the haemagglutinin, in the form seen after ether treatment, does not represent a structure which is present as such in the virus particle before splitting, but a modification of a portion of the outer coat.

The G antigen, on the contrary, is almost certainly present in the form observed after ether splitting. The only question in doubt is the total length of G antigen in the particle, and whether it is in the form of several short pieces, or of one long piece which is disrupted by the ether treatment. The most significant outcome of these findings is that they confirm the prediction of SCHÄFER¹¹ (1957) that the G antigen would be found to correspond, as a structure, to the whole particle of the smaller RNA viruses. A typical small "spherical" virus (mouse encephalomyelitis (ME) virus) has been sprayed with some G antigen of KP virus, and the two together exemplify the two common forms of arrangement of subunits, i. e. the helical and the polyhedral, e. g. icosahedral or dodecahedral. It is the G antigen which contains the RNA, and which presumably alone

carries the genetic information of the particle, and which has protein subunits symmetrically arranged (a symmetry of form which is not seen in the intact particle).

As far as the von Magnus incomplete forms are concerned, it is clear that the similarity of KP to influenza extends also to the phenomenon of production of incomplete virus by passage of large inocula and that there are similarities between the incomplete forms of the two viruses (WATERSON and HORNE¹², 1961; ROTT and SCHÄFER⁹, 1960). The particles of virus N show much more variation in shape and size than do those of KP, although it is fair to point out that in some passages of KP virus almost as much variation may be found.

We are greatly indebted to Dr. G. F. MEYER and Dr. H. FRANK, of the Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, for assistance with the electron microscopy and to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support. One of us (A.P.W.) is in receipt of a grant from the Medical Research Council.

¹¹ W. SCHÄFER, in: The Nature of Viruses (Ed. A. E. W. WOLSTENHOLME and E. C. P. MILLAR), p. 100, London 1957.

¹² A. P. WATERSON and R. W. HORNE, 1961, to be published.

Reindarstellung und Charakterisierung des für die Lyse T2-infizierter Zellen verantwortlichen Enzyms

Von W. WEIDEL und W. KATZ

Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. WEIDEL, Tübingen
(Z. Naturforsch. **16 b**, 156—162 [1961]; eingegangen am 11. Januar 1961)

T2-infected cells of *E. coli* B synthesize an enzyme whose role it is eventually to lyse the cell from within, whereby the new crop of T2-phage is released from it. Procedures for isolating this enzyme in pure form are described. The enzyme is characterized as a lysozyme. It has a molecular weight of 15 200.

Die erste Beobachtung über ein anscheinend nur von phageninfizierten Zellen synthetisiertes, lytisches Enzym stammt von SERTIC¹. Er beschreibt einen „Lysinzone bildenden“ Phagen Fcz (Wirtsbakterium ist der mucoide *E. coli*-Stamm Fb) und führt die Erscheinung der Zonenbildung, d. h. das Auftreten eines Hofes rings um einen Phagen-Plaques, auf ein lytisches, im Agar diffundibles Agens zurück, das die infizierte Zelle zusammen mit den neugebildeten Phagenteilchen verläßt. Es kann von diesen abgetrennt werden.

Zu ähnlichen Resultaten kam GRATIA², der ebenfalls mit einem *E. coli*-Phagen-System arbeitete.

HUMPHRIES³ sowie PARK⁴, ADAMS und PARK⁵ beschreiben ein entsprechendes Enzym in Lysaten verschiedener Stämme von *Klebsiella pneumoniae*, die mit dem Phagen Kp infiziert waren. Dieses Enzym liegt dabei sowohl an das Phagenteilchen gebunden wie auch in freier Form vor.

Sämtliche bisher aufgeführten Bakterienstämme besitzen eine Polysaccharidkapsel; die Hofbildung ist auf ein Auflösen dieser Kapsel durch das betref-

¹ V. SERTIC, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **110**, 125 [1929].

² A. GRATIA, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales **126**, 418 [1937].

³ J. C. HUMPHRIES, J. Bacteriol. **56**, 683 [1948].

⁴ B. H. PARK, Virology **2**, 711 [1956].

KP virus, platinum-rhodium shadowed: (1) Intact particles, (2) G antigen, (3) Haemagglutinin.
 KP virus, negatively stained: (4) Intact particles, (5, 6, 7, 8) Haemagglutinin, (9) G antigen, (10) G antigen with ME virus.

KP virus, incomplete forms: (11) Intact particles, platinum-rhodium shadowed, (12) Haemagglutinin, platinum-rhodium shadowed, (13) Haemagglutinin, negatively stained, (14, 15, 16) intact particles, negatively stained. Virus N, platinum-rhodium shadowed: (17) Intact particles, (18) G antigen, (19) Haemagglutinin. Virus N, negatively stained: (20) Intact particles, (21) G antigen, (22) Haemagglutinin.

fende Enzym zurückzuführen. ADAMS und PARK⁵ bezeichnen das von ihnen untersuchte Agens generell als Polysaccharid-Depolymerase.

Das Phänomen einer Hofbildung beobachtete MURPHY⁶ auch bei *Bacillus megaterium* und dem infizierenden Phagen G. Das Enzym zerstört in diesem Fall die Zellwand des betreffenden Mikroorganismus. Derselbe Autor fand in weiteren Untersuchungen⁷, daß in diesem speziellen System wahrscheinlich zwei lytische Enzyme aufgebaut werden. Das eine ist an die Phagenteilchen gebunden, das andere ist frei. Beide Enzyme greifen zwar dasselbe Substrat, die Zellwand, an, doch unterscheiden sie sich in ihrem serologischen Verhalten und in ihrem Wirkungsoptimum.

Auch von gewissen Phagen der T-Serie und ihrem gemeinsamen Wirt *E. coli* B liegen solche Befunde vor. So fand BROWN⁸, daß chloroformgetötete *Coli*-Bakterien durch phagenfreie T6-Lysate lysiert werden.

KOCH und JORDAN⁹ (s. auch KOCH und DREYER¹⁰) wiesen in T2-Lysaten ein Enzym nach, das nicht an T2-Teilchen gebunden ist, *E. coli* B lysiert und isolierte *Coli* B-Zellwände angreift. Im Rahmen unserer Studien über das an T2-Teilchen gebundene, zellwandzerstörende Enzym¹¹⁻¹⁷ nahmen wir uns auch eine nähere Untersuchung dieses in T2-Lysaten in freier Form auftretenden Enzyms vor.

Seine Reindarstellung wird im folgenden beschrieben.

Material und Methoden

1. Herstellung von T2-Lysaten

T2-Lysate wurden nach dem von VIELMETTER und SCHUSTER¹⁸ angegebenen Verfahren gewonnen. In einer waagrecht liegenden, mit 180 U/min rotierenden 20-l-Flasche wurde *E. coli* B jeweils in 500 ml des dort beschriebenen Kulturmediums bei 37° auf $3 \cdot 10^9$ Zellen/ml angezüchtet und mit $1,6 \cdot 10^{10}$ T2/ml infiziert. Der pH-Wert der Kulturflüssigkeit war kurz vor der T2-Infektion mit 4-m. NaOH auf 7,3 eingestellt worden. Die infizierte Bakterienkultur wurde 15 Stdn. lang weiterrotiert.

Nach 6-stdg. Vorbehandlung mit einer Spur Desoxyribonuclease wurden die so erhaltenen Rohlysate, die eine Ausbeute von $4 \cdot 10^{11}$ bis $2 \cdot 10^{12}$ Phagen/ml liefern, zur Entfernung von Zelltrümmern für 20 min bei 4000 g zentrifugiert; im Anschluß daran wurden die Phagen durch 1-stdg. Zentrifugieren bei 15 000 g sedimentiert.

Der Überstand kann nach abschließendem Zentrifugieren für 45 min bei 105 000 g ohne weiteres auf freies T2-Enzym aufgearbeitet werden. Das vorgereinigte Lysat sollte mindestens 10 Einheiten Enzym/ml enthalten (Definition s. folgender Absatz).

2. Quantitative Bestimmung des Phagenenzym

Der quantitative Test für freies T2-Enzym stützt sich auf eine Beobachtung von BROWN⁸, wonach phagenfreie T6-Lysate chloroformgetötete *E. coli* B-Zellen zu lysieren vermögen.

Herstellung der Zellsuspension

300 ml synthetisches Glucosemedium (M9) werden mit 60 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* B in M9 angeimpft. Die Suspension wird bei 37° stark belüftet und das Bakterienwachstum durch Extinktionsmessung bei 650 m μ verfolgt. (Beckman Spektralphotometer DU). Die Inkubation wird abgebrochen bei einem Extinktionswert von 0,470 (1-cm-Küvette), was einer Bakteriendichte von $7 \cdot 10^8$ Zellen/ml entspricht, und der gesamte Ansatz für 15 min in freischwingenden Bechern bei 4200 g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien werden bei Zimmertemperatur in insgesamt 100 ml chloroformgesättigtem m/15 Phosphat-Puffer pH 7,0 resuspendiert, sofort im Anschluß daran wie zuvor zentrifugiert, einmal mit chloroformfreiem Phosphat-Puffer auf der Zentrifuge nachgewaschen und schließlich in einer geeigneten Menge Puffer aufgenommen (s. u.).

Ausführung des Tests

Nach Einstellen der Lichtmarke am Photometer „Eppendorf“ mit Hilfe des Trübungsstandards auf den Skalenwert 50 (Nephelometrie-Filter) wird die Suspension getöteter Bakterien mit soviel m/15 Phosphat-Puffer pH 7,0 verdünnt, daß sie, an Stelle des Trübungsstandards, einen Trübungswert von 100 Skalenteilen ergibt (2-cm-Küvette).

In einem Reagenzglas werden 4 ml der so eingestellten Bakteriensuspension mit 0,1 ml zu testender Enzymlösung gemischt und 4 min bei 37° inkubiert; nach Abbrechen der Inkubation wird die durch Lyse hervor-

⁵ M. H. ADAMS u. B. H. PARK, *Virology* **2**, 719 [1956].

⁶ J. S. MURPHY, *Virology* **4**, 563 [1957].

⁷ J. S. MURPHY, *Virology* **11**, 510 [1960].

⁸ A. BROWN, *J. Bacteriol.* **71**, 482 [1956].

⁹ G. KOCH u. E. JORDAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **25**, 437 [1957].

¹⁰ G. KOCH u. W. DREYER, *Virology* **6**, 291 [1958].

¹¹ W. WEIDEL, *Z. Naturforschg.* **6b**, 251 [1951].

¹² W. WEIDEL, *Z. Naturforschg.* **7b**, 145 [1952].

¹³ G. KOCH u. W. WEIDEL, *Z. Naturforschg.* **11b**, 345 [1956].

¹⁴ W. WEIDEL u. J. PRIMOSIGH, *Z. Naturforschg.* **12b**, 421 [1957].

¹⁵ W. WEIDEL u. J. PRIMOSIGH, *J. gen. Microbiol.* **18**, 513 [1958].

¹⁶ W. WEIDEL, H. FRANK u. H. H. MARTIN, *J. gen. Microbiol.* **22**, 158 [1960].

¹⁷ J. PRIMOSIGH, H. PELZER, D. MAASS u. W. WEIDEL, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **46**, 68 [1961].

¹⁸ W. VIELMETTER u. H. SCHUSTER, *Z. Naturforschg.* **15b**, 304 [1960].

gerufene Trübungsabnahme sofort im Photometer „Eppendorf“ gemessen (2-cm-Küvette).

Es zeigt sich, daß eine nicht mit T2-Enzym versetzte Kontrollsuspension nach 4 min bei 37° eine Trübungsabnahme von 100 auf 90 Skalenteile erfährt und daß andererseits, auch mit äußerst hohen Enzymkonzentrationen, nie ein Trübungswert von 47 Skalenteilen unterschritten wird. Innerhalb dieser Grenzen ist die prozentuale Trübungsabnahme bei konstanter Inkubationszeit proportional zur Enzymkonzentration (Abb. 1). Es erschien zweckmäßig, als Maßeinheit (1 E) diejenige Enzymmenge festzulegen, die nach genau 4 min Inkubation bei 37° den erreichbaren Trübungsminimalwert von 47 Skalenteilen ergibt. Unter diesen Umständen darf bei Enzymtitrationen die im Test eingesetzte Enzymmenge 1 E natürlich niemals ganz erreichen oder gar überschreiten.

Abb. 1. Lyse chloroformgetöteter *Coli*-Zellen durch T2-Enzym unter Standardbedingungen (s. Text). Die Gerade gibt die zu erwartende Abhängigkeit des erreichten Lysegrades von der eingesetzten Enzymmenge wieder. Die eingetragenen Punkte wurden mit verschiedenen Volumina einer Enzymlösung gemessen, die genau 10 E/ml enthielt.

Die für den Test benötigte Bakteriensuspension muß stets frisch sein. Leider verlieren die chloroformgetöteten Zellen sehr schnell, auch in der Kälte, die Fähigkeit zur Lyse, was auch durch Schütteln an der Luft nicht wieder vollständig rückgängig zu machen ist¹⁹. Ferner ist stets darauf zu achten, daß die Bakterien das richtige physiologische Alter haben, d. h. die Kultur ist bei Erreichen der angegebenen Zelldichte zu stoppen.

Unter Einhaltung dieser Bedingungen hat man jedoch ein sehr zuverlässiges Verfahren in Händen; die erhaltenen Werte waren stets reproduzierbar.

Lysozym: Sigma Chem. Comp., St. Louis (Mo.).

***Micrococcus lysodeikticus*:** Der Organismus wurde uns, ohne nähere Bezeichnung, von den Behring-Werken, Marburg/Lahn, freundlichst zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken möchten.

Ergebnisse

1. Konzentrierung des Enzyms

Das gelbbraun gefärbte, wie beschrieben durch hochtouriges Zentrifugieren vorgereinigte Rohlysats

wird im Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 25 bis 30° auf etwa 1/10 seines Volumens eingengt.

Verluste an Enzymaktivität treten hierbei praktisch nicht in Erscheinung.

Das jetzt tief dunkelbraune, viskose Konzentrat wird 36 Stdn. bei 2° gegen *m*/50 Phosphat-Puffer *p*_H 7,0 dialysiert, wobei Schlauchmaterial der Visking Company, Chicago, verwendet werden sollte. Mit anderen Dialysierschlauch-Fabrikaten erlebten wir, offenbar durch irreversible Adsorption von Enzym an das Schlauchmaterial, hohe Verluste an Enzymaktivität. Auf die Dialyse erfolgt ein nochmaliges Einengen der Innenflüssigkeit im Rotationsverdampfer auf das ursprüngliche Konzentratvolumen.

2. Reinigung des Enzyms

Das dialysierte Konzentrat wird in der Kälte (2°) unter fortwährendem Rühren tropfenweise mit 1-*n*. HCl versetzt. Bei *p*_H 4,3 bricht man die Säurezugabe ab und läßt die Mischung, am besten über Nacht, bei 2° stehen. Es hat sich dann ein schleimig-flockiger Niederschlag gebildet, der hochtourig abzentrifugiert wird (60 min bei 54 500 g).

Der Überstand enthält noch die volle Enzymaktivität. Wird die Ausfällung bei *p*_H 4,2 vorgenommen, so werden zwar inaktive Begleitproteine vollständiger niedergeschlagen, doch reißen sie dann schon etwas, bei *p*_H 4,1 bzw. 4,0 sogar sehr viel Enzym mit.

Der saure Überstand wird wiederum 36 Stdn. in der Kälte gegen *m*/50-Phosphat-Puffer *p*_H 7,0 dialysiert und die Innenflüssigkeit alsdann lyophilisiert.

Zum Trockenrückstand gibt man soviel *m*/50-Phosphat-Puffer *p*_H 7,0, daß alles eben glatt gelöst ist. Diese Lösung wird nun ein letztes Mal für 48 Stdn., und zwar jetzt gegen *m*/15-Phosphat-Puffer *p*_H 6,0 dialysiert. Auch bei noch länger ausgedehnter Dialyse verliert die Innenflüssigkeit ihre gelbe Farbe nicht ganz. Im Anschluß daran zentrifugiert man sie für 60 min bei 105 000 g.

Der quantitative Test zeigt, daß dieses bereits erheblich gereinigte Enzymkonzentrat noch 90% der Aktivität des eingesetzten Rohlysats enthält.

3. Isolierung des Enzyms

Zur Reindarstellung des Enzyms wurde die Säulenchromatographie herangezogen. Cellulose in

¹⁹ R. REPASKE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **22**, 189 [1956].

irgendeiner Form erwies sich als ungeeignetes Adsorbens. Aktives Enzym war nicht mehr davon zu eluieren. In diesem Zusammenhang sei auf unsere Erfahrungen mit gewissen Fabrikaten von (Cellulose-)Dialysierschläuchen hingewiesen (s. o.).

Gute Resultate dagegen lieferte die Anwendung von Kationenaustauschern. Als besonders geeignet befunden wurde das schwach saure Carboxylharz Amberlite CG 50, 100–200 mesh (Rohm & Haas Corp., Philadelphia).

Zur Füllung der Säule benutzt man die durch Schlämmen gewonnenen gröberen Partikel dieses Materials.

Günstige Säulendimensionen: 6,2·0,6 cm für etwa 5 ml gereinigte Enzymlösung, enthaltend zwischen 500 und 3000 Einheiten. Die Vorbehandlung der Säule erfolgt durch Waschen mit dest. Wasser, anschließend mit $n/10$ -HCl und wiederum mit Wasser. Durch Behandeln mit $n/10$ -NaOH wird das Harz in das Natrium-Salz überführt; nach nochmaligem Waschen mit Wasser wird die Säule mit $m/15$ -Phosphat-Puffer p_H 6,0 equilibriert. An eine so vorbereitete Säule wird das Enzym, gelöst im gleichen Puffer, fest gebunden. Oberhalb p_H 6,5 findet keine Adsorption mehr statt.

Adsorbiertes Enzym läßt sich durch $m/2$ -Phosphat-Puffer p_H 7,1 glatt wieder eluieren. Eine befriedigende Abtrennung von inaktiven Begleitstoffen wird jedoch erst bei Anwendung eines Konzentrations- und p_H -Gradienten erzielt. Man erzeugt ihn durch Verwendung von 1- m . Phosphat-Puffer p_H 7,1 im Vorratsgefäß (50 ml) und $m/15$ -Phosphat-Puffer p_H 6,0 im Mischgefäß (50 ml).

Die Durchlaufgeschwindigkeit soll nicht größer als 3 Tropfen/min sein.

Abb. 2 zeigt das Ergebnis einer Chromatographie von 5 ml durch Säurefällung bei p_H 4,3 gereinigten Enzymkonzentrats, enthaltend 100 E/ml. Eluiert wurde in Fraktionen zu je 0,8 ml unter Verwendung des oben angegebenen Puffer-Gradienten.

Die Bestimmung von Gesamtprotein in den Eluatfraktionen erfolgte mit Folin-Ciocalteu-Reagens nach der von LOWRY und Mitarbb.²⁰ angegebenen Vorschrift (von uns leicht modifiziert): 0,3 ml jeder Eluatfraktion werden mit 1 ml Cu-Tartrat-Lösung („Lösung C“) versetzt, gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Vor Zugabe von 0,1 ml Folin-Reagens, was unter starkem Schüt-

Abb. 2. Chromatographie von T2-Enzym an Amberlite CG 50, (100–200 mesh). — — Enzymaktivität. — Extinktion bei 750 $m\mu$ nach Umsetzen mit Folin-Ciocalteu-Reagens. Wiedergewonnene Enzymaktivität: 90% (weitere Angaben: s. Text).

teln vor sich gehen muß, stehen die Proben 2 min bei 70° im Wasserbad, da auf diese Weise das Auftreten eines Niederschlags, der sich beim Einpipetieren des Folin-Reagens sonst leicht bildet, umgangen werden kann. Die Reaktionsmischung läßt man dann noch für 30 min bei Raumtemperatur stehen, verdünnt mit 1,4 ml Wasser und bestimmt die Extinktion bei 750 $m\mu$.

Bei Routine-Aufarbeitungen wurde der beschriebene Enzym-Reinigungsschritt an Amberlite-Harz in fünffach vergrößertem Maßstab durchgeführt. Chromatographiert wurden also jeweils 25 ml des gereinigten Enzymkonzentrats mit ca. 300 E/ml; Säulendimensionen: 11,2·1,0 cm; Eluat aufgefangen in 4-ml-Fractionen.

Zwecks weiterer Konzentrierung des eluierten Enzyms werden sämtliche aktiven Eluatfraktionen gepoolt, 36 Stdn. bei 2° gegen $m/50$ -Phosphat-Puffer p_H 7,0 dialysiert, eingefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wird mit wenigen ml $m/50$ -Phosphat-Puffer p_H 7,0 eben in Lösung gebracht und das Konzentrat erneut 48 Stdn. lang in der Kälte gegen $m/15$ -Phosphat-Puffer p_H 7,0 dialysiert. Das so erhaltene Präparat zentrifugiert man zur Entfernung eingeschleppter Verunreinigungen (Abrieb vom Austauschharz bzw. Dialysierschlauch) 30 min lang bei 105 000 g .

Diese hochgereinigte Enzymlösung enthält jetzt pro Enzymeinheit 0,32 μg Stickstoff (Kjeldahl).

Eine Probesedimentation mit diesem Präparat (800 E = 256 μg N/ml) in der analytischen Ultrazentrifuge (Spinco, Modell E) ergab im Sedimenta-

²⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

tionsdiagramm einen einzelnen, noch etwas asymmetrischen Gipfel. Durch Wiederholung der Austauschchromatographie ließ sich dieser Mangel beseitigen, das Enzym also in anscheinend völlig reiner Form gewinnen.

3 ml Enzymlösung der oben angegebenen Konzentration und Reinheitsstufe wurden 48 Stdn. gegen *m*/15 Phosphat-Puffer p_H 6,0 dialysiert (2°) und anschließend, wie beschrieben, chromatographiert, jedoch unter Verzicht auf Gradientenelution.

Nach Aufziehen der Enzymlösung auf eine Säule von $8,0 \cdot 0,6$ cm wurde mit 15 ml *m*/15-Phosphat-Puffer p_H 6,0 nachgewaschen und mit etwa 12 bis 15 ml 0,33-*m*. Phosphat-Puffer p_H 7,1 eluiert.

Die Ausbeute an wiedergewonnener Enzymaktivität betrug 80 Prozent. Das wiederum in *m*/15-Phosphat-Puffer überführte Enzym wurde daraufhin erneut einer Reinheitsprüfung unterzogen. In der analytischen Ultrazentrifuge lieferte es jetzt ($0,29 \mu\text{g N/E}$; $1400 \text{ E} = 406 \mu\text{g N/ml}$) einen symmetrischen Gipfel mit einem Sedimentationskoeffizienten $S_{20} = 1,76 \cdot 10^{-13}$ Sekunde.

4. Eigenschaften des T2-Enzyms

a) Allgemeines

T2-Enzym ist ein relativ niedermolekulares Protein vom Mol.-Gew. $15\,200 \pm 10\%$, jedoch nicht dialysabel, entgegen einer Behauptung von KOCH und JORDAN⁹.

Es verliert seine Aktivität zum größten Teil bei Überführung in ein ionenfreies Milieu. Redchromatographiertes Enzym (500 E/ml) in *m*/15-Phosphat-Puffer p_H 7,0 enthielt nach 72-stdg. Dialyse gegen dest. Wasser bei 2° nur noch 10% seiner ursprünglichen Aktivität. Bei erneuter Dialyse dieses stark inaktivierten Präparates (72 Stdn. bei 2°) gegen *m*/15-Phosphat-Puffer p_H 7,0 stellte sich jedoch die volle Ursprungsaktivität wieder ein.

Man kann das Enzym, ohne es zu schädigen, in physiologischer Kochsalzlösung, *m*/20-Ammoniumacetat oder *m*/50 bis 1-*m*. Phosphat-Puffer gelöst aufheben. Es ist also in bezug auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung des umgebenden Ionenmilieus nicht besonders anspruchsvoll. Zusätze wie Rohrzucker, Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Trishydroxymethylaminomethan (Tris) sind ebenfalls harmlos.

Von größerem Einfluß dagegen ist die Wasserstoffionenkonzentration. Während sich das Enzym gegenüber einem niedrigen p_H -Wert als ausgespro-

chen stabil erweist, macht sich bei $p_H > 8$ eine erhebliche Instabilität bemerkbar. Um sein Verhalten unter extremen Bedingungen zu demonstrieren, sei folgender Versuch hier angeführt: Zwei Proben desselben Enzympräparates wurden auf p_H 1,2 bzw. 12,8 gebracht und 60 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Rückneutralisation auf p_H 7,0 war die Aktivität der „sauren“ Probe noch unverändert, die der „alkalischen“ dagegen zu über 50% zerstört.

Vollkommene Zerstörung des Enzyms wird auch durch Trypsinbehandlung erzielt. T2-Enzym (80 E/ml), mit $100 \mu\text{g/ml}$ krist. Trypsin in *m*/15-Phosphat-Puffer bei p_H 7,8 und 37° inkubiert, besaß nach einer Stde. Inkubationszeit noch die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität, nach 2 Stdn. noch 10%, nach $3\frac{1}{2}$ Stdn. war keine Aktivität mehr nachweisbar. Eine Kontroll-Lösung desselben Enzympräparates, beim gleichen p_H -Wert, jedoch ohne Trypsin-Zusatz, inkubiert, besaß nach $3\frac{1}{2}$ Stdn. noch eine Aktivität von 70 E/ml (alkalisches Milieu, s. o.).

Das Wirkungsoptimum des T2-Enzyms liegt zwischen p_H 6 und 7. In diesem Bereich sind keine Unterschiede in der Lyserate chloroformgetöteter Bakterien festzustellen.

Wird der quantitative Test bei p_H 5,7 durchgeführt, sinkt die Lyserate auf ca. 80%, bei p_H 5,5 auf 40% und bei p_H 5,2 auf 10–20% ab, während sich bei p_H 7,5 und 8,0 Werte von 60% bzw. 20% ergeben.

Durch zweimalige Chromatographie gereinigtes Enzym läßt sich durch Ammonsulfat ohne größeren Aktivitätsverlust umfällen. Aus 2 ml einer derart gereinigten Enzymlösung (500 E/ml) in *m*/15-Phosphat-Puffer p_H 7,0 ließ sich das Enzym bei -2° durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bei 80% Sättigung präzipitieren. Der Ansatz blieb über Nacht bei $+2^\circ$ stehen und wurde anschließend für 30 min bei 5000 *g* zentrifugiert. Das in 2 ml *m*/15-Phosphat-Puffer p_H 7,0 wieder aufgelöste Sediment ergab im Test ca. 80% der Ausgangsaktivität.

Ammonsulfat-Fällung von nicht-chromatographiertem Enzym, das durch Säurefällung gereinigt wurde, zieht hohe Aktivitätsverluste (80%) nach sich.

b) Klassifizierung

In einer anderen Arbeit konnte das an T2-Teilchen gebundene, lytische Enzym, entsprechend seiner

Substratspezifität, als ein „Lysozym“ charakterisiert werden¹⁷. Aus verschiedenen Gründen liegt es nahe zu vermuten, daß das hier beschriebene, in T2-Lysaten *frei* vorkommende Enzym ebenfalls ein Lysozym ist und zumindest in dieser Hinsicht mit dem gebundenen T2-Enzym vollkommen übereinstimmt²¹. Eine entsprechende Vermutung äußerten auch KOCH und DREYER¹⁰.

Lysozym setzt aus Zellwänden von *E. coli* B eine komplexe Mischung von chemisch eng verwandten Spaltprodukten frei, die sich papierchromatogra-

phisch trennen lassen und so ein sehr charakteristisches „Spektrum“ liefern¹⁷.

Abb. 3 zeigt, daß das *freie* T2-Enzym aus *E. coli* B-Zellwänden dieselbe Serie von Spaltstücken herausholt wie Lysozym. Damit bestätigen sich früher geäußerte Vermutungen: es ist ebenfalls ein Lysozym.

Weitere, zweifellos größere Parallelen zwischen der Wirkungsweise beider Enzyme kann man auch in Folgendem sehen: Lysozym lysiert chloroform-getötete *Coli*-Zellen in *m/15*-Phosphat-Puffer p_H 7,0, und andererseits lysiert freies T2-Enzym das klassische „Substrat“ für Lysozyme, d. h. Zellen von *Micrococcus lysodeikticus*.

Der erstere Befund erlaubt einen Aktivitätsvergleich zwischen beiden Enzymen. Eine Lösung von freiem T2-Enzym mit einem Stickstoffgehalt von $0,29 \mu\text{g N/E}$ hat in unserem quantitativen Test dieselbe Aktivität wie eine Lysozym-Lösung mit einem Stickstoffgehalt von $0,35 \mu\text{g N/E}$. Damit läßt sich sicher sagen, daß beide Enzyme etwa die gleiche spezifische Aktivität (Aktivität/mg Protein) haben.

Nach KOCH und JORDAN⁹ sowie KOCH und DREYER¹⁰ soll das freie T2-Enzym übrigens auch intakte *E. coli* B-Zellen ohne weiteres zu lysieren vermögen. Dieser Befund konnte nicht bestätigt werden. Suspensionen gewaschener Bakterien in *m/15* Phosphat-Puffer p_H 7,0 oder in physiologischer Kochsalzlösung zeigten nach Inkubation bei 37° mit T2-Enzym bis zu Konzentrationen von 500 E/ml niemals eine Abnahme ihrer optischen Dichte. Zur Lyse lebender *E. coli* B-Zellen bedarf es, wie bei Lysozym¹⁹, der Anwendung von Adjuvantien im Medium: Tris-Puffer, p_H 8 und EDTA. Dann sind gleiche Gewichtsmengen Lysozym oder T2-Enzym gleich wirksam.

Micrococcus lysodeikticus dagegen wird ohne Adjuvantien, d. h. in *m/15*-Phosphat-Puffer p_H 7,0, durch T2-Enzym mit derselben Geschwindigkeit

Abb. 3. Parallelschichtchromatogramm enzymatisch abgespaltener Komponenten aus *E. coli* B-Zellwänden nach 24 Stdn. Inkubation (37°) mit $250 \mu\text{g}$ Lysozym (L) bzw. $250 \mu\text{g}$ freiem T2-Enzym/ml Inkubationsansatz (P). (Weitere Versuchsbedingungen: s. l. c.¹⁷).

Inkub.-Dauer [min]	T2-Enzym	Lysozym	Puffer
0	0,350	0,350	0,350
30	0,285	0,275	0,350
90	0,195	0,180	0,345
180	0,180	0,165	0,345

Tab. 1. Abnahme der optischen Dichte (bei $650 \text{ m}\mu$) einer Suspension von *M. lysodeikticus* während der Inkubation (37°) mit T2-Enzym bzw. Lysozym (je $50 \mu\text{g/ml}$ Phosphat-Puffer p_H 7,0).

²¹ W. WEIDEL, Annu. Rev. Microbiol. 12, 27 [1958].

lysiert wie durch Lysozym in entsprechender Konzentration (Tab. 1).

Diskussion

Die Reindarstellung des von T₂-infizierten *E. coli* B-Zellen in beträchtlicher Menge synthetisierten, lytischen Enzyms erweist sich als technisch relativ einfach, so daß das Sammeln genügender Mengen *freien* Enzyms für weitere Untersuchungen kein Problem ist.

In bezug auf die Ergiebigkeit des Ausgangsmaterials gestaltet sich die Lage erheblich ungünstiger bei der Gewinnung des entsprechenden, an T₂-Teilchen *gebundenen* Enzyms. Dessen Präparierung verläuft zwar im wesentlichen nach dem hier beschriebenen Verfahren, das tatsächlich zunächst hierfür ausgearbeitet wurde, und auch seine Freisetzung aus T₂-Teilchen ist nicht schwierig^{14, 15}, aber die erzielten Ausbeuten reichten noch nicht aus, um einen wirklich detaillierten Vergleich mit dem freien Enzym zu erlauben.

Wir konnten zwar zeigen, daß beide Enzyme das gleiche Substrat, eine bestimmte Schicht der *Coli*-Zellwand¹⁶, hydrolytisch angreifen und es in die gleichen Bestandteile zerlegen¹⁷, daß sie in dieser Beziehung wiederum mit Lysozym aus Eiklar übereinstimmen und somit ebenfalls als Lysozyme zu bezeichnen sind. Auch die besondere Rolle, die jedes von ihnen bei der Inangangsetzung bzw. Beendigung eines Vermehrungszyklus des T₂-Phagen zu spielen

hat, wurde verständlich gemacht²¹. Ein noch eingehenderer, insbesondere struktureller Vergleich wäre aber erwünscht, um weitere, sehr interessante Fragen beantworten zu können.

Um nur eine davon herauszugreifen: man wüßte gern, ob das in T₂-Teilchen *eingebaute*, lytische Enzym einem großen, intrazellulären Pool von Enzym entnommen wird, dessen unverbrauchter Überschuß die Lyse der Zelle besorgt und dann als freies Enzym im Lysat erscheint, oder ob das teilchengebundene Enzym vielleicht keineswegs aus einem solchen Pool geschöpft, sondern nur *in situ* synthetisiert werden kann, d. h. an Ort und Stelle dort, wo jedes T₂-Teilchen für sich den sogenannten Reifungsprozeß durchläuft. Dies wäre zwar nicht sehr ökonomisch, weil dann tatsächlich zwei unabhängige Synthesemechanismen von der infizierten Zelle aufgebaut werden müßten — einer für freies und einer für gebundenes Enzym —, obwohl im Grunde nur *ein* Enzym gebraucht wird, soweit das anzugreifende Substrat in Betracht steht. Womöglich ist aber nur dieser unökonomische Weg gangbar, und dann müßte man erwarten, daß die beiden Enzyme zwar funktionell, aber nicht strukturell übereinstimmen. Die schon erwähnten Befunde von MURPHY⁶ an einem anderen System scheinen uns in diesem Sinne zu deuten.

Herrn Dr. K. WAGNER sind wir für die Durchführung und Auswertung der Ultrazentrifugation, Frl. K. VOLL für ihre zuverlässige Hilfe bei der Herstellung von T₂-Lysaten zu großem Dank verpflichtet.

Über die Geschwindigkeit der Protein-Synthese in kernlosen und kernhaltigen Zellen von *Acetabularia**

Von H. CLAUSS und G. WERZ

Aus dem Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven (Abt. HÄMMERLING)

(Z. Naturforsch. 16 b, 162—165 [1961]; eingegangen am 23. Dezember 1960)

Comparing nucleate and enucleated cells of *Acetabularia mediterranea* and *A. crenulata*, the question was reexamined whether or not there is a temporary stimulation of protein synthesis in enucleated cells as reported by BRACHET and coworkers. The data presented here clearly show that there is no higher protein synthesis in enucleated cells than in nucleate ones: The rate of protein formation of enucleated cells is at most equal to that of nucleate cells during the first time following enucleation. It is concluded, that there is no inhibitory effect of the nucleus on protein synthesis.

Aus ihren Proteinbestimmungen an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen von *Acetabularia mediterranea* schlossen BRACHET und Mitarbb.¹ (Abb. 9),

daß bei kernlosen Zellteilen innerhalb der ersten 18 Tage nach ihrer Herstellung eine stärkere Proteinvermehrung erfolge als bei kernhaltigen, der

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

¹ J. BRACHET, H. CHANTRENNE u. F. VANDERHAEGHE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 18, 544 [1955], Abb. 9.