus 3 Bestimmungen mit Maximalabweichung. Die in der Tabelle angegebenen Werte beziehen sich auf die Extinktionsdifferenz (bei 260 μ m) der RNase-Bestimmung vor und nach der Inkubation des Reaktivierungsgemisches.

Da das Hämoglobin eine reaktivierende Wirkung besitzt⁷, wurden die Lebern vor Entnahme über die Pfortader durchspült. In unseren Untersuchungen konnten wir die Reaktivierungsfähigkeit der Leber bestätigen. Dabei zeigten sich keine Geschlechts- und Stammesunterschiede. Durch Zajdela-Hepatom-Fraktionen liess sich nur eine geringfügige Reaktivierung reduzierter RNase nachweisen, gleichgültig, ob die Hepatomzellen auf Ratten oder Mäuse (über Hamster) transplantiert worden waren.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich hier um einen spezifischen Unterschied zwischen Normal- und Tumorzellen handelt, zumal bei frühem embryonalem Gewebe ebenfalls keine Aktivität gefunden wurde⁷. Möglicherweise ist ausser der RNase-Aktivierung auch die Aktivierung anderer Enzyme im Tumor beeinträchtigt.

Summary. Decreased reactivation of inactivated RNase by microsomes from a hepatoma as compared to normal liver was observed and is described in more detail. This hampered reactivation of enzymes in general might be responsible for other enzyme deletions in tumours.

HELGA SCHWARZKOPF

Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für experimentelle Pathologie, 69 Heidelberg 1 (Deutschland), 20. Mai 1968.

| Zajdela-Hepatom | | Normalleber | |
|-----------------|----------------------|----------------|----------------------|
| Experiment Nr. | Extinktionsdifferenz | Experiment Nr. | Extinktionsdifferenz |
| 1 | 0,069 ± 0,005 | 1 | 0,198 ± 0,003 |
| 2 | 0,006 ± 0 | 2 | 0,288 ± 0,010 |
| 3 | 0,019 ± 0,008 | 3 | 0,236 ± 0,002 |
| 4 | 0,031 ± 0,006 | 4 | 0,275 ± 0,007 |
| 5 | 0,055 ± 0,003 | 5 | 0,323 ± 0,005 |
| 6 | 0,062 ± 0,005 | 6 | 0,208 ± 0,011 |

¹ C. B. ANFINSEN und E. HABER, *J. biol. Chem.* 236, 1361 (1961).

² C. B. ANFINSEN, E. HABER, M. SELA und F. H. WHITE JR., *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 47, 1309 (1961).

³ P. VENETIANER und F. B. STRAUB, *Biochim. biophys. Acta* 67, 166 (1963).

⁴ R. F. GOLDBERGER, C. J. EPSTEIN und C. B. ANFINSEN, *J. biol. Chem.* 238, 628 (1963).

⁵ P. F. SPAHR und B. R. HOLLINGWORTH, *J. biol. Chem.* 236, 823 (1961).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

⁷ R. C. K. KURUP, T. S. RAMAN und T. RAMASARMA, *Biochim. biophys. Acta* 113, 255 (1966).