

with 5% glucose and Ninol only. The phagocytic rate was measured by the intravascular clearance rate of colloidal carbon 48 h after injection of the emulsion as described by Biozzi et al.⁴. The average time required for 50% of the carbon to disappear from the circulation of the control group was used as 100%. The half time for the test groups is calculated as per cent of the control value; thus, test groups with half times below 80% of the control possess a significantly enhanced activity of the RES.

Immune response. Adult male CF-1 mice weighing 20 g were injected via the tail vein with coenzyme Q₁₀ emulsion prepared as described above and 48 h later injected again i.v. with 7×10^5 sheep red blood cells (SRBC) washed 3 times. The control animals were injected with 5% glucose and Ninol. The mice were bled from the retro-orbital venous plexus with heparinized glass capillary tubes 4, 6 and 8 days after the injection of the SRBC. Hemolytic antibody production was determined on the pooled sera from 20 mice using the 50% end point method⁵. Eight serum dilutions were used. The determination of best fitting regression line between probit % hemolysis and the log of the serum dilution was determined by computer analysis. The antibody titer in the test groups is calculated as % of the control group. In Table II the maximum and minimum allowable

values based on a least squares fitting of the data points are given in parentheses.

The emulsions were tested in rabbits (single dose 5 mg/kg) for the presence of pyrogens in order to preclude contamination with bacterial endotoxin. The US Pharmacopeia recommended criteria were used for evaluation. They were tested also for induction of proliferative response of the RES determined by weighing the livers and the spleens of mice, sacrificed 3 and 10 days after injection of coenzyme Q₆ or Q₁₀ emulsion (single dose 100 and 400 µg/mouse), as described by WOOLLES et al.⁶.

Results. The results demonstrate that coenzymes Q₆ and Q₁₀ emulsions showed no pyrogenic effect. It may be concluded that they are free of contamination by significant amounts of bacterial endotoxin. Further, they produce no significant hyperplastic effect on the RES.

Table I shows that 48 h after an i.v. injection of coenzyme Q₆ or Q₁₀ emulsion, the phagocytic activity in rats is highly enhanced at doses as low as 750 µg per rat.

Table II shows that 48 h i.v. pretreatment with coenzyme Q₁₀ emulsion produces a two-fold increase of the primary hemolytic antibody titer at doses as low as 150 µg per mouse.

This is the first report of RES stimulation by any member of the coenzyme Q group. Their effect on other RES parameters is now under investigation⁷.

Zusammenfassung. Mittels der Tusche-Clearance-Methode wird gezeigt, dass Coenzym Q₆ und Q₁₀ die phagozytische Aktivität bei Ratten steigert. Im Vergleich mit Schaferthozyten wurde bei Mäusen durch Zufuhr von Coenzym Q₁₀ eine Verdoppelung der primären hämolytischen Antikörperbildung festgestellt.

E. BLIZNAKOV⁸, A. CASEY
and E. PREMUSZIC

New England Institute,

Ridgefield (Connecticut 06877, USA), 17 February 1970.

Table I. Effect of coenzymes Q₆ and Q₁₀ on the rate of colloidal carbon blood clearance in rats

Coenzyme Q ₆		Coenzyme Q ₁₀	
µg/rat	% of control	µg/rat	% of control
750	60.6	500	72.7
1125	66.8	750	64.7
1500	62.8	1000	63.8

Table II. Primary hemolytic antibody titer in mice pretreated with coenzyme Q₁₀ emulsion

Coenzyme Q ₁₀ (µg/mouse)	No. of mice	Hemolytic units % of control on day after SRBC		
		4	6	8
150	20	244 (228–262)	190 (184–197)	171 (165–177)
300	20	247 (231–262)	155 (154–157)	168 (162–175)
450	20	233 (220–249)	134 (133–135)	131 (126–136)

Die Solubilisierung der Gehirneuraminidase durch proteolytische Enzyme

Die Neuraminidase (N-Acetylneuraminyl-Hydrolase E.C.3.2.1.18) des Gehirns ist vorwiegend membrangebunden und in der Lysosomen-Mitochondrienfraktion angeordnet¹. Sie kann auf verschiedene Weise aus dem Hirnhomogenat und, mit höherer Ausbeute, aus der isolierten Lysosomen-Mitochondrienfraktion freigesetzt werden. TETTAMANTI und ZAMBOTTI² solubilisierten und extrahierten die Neuraminidase des Schweinegehirns mit isotonischer KCl-Lösung. LEIBOVITZ und GATT³ fanden

im Kalbsgehirn die höchste Aktivität des Enzyms im Überstand der $50\,000 \times g$ Zentrifugation nach Extraktion des Hirntrockenpulvers mit 1% Triton X-100 in 0.1 M Natriumacetatpuffer pH 4.3 nach vorhergehender zweimaliger Behandlung des Trockengewebes mit 0.5% Natriumcholat in 0.1 M Natriumacetatpuffer pH 4.0.

Wird das in isotonischer KCl-Lösung homogenisierte Hirngewebe der Ratte mit den proteolytischen Enzymen Trypsin, α -Chymotrypsin oder Pronase vorinkubiert,

⁴ G. BIOZZI, B. BENACERRAF and B. HALPERN, Br. J. exp. Path. 34, 441 (1953).

⁵ E. A. KABAT and M. M. MAYER, in *Experimental Immunochemistry*, 2nd Edition (Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois 1961).

⁶ W. R. WOOLLES and N. R. DiLUZIO, J. R. Soc. 7, 160 (1964).

⁷ Supported by Research Grants from The John A. Hartford Foundation, T. Mellon and Sons and NSF (Grant No. GH-34).

⁸ The authors are deeply indebted to Drs. J. H. HELLER, J. H. GREEN and A. D. ADLER for support and helpful discussions in the course of this work. We thank Mrs. G. KATOPODIS, Mrs. R. WELLS, Miss J. MANNION, Mrs. S. REYNOLDS and Mrs. A. LEE for technical assistance.

dann findet man eine sehr viel höhere Neuraminidase-Aktivität im Überstand nach der Zentrifugation bei $65\,000 \times g$ (Tabelle). Die genannten proteolytischen Enzyme lösen aktive Neuraminidasen von den Strukturen. Diese Neuraminidasen weisen nach den Ergebnissen der Ammonsulfatfällung (Tabelle) unterschiedliche Molekulargewichte auf. Das mit Trypsin solubilisierete Enzym ist bei 50% Sättigung mit Ammonsulfat fällbar; die Hauptmenge des mit α -Chymotrypsin freigesetzten Enzyms kann erst bei 75% Sättigung mit Ammonsulfat präzipitiert werden. Nur eine geringe Enzymaktivität befindet sich im Sediment der Pronaseinkubation nach Dreiviertelsättigung mit Ammonsulfat. Von den untersuchten Proteasen zeigt Trypsin den stärksten solubilisierenden Effekt.

Schon früher haben SETO, DRZENIEK und ROTT⁴ gefunden, dass durch Pronase eine niedrigmolekulare Neuraminidase von der Influenzavirusmembran abgelöst werden kann. Auch Trypsin und α -Chymotrypsin bewirken eine Solubilisierung der Myxovirusneuraminidase^{5,6}. Über die Freisetzung einer Neuraminidase von der Thrombozyten- und Erythrozytenmembran durch Inkubation mit Pronase hatten wir vor kurzem berichtet⁷.

Die Tatsache, dass verschiedene Proteasen Neuraminidase unterschiedlicher Herkunft nicht zu inaktivieren, sondern sogar, wie im Falle des α -Chymotrypsins, eher zu aktivieren vermögen, kann man dazu ausnutzen, mit Hilfe eines Kombinationsgemisches Neuraminidase/Protease (α -Chymotrypsin) nach Einwirkung auf Zellsuspensionen den Gesamtneuraminsäuregehalt von Zellen zu bestimmen. Dabei wird ein Maximum an mucoid- und glycolipoidgebundener Neuraminsäure erfasst, weil durch die Proteasewirkung zusätzlich sterisch unzugängliche Neuraminsäure freigelegt wird^{8,9}.

Das durch Pronase freigesetzte Enzym verliert bei der Chromatographie an Sephadex G-50 den grössten Teil seiner Aktivität (Figur). Auch das durch Trypsininkubation erhaltene Enzym konnte nach der 50% Ammonsulfatfällung an Sephadex G-100 nur unter beträchtlichen Verlusten weiter gereinigt werden. Eine fast dreifache Anreicherung ging in Übereinstimmung mit TETTAMANTI² mit einem über 50%igen Enzymverlust einher.

Methodik. Aktivität im Überstand des Hirnhomogenates: Zwei Rattengehirne (~ 3 g Feuchtwicht) wurden in 10 ml 0.154 M KCl homogenisiert und nach dem Hinzufügen von 100 mg des jeweiligen proteolytischen Enzyms 2 h bei 37°C unter gelegentlichem Umrühren inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde der Ge-

hirnbrei in der Ultrazentrifuge bei $65\,000 \times g$ 25 min lang zentrifugiert. 0.5 ml des klaren Überstandes wurden zu 0.5 ml einer Gangliosidlösung (0.5 ml der Lösung enthielt 1 mg Gangliosid mit 16% N-Acetylneuraminsäure, gelöst in 0.2 M K-Acetatpuffer pH 4.3) gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert.

Die vom Enzym freigesetzte Menge N-Acetylneuraminsäure bestimmten wir in 0.2 ml-Proben des Inkubationsansatzes nach der Methode von AMINOFF¹¹. Unter denselben Bedingungen führten wir jeweils zwei Kontrollbestimmungen durch. Eine Probe enthielt kein Substrat, die andere enthielt Substrat, aber kein Enzym.

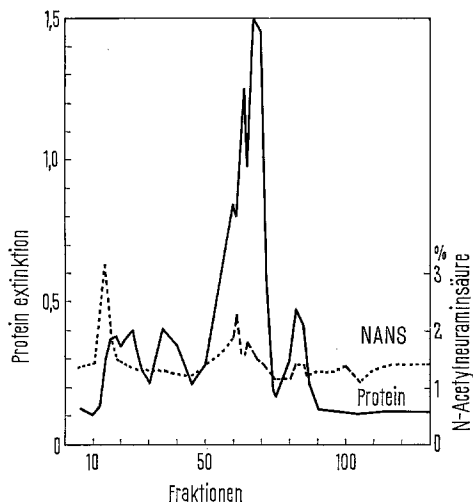
Aktivität der Enzymlösungen nach der Ammonsulfatfällung: 6 Rattengehirne (~ 9 g Feuchtwicht) wurden in 18 ml 0.154 M KCl homogenisiert und nach dem Hinzufügen von 100 mg des jeweiligen proteolytischen Enzyms 2 h bei 37°C unter gelegentlichem Umrühren inkubiert. Nach der Zentrifugation bei $65\,000 \times g/25$ min wurde der Überstand bis zur Halbsättigung mit kristallisiertem Ammonsulfat versetzt. Der Niederschlag wurde bei $65\,000 \times g/15$ min sedimentiert, in 5 ml 0.2 M K-Acetatpuffer (pH 4.3) aufgenommen und 16 h lang bei 4°C gegen 0.2 M K-Acetatpuffer (pH 4.3) dialysiert. Der Überstand nach Fällung und Sedimentation der 50%-

- ¹ S. DI DONATO und G. TETTAMANTI, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. 43, 1032 (1967). – K. SANDHOFF und H. JATZKEWITZ, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 141, 442 (1967). – W. GIELEN und V. HARPPRECHT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 201 (1969).
- ² G. TETTAMANTI und V. ZAMBOTTI, Enzymologia (Den Haag) 35, 61 (1968).
- ³ Z. LEIBOVITZ und S. GATT, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 152, 136 (1968).
- ⁴ J. T. SETO, R. DRZENIEK und R. ROTT, Biochim. biophys. Acta 113, 402 (1966).
- ⁵ L. W. MAYRON, B. ROBERT, R. J. WINZLER und M. E. RAFELSON, Arch. Biochem. Biophys. 92, 475 (1961).
- ⁶ V. W. WILSON und M. E. RAFELSON, Biochem. Prep. 10, 113 (1963).
- ⁷ W. GIELEN, J. ETZRODT und G. UHLENBRUCK, Thromb. Diath. haemorrh. 22, 201 (1969).
- ⁸ G. UHLENBRUCK, A. ROTHE und G. I. PARDOE, Z. Immunforsch. 136, 79 (1968).
- ⁹ G. UHLENBRUCK und H. J. SEHRBUNDT, Bibl. haemat. 32, 337 (1969).
- ¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- ¹¹ D. AMINOFF, Biochem. J. 81, 384 (1961).

Solubilisierung der Neuraminidase aus Rattengehirn und die Neuraminidase-Aktivität in μ g freigesetzter N-Acetylneuraminsäure/ml Inkubationsmedium

Solubilisationsmedium	Neuraminidase-Aktivität in μ g N-Acetylneuraminsäure/ml Inkubationsmedium			
	Überstand des Gesamthomogenates		Enzymlösungen nach Fällung mit Ammonsulfat	
			50%	75%
0.154 M KCl	2.3	1.3 (5.5; 5.0)	4.5 (10.2)	<1.0 (5.6)
0.154 M KCl + 1% Triton X-100	5.6	5.2 (8.7; 7.8)	9.8 (15.5)	<1.0 (5.5)
0.154 M KCl + Trypsin	61.5	59.5 (13.75; 13.5)	5.2 (2.6)	<1.0 (6.8)
0.154 M KCl + α -Chymotrypsin	56.0	55.3 (11.8; 11.7)	3.1 (0.9)	5.6 (6.7)
0.154 M KCl + Pronase	40.0	38.0 (6.4; 5.6)	<1.0 (0.4)	1.6 (1.6)

Die Zahlen in den Klammern geben den Gehalt an Protein in mg/ml Inkubationslösung an, bestimmt nach LOWRY¹⁰ unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard.



Elutionsverlauf des durch Pronase freigesetzten Enzyms an Sephadex G-50. Fraktionierung des Überstandes vom Gesamthomogenat nach Zentrifugation bei $65000 \times g/25$ min. Eluiert mit $0,05 M$ Tris-HCl-Puffer pH 7,0; 5 ml-Fraktionen. Durchgezogene Linie zeigt den Verlauf der Proteinelution, durchbrochene Linie gibt die Neuraminidase-Aktivität an. Ordinate links: Extinktion des Proteins, bestimmt nach LOWRY¹⁰. Ordinate rechts: freigesetzte Menge N-Acetylneuraminsäure (NANS), bestimmt nach AMINOFF¹¹ und bezogen auf den Neuraminsäuregehalt des Substrates. Als Substrat diente ein gereinigtes und dialysiertes Gangliosidgemisch mit 16% N-Acetylneuraminsäure.

Ammonsulfatfraktion wurde bis zur Dreiviertelsättigung mit kristallisiertem Ammonsulfat versetzt. Das Sediment wurde in 5 ml $0,2 M$ K-Acetatpuffer (pH 4.3) gelöst und ebenfalls 16 h lang bei $4^\circ C$ gegen $0,2 M$ K-Acetatpuffer (pH 4.3) dialysiert. Die dialysierten Proteinlösungen wurden in insgesamt 6 ml $0,2 M$ K-Acetatpuffer (pH 4.3) suspendiert. Jeweils 1 ml dieser Lösungen wurde zu 1 mg Gangliosid hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei $37^\circ C$ bestimmten wir die freigesetzte Menge N-Acetylneuraminsäure in 0.2 ml-Proben des Inkubationsansatzes nach der Methode von AMINOFF¹¹. Unter denselben Bedingungen wurden wiederum zwei Kontrollbestimmungen durchgeführt¹².

Summary. The release of membrane-bound brain neuraminidase from brain homogenate by proteolytic digestion with trypsin, α -chymotrypsin and pronase is described. Trypsin shows the highest solubilizing effect. On the basis of the ammoniumsulphate precipitation the pronase-released neuraminidase has the lowest molecular size.

W. GIELEN

Pharmakologisches Institut
der Universität Köln, Postfach 1709,
D-5 Köln-Lindenthal (Deutschland), 17. Dezember 1969.

¹² Mit Unterstützung durch das Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen.

Action of Sodium Dodecyl Sulfate on Electron Transport Enzymes of *Rhodospirillum rubrum*

In an attempt to elaborate relations between molecular architecture and functioning of bacterial membranal systems, the effects of detergents on the particulate electron transport system of *R. rubrum* have been studied. The enzymes of this system were shown to exhibit a different activation-inactivation behaviour in the presence of the detergents tested, sodium deoxycholate (DOC)¹ and Triton X-100². A particulate NADH-dehydrogenase was partly solubilized by DOC and has subsequently been characterized³. The present study is concerned with the action of the strong anionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) on the *R. rubrum* system.

Methods. The methods used for cultivation of cells, for the preparation of the electron transport particulate fraction and the conditions for assaying the different electron transport enzymes were those described in detail in previous papers^{1,3-5}. Frozen cell material was used for the experiments to be described².

Results and discussion. The ability of SDS to solubilize the membraneous system of *R. rubrum* was found to be quite similar (with respect to detergent/membrane protein ratio and extent of solubilization) to that of DOC and Triton X-100². Thus no difference between anionic detergents (DOC and SDS) and a non-ionic detergent (Triton X-100) is seen in this respect.

In the Figure the activities of several electron transport components are depicted in their response to increasing concentrations of SDS at $0^\circ C$. The NADH oxidase system, as it was already seen with the other detergents, is the most sensitive activity. Succinate-cytochrome c-reductase also becomes inactivated, while NADH-cytochrome c-reductase is stimulated by approximately 100% before higher concentrations of detergent inactivate the enzyme.

Here profound differences exist between the 3 detergents tested. With DOC NADH- and succinate-cytochrome c-reductase both become stimulated¹, whereas in the presence of Triton X-100 the activity of succinate-cytochrome c-reductase is increased while NADH-cytochrome c-reductase is rapidly inactivated². Under the conditions of the experiments none of the activities is rendered into a soluble form. It should be noted that the NADH oxidase of mycoplasma was recently shown to be extremely stable as compared to the *R. rubrum* enzyme. A SDS concentration 3 times that which, at $0^\circ C$, causes 50% inactivation of the latter enzyme will at $37^\circ C$ still activate the mycoplasma enzyme by over 100%⁶.

The solubilizing effect of the detergents is probably a result of a displacement of lipid from its intimate association with the membrane protein so that structural and functional integrity can no longer be maintained. The complex behaviour of the activities just mentioned indicates that by such dispersal different effects on the membranal system and its components can be produced by the individual detergents. Those effects which manifest in altered enzymatic activities might modify the substrate or acceptor binding sites of the membrane enzyme (e.g. increased accessibility causes stimulation

¹ M. BOLL, Arch. Mikrobiol. 68, 191 (1969).

² M. BOLL, Arch. Mikrobiol., 71, 1 (1970).

³ M. BOLL, Arch. Mikrobiol. 69, 301 (1969).

⁴ M. BOLL, Arch. Mikrobiol. 62, 94 (1968).

⁵ M. BOLL, Arch. Mikrobiol. 64, 85 (1968).

⁶ S. RAZIN, Z. NE'EMAN and I. OHAD, Biochim. biophys. Acta 193, 277 (1969).