

ACKNOWLEDGEMENTS

Grateful acknowledgements are made to the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Australia) for a post-graduate Overseas Studentship (A.R.G.) and to the Colonial Medical Research Council for a grant (G.V.F.S.).

REFERENCES

- ¹ H. G. BUNGENBERG DE JONG, in *Colloid Science*, Editor KRUYT, Elsevier, Amsterdam, Vol. II, chapter 9, 1949.
- ² C. R. BRINTON AND M. A. LAUFFER, *Electrophoresis*, Editor A. P. BIER, New York 1959, p. 427.
- ³ A. R. GILBY, A. V. FEW AND K. McQUILLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 21.
- ⁴ A. D. BANGHAM, R. FLEMANS, D. H. HEARD AND G. V. F. SEAMAN, *Nature*, 182 (1958) 642.
- ⁵ E. J. COHN AND J. T. EDSALL, *Proteins, amino acids and peptides*, REINHOLD, New York, 1943, chapter 20.
- ⁶ M. R. J. SALTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 512.
- ⁷ J. T. DAVIES, D. A. HAYDON AND E. K. RIDEAL, *Proc. Roy. Soc., (London) B*, 145 (1956) 375.
- ⁸ A. V. FEW, M. J. FRASER AND A. R. GILBY, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1956) 306.
- ⁹ J. H. B. LOWICK AND A. M. JAMES, *Biochem. J.*, 65 (1957) 431.
- ¹⁰ M. C. PANGBORN, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 351.
- ¹¹ J. F. DANIELLI, *Cytology and Cell Physiology*, Editor BOURNE, O.U.P. Oxford 1951 p. 150.

Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 130-136

ÉTUDE DU "RÉTROCONTROLE" DE SYNTHÈSES D'ENZYMES PAR DES ACIDES AMINÉS AU COURS DE LA CROISSANCE DE *PROTEUS MORGANII**

S. BOURGEOIS, J. M. WIAME ET H. LELOUCHIER-DAGNELIE

*Institut de Recherches du Centre d'Enseignement et de
Recherches des Industries Alimentaires et Chimiques (C.E.R.I.A.),
Laboratoire de Microbiologie de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique)*

(Reçu le 2 Mai, 1959)

SUMMARY

Feedback control on synthesis of enzymes by amino acids during growth of P. morganii

The kinetics of growth of *Proteus morganii* shows evidence for a feedback control on the synthesis of enzymes by cysteine and methionine.

These repressions are expressed by lags in the growth and by "diauxies" and "triauxies".

The pool of repressors interferes with the expression of the repression.

INTRODUCTION

Lors de son étude sur la croissance bactérienne, MONOD³ a montré que lorsqu'on fait croître des bactéries en présence de deux sucres dont l'un (a) est métabolisé par

* Une partie de ce travail a fait l'objet de notes préliminaires^{1,2}.

des enzymes constitutifs et l'autre (b) par des enzymes adaptatifs, les organismes commencent par utiliser (a) à l'exclusion de (b). Ce phénomène donne lieu à une "diauxie" (croissance double). MONOD concluait: "La diauxie est l'expression d'une variation du pouvoir enzymatique, . . . cette variation est liée à la nature adaptative de certains enzymes et au pouvoir que semblent posséder certains sucres d'inhiber ces enzymes ou plus exactement d'inhiber leur adaptation". La nature de cette inhibition est restée obscure.

De nombreux auteurs ont montré, d'autre part, que les bactéries utilisent de préférence un métabolite préformé, plutôt que de le synthétiser *de novo*. Ce "choix" résulte également d'une inhibition dont la nature, dans ce cas, a pu être précisée: il s'agit, cette fois, d'inhibition d'une chaîne métabolique par le produit final résultant de son activité. Ce phénomène a reçu le nom de "feedback control", terme que nous nous proposons de traduire par "rétrocontrôle".

De nombreux cas de rétrocontrôle ont été découverts au cours de ces dernières années: citons notamment les rétrocontrôles par le tryptophane⁴, la méthionine^{5,6}, la valine⁷, l'isoleucine⁸, l'arginine^{9,10}, les pyrimidines¹¹ et les purines^{12,13}.

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que le rétrocontrôle peut s'exercer par deux mécanismes, agissant souvent simultanément: le premier consiste en l'inhibition d'activités enzymatiques le long d'une chaîne métabolique par son produit final, le second en l'inhibition par ce produit de la formation d'enzymes intervenant dans cette chaîne. On réserve à ce second mécanisme le terme de répression¹⁰.

On n'a cependant jamais mis en évidence de diauxie conséquente à un rétrocontrôle. Le présent travail montre dans quelles conditions le rétrocontrôle par la cystéine et la méthionine se manifeste par des latences, des di- et des triauxies.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Microorganisme

Proteus morganii souche P₁₈, provenant du laboratoire du Prof. TULASNE à Strasbourg.

Croissances

Les croissances se font à 36° avec aération par agitation et dans des fioles surmontées d'une cellule cylindrique¹⁴. On utilise, suivant les cas, des fioles d'une capacité de 125 ml contenant 40 ml de culture, ou des fioles d'une capacité de 1 l contenant 250 ml de culture. Les croissances sont suivies par mesures de D.O. au spectrophotomètre Beckman B à 660 mμ.

Milieux de culture

(a) Milieu d'entretien: "Nutrient Agar" Difco, en tubes inclinés. (b) Milieu minimum (min.): est constitué de glycérol 0.1 M; (NH₄)₂SO₄ 0.02 M; tampon aux phosphates (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) 0.02 M; NaCl 0.01 M; K₂SO₄ 0.01 M; MgSO₄ 0.001 M; citrate de fer 0.00004 M; acide nicotinique 10⁻⁴ M. Le pH final est de 7.3. (c) Milieux complexes: Bouillon: "Nutrient Broth" Difco. 8 g/l sont dissous soit dans du milieu minimum, soit dans du tampon aux phosphates 0.02 M, pH 7.3.

Hydrolysat de caséine: "Casamino Acids - vitamin free" Difco. 8 g/l sont dissous soit dans du milieu minimum, soit dans du tampon aux phosphates 0.02 M, pH 7.3.

Nous avons vérifié que la présence de milieu minimum dans des précultures en bouillon ou en hydrolysat de caséine n'influence pas le comportement ultérieur des bactéries.

Milieu min. acides aminés: Milieu minimum additionné d'un mélange des 19 acides aminés purs constituant approximativement la caséine, soit, par litre de milieu 0.35 g L-arginine, 0.28 g L-histidine, 0.71 g L-lysine, 1.92 g acide L-glutamique (neutralisé), 0.58 g acide L-aspartique (neutralisé), 0.03 g glycine, 0.28 g L-alanine, 0.52 g L-valine, 0.91 g L-leucine, 0.45 g L-isoleucine, 0.92 g L-proline, 0.56 g L-phénylalanine, 0.102 g DL-sérine, 0.78 g DL-thréonine, 0.45 g L-tyrosine, 0.21 g L-hydroxyproline, 0.23 g L-tryptophane, 0.03 g L-cystéine, 0.58 g DL-méthionine.

Produits

Tous les sels utilisés sont de qualité "pro analysi". La DL-allocystathionine et la DL-homocystéine sont des produits de la "California Foundation for Biochemical Research". La DL-méthionine est un produit de la "Nutritional Biochemicals Co.". Tous les autres acides aminés sont des produits "F. Hoffmann-La Roche und Co.". L'acide L-glutamique Hoffmann-La Roche. contient des traces d'autres acides aminés et, notamment, de la méthionine. Il a été purifié par 4 recristallisations dans l'eau.

Récolte

Les bactéries sont récoltées à la surface d'un tube de gélose incliné âgé de 15 h environ, et mises en suspension dans le milieu de préculture de façon à réaliser une D.O. de 0.1 environ. Quand la préculture a atteint la D.O. de 0.350, les bactéries sont récoltées stérilement par centrifugation, remises en suspension dans le milieu minimum et centrifugées une seconde fois. Le culot de bactéries lavées est alors remis dans quelques millilitres de milieu minimum. Cette suspension dense est utilisée à l'ensemencement des milieux à expérimenter. La valeur de l'inoculum n'influence pas le sens des résultats. Toutefois, on s'efforce d'ensemencer toutes les fioles d'une même expérience à la même D.O. de départ, généralement 0.1 environ.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Influence du milieu de préculture sur la latence en milieu minimum

Si on fait croître *Proteus morganii* en milieu minimum et, après centrifugation et lavage, on le transfert dans le même milieu, la croissance reprend immédiatement. Par contre, si on transfert de la même façon en milieu minimum des bactéries provenant d'une préculture en présence de bouillon nutritif, la croissance ne reprend qu'après une longue latence. Celle-ci varie d'une expérience à l'autre, de 24 à 60 h.

Cette latence est due aux acides aminés contenus dans le bouillon de préculture car on l'observe également après croissance en présence d'hydrolysat de caséine ou du mélange des 19 acides aminés constituant la caséine (milieu min. acides aminés) (Fig. 1).

Nous avons vérifié cette croissance tardive n'est pas due à une sélection de mutants.

Cette latence suggère que les organismes sont devenus incapables de synthétiser une ou plusieurs substances essentielles à leur croissance. Afin de préciser leur déficience, nous avons testé l'effet de nombreux composés sur cette latence.

Effet d'acides aminés soufrés sur la latence

Les acides aminés soufrés L-cystéine et DL-méthionine, et leurs dérivés, la DL-homocystéine et la DL-allocystathionine, sont les plus actifs à réduire la latence en milieu minimum. Leur addition à faible concentration réduit cette latence à 2 h environ (Fig. 2). L'homosérine et la sérine ne raccourcissent pas la latence.

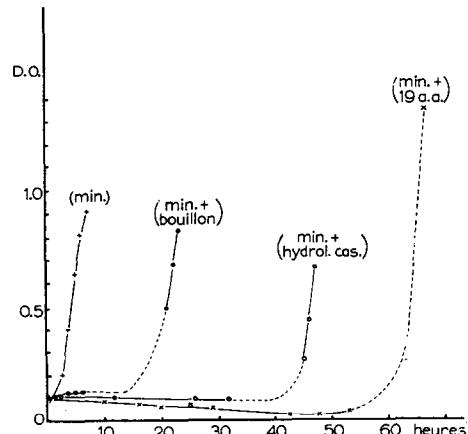


Fig. 1. Croissances en milieu minimum de *Proteus morganii* ayant crû au préalable dans le milieu indiqué entre parenthèses.

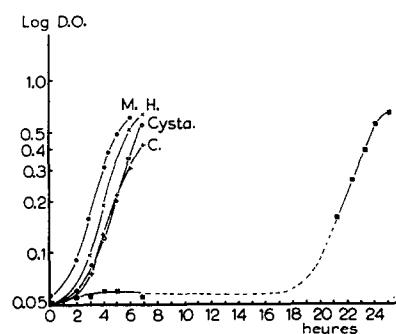


Fig. 2. Croissances en milieu minimum de *Proteus morganii* ayant crû au préalable en bouillon tamponné. ■—■ min.; ●—● min. + DL-méthionine 0.0002 M; ×—× min. + DL-homocystéine 0.0002 M. +—+ min. + L-cystéine 0.0001 M; ○—○ min. + DL-allocystathionine 0.0002 M.

Effet sur la latence de la suppression de la cystéine et de la méthionine lors de la préculture

Les résultats précédents suggèrent que la croissance en milieu complexe rend *P. morganii* incapable de synthétiser la cystéine et la méthionine. On peut penser que la perte de cette capacité biosynthétique est due à la présence, dans la préculture, de cystéine et méthionine qui réprimeraient la synthèse d'enzymes intervenant dans leur propre voie biosynthétique. L'expérience représentée par la Fig. 3 est une première preuve qu'il en est bien ainsi.

Un témoin, ayant crû en présence de 19 acides aminés (milieu min. acides aminés), présente la longue latence habituelle. La suppression du milieu de préculture soit de la cystéine, soit de la méthionine, réduit considérablement cette latence. La réduction de la latence est renforcée si on supprime simultanément la cystéine et la méthionine. Ceci suggère que, quoique faisant partie de la même chaîne métabolique, chacun y exerce une répression sur la synthèse d'enzymes différents. Il semble, d'autre part, que la cystéine soit responsable de la majeure partie de la latence.

Diauxie en présence de cystéine

Comme nous l'avons montré ci-dessus (Fig. 2), des bactéries réprimées par croissance en milieu complexe, puis transférées en milieu minimum additionné de L-cystéine, y croissent après une courte latence (2 h). Cependant, en présence d'une dose de L-cystéine suffisamment faible, $6.2 \cdot 10^{-5} M$ par exemple, nous observons un phénomène de diauxie (croissance double)³. La croissance se déroule en deux phases exponentielles séparées par une phase de croissance ralentie.

Afin d'interpréter ce phénomène, nous avons déterminé, au cours d'une telle

diauxie, l'état de répression des bactéries en mesurant la latence lors de leur transfert en milieu minimum. Les résultats sont représentés dans la Fig. 4.

La phase de croissance ralentie apparaît comme une manifestation de l'effet répresseur de la cystéine. En effet, les bactéries récoltées au point 3, c'est-à-dire peu avant le ralentissement, transférées en milieu minimum, n'y croissent qu'après une latence de 24 h environ (courbe inférieure 3). Elles sont donc fortement réprimées.

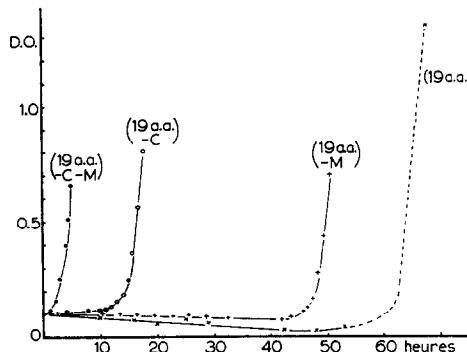


Fig. 3. Croissances en milieu minimum de *Proteus morganii* ayant crû au préalable dans les milieux suivants: $\times-\times$ min. acides aminés; $+-+$ min. acides aminés sans méthionine; $O-O$ min. acides aminés sans cystéine; $\bullet-\bullet$ min. acides aminés sans méthionine, ni cystéine.

Ensuite, au point 4, la répression est déjà beaucoup plus faible et a disparu aux points 5, 6 et 7. Le ralentissement de la croissance correspond donc à l'épuisement de la cystéine du milieu, accompagné de la levée de la répression qu'elle exerçait.

L'état des bactéries, au point 2, est remarquable et fait ressortir un phénomène nouveau. Les bactéries sont fortement réprimées aux points 1 et 3. Le point 2 se situe donc en pleine période de répression et, cependant, ces bactéries se comportent en milieu minimum comme très faiblement réprimées (latence de 2 h). Cette anomalie apparente nous a suggéré l'explication d'un phénomène constaté antérieurement lors de l'étude du degré de répression en fonction de la concentration en cystéine du milieu complexe. Il était apparu que, si on augmente la dose de cystéine du milieu complexe, à partir d'une certaine concentration la répression, loin d'être plus forte, semble partiellement levée.

On peut penser que, dans un milieu déséquilibré par la présence d'un excès de cystéine (comme c'est le cas au point 2 où la cystéine est le seul acide aminé présent), les bactéries accumulent une réserve intérieure de cystéine libre (pool), qu'elles emportent lors de leur transfert en milieu minimum, où le départ de la croissance s'en trouve facilité.

Diauxie en présence de méthionine

La répression par la méthionine se manifeste également, en présence de DL-méthionine $3.1 \cdot 10^{-5} M$, par une diauxie. L'état de répression donne également lieu,

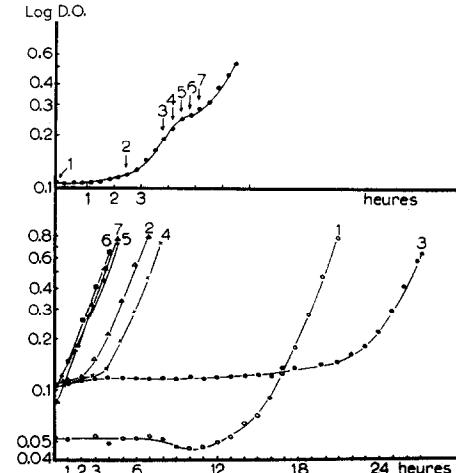


Fig. 4. Courbe supérieure: diauxie en présence de L-cystéine $6.2 \cdot 10^{-5} M$. Préculture en milieu 1-2-3. Courbes inférieures: croissances en milieu minimum de *Proteus morganii* récolté en différents points de la diauxie.

lors des transferts en milieu minimum, à des latences (points 4 et 5 de la Fig. 5).

L'accumulation d'un pool de méthionine masque également le phénomène aux points 1, 2 et 3. Cette accumulation semble particulièrement rapide: au point 1, les bactéries provenant du milieu complexe n'ont séjourné que pendant quelques minutes en milieu minimum additionné de méthionine seule. Elles croissent en milieu

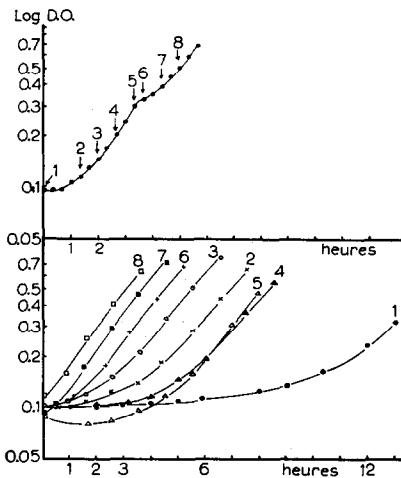


Fig. 5. Courbe supérieure: diauxie en présence de DL-méthionine $3.1 \cdot 10^{-5} M$. Préculture en bouillon tamponné. Courbes inférieures: croissances en milieu minimum de *Proteus morganii* récolté en différents points de la diauxie.

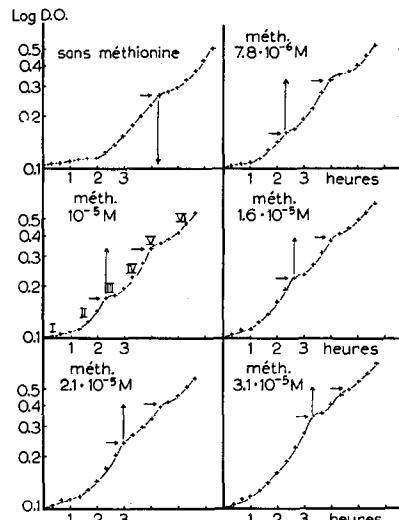


Fig. 6. Triauxies en milieu minimum additionné de L-cystéine $6.2 \cdot 10^{-5} M$ et de DL-méthionine aux concentrations indiquées. Préculture en hydrolysat de caséine tamponné.

minimum après une latence de 10 h environ, nettement inférieure à celle que l'on aurait observée par transfert direct des bactéries de milieu complexe en milieu minimum (Fig. 1).

Triauxie en présence de cystéine et méthionine simultanément

La Fig. 6 met en évidence une triauxie correspondant aux deux répressions distinctes exercées par la cystéine et la méthionine.

La croissance se déroule en trois phases exponentielles successives (II, IV et VI), précédées chacune d'une phase de croissance ralenties (I, III et V).

En faisant varier la dose de méthionine et en maintenant constante la dose de cystéine, la valeur de la phase de croissance II varie de façon approximativement proportionnelle à la dose de méthionine, tandis que la croissance IV reste constante. Si l'on surmonte la fin de la phase II de la valeur (en coordonnées logarithmiques) de l'accroissement de D.O. obtenu en présence de cystéine seule, on atteint, dans chaque cas, une valeur très proche de la phase V.

On peut donc conclure que la croissance II correspond à l'utilisation de la méthionine du milieu jusqu'à épuisement, atteint au début de la phase III. Cet épuisement est accompagné de l'apparition d'enzymes de biosynthèse de la méthionine à partir de cystéine. *Proteus morganii* utilise alors la cystéine du milieu, ce qui correspond à la croissance IV, jusqu'à épuisement de la cystéine, en V, accompagné de l'apparition

d'enzymes de biosynthèse de cystéine. A la fin de la phase de ralentissement V, les bactéries sont devenues capables de synthétiser la cystéine (à partir de glycérol, d'ammonium et de sulfate) et la méthionine (à partir de cystéine), donc de croître en milieu minimum, ce qui correspond à la phase VI.

Nature de la latence résiduelle

La latence de 2 h qui subsiste en présence de cystéine et méthionine peut être, pratiquement, supprimée par addition de 7 acides aminés (Fig. 7), parmi lesquels l'arginine, la lysine et la leucine sont les plus actifs.

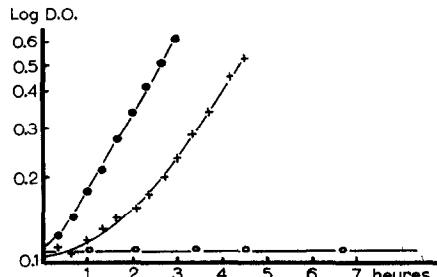


Fig. 7. Effet de 7 acides aminés sur la latence résiduelle. Préculture en milieu minimum additionné d'hydrolysat de caséine. ○—○ min.; ×—× min. + DL-méthionine 0.0005 M; ●—● min. + DL-méthionine 0.0005 M + L-lysine + L-arginine + L-histidine + L-leucine + L-isoleucine + glycine + L-tryptophane 0.0001 M chacun.

Cette latence résiduelle correspond aussi à des répressions exercées par ces acides aminés. Ces répressions sont, toutefois, levées beaucoup plus rapidement (2 h) que celles exercées par la méthionine et la cystéine (40 h en moyenne).

DISCUSSION

L'étude de la cinétique de croissance de *Proteus morganii* dans les conditions décrites ci-dessus constitue une méthode simple, et peut-être générale, de mise en évidence de phénomènes de rétrocontrôle par le mécanisme de répression de synthèses d'enzymes. Cette méthode, toutefois, ne permet pas de déceler les rétrocontrôles par inhibition d'activités enzymatiques.

Les répressions de synthèse d'enzymes s'expriment dans ce travail par deux phénomènes: d'une part, par les diauxies observées en présence de répresseur et, d'autre part, par les latences qui s'écoulent lors du transfert en milieu minimum de bactéries réprimées. Dans ces deux cas, l'éloignement de l'acide aminé—soit par épuisement, soit par transfert—lève l'inhibition éventuelle de l'activité enzymatique, et le ralentissement de croissance ou la latence ne peuvent être dûs qu'à l'absence des enzymes spécifiques de synthèse des acides aminés en cause. La latence en milieu minimum constitue une mesure indirecte du contenu enzymatique des cellules.

Il semble qu'on puisse conclure également que la levée de la répression s'accomplice par une synthèse préférentielle des enzymes réprimés, comme UMBARGER ET BROWN l'ont montré¹⁵. En effet, la répression est totalement levée en 40 min, alors que l'accroissement de la masse bactérienne n'est que de 30 % (comparer les points 3 et 5 de la Fig. 4). La synthèse des enzymes préalablement réprimés s'accomplice en

utilisant la dernière trace d'acide aminé répresseur, dès que celui-ci a atteint une concentration non répressive. Ceci ressort particulièrement de la différence de temps nécessaire à cette synthèse d'enzymes selon qu'elle s'effectue à la suite de l'épuisement du répresseur (diauxie) ou à la suite d'un transfert en milieu minimum des bactéries réprimées et lavées. Ce transfert élimine, en effet, l'acide aminé répresseur indispensable à la restauration enzymatique. La dégradation que subissent les protéines pendant la latence¹⁶ constitue alors la seule source des acides aminés dont la synthèse est réprimée. La nécessité du répresseur pour effectuer la restauration enzymatique est propre à toute répression au niveau de la biosynthèse d'un acide aminé et rend la levée de ces répressions particulièrement difficile; les latences très longues, souvent accompagnées de lyse partielle et même, dans certains cas, l'absence totale de croissance, en sont des conséquences.

La méthode utilisée dans ce travail, fondée uniquement sur l'étude de la croissance, ne permet pas de préciser entièrement les sites de répression. Celle-ci doit être complétée par des déterminations quantitatives des enzymes participant à la biosynthèse de la cystéine et de la méthionine, et doit attendre que de nouveaux progrès soient réalisés dans ce domaine. On peut cependant, dès à présent, conclure que la cystéine et la méthionine agissent au moins en deux sites différents de la chaîne biosynthétique, sinon on n'observerait pas de triauxie.

Le(s) site(s) de répression de la méthionine se situent-ils uniquement entre la cystéine et la méthionine ou intéressent-ils des stades de la synthèse de la cystéine? Nous avons examiné l'état de *Proteus morganii* réprimé par croissance en présence de méthionine seule: lors du transfert en milieu minimum, la latence, qui est évidemment supprimée par la méthionine, subsiste en partie (90 min) en présence de cystéine. On peut donc localiser une répression entre la cystéine et la méthionine. A première vue, ceci implique que la méthionine réprime la synthèse de la cystéine, mais ceci peut être dû à la présence de cystéine intracellulaire dérivée de la méthionine par une voie différente de l'inverse de la voie réprimée.

Le fait que l'on retrouve au cours des triauxies une quantité constante de cystéine après l'utilisation de quantités variables de méthionine suggère que la méthionine inhibe l'utilisation de la cystéine. Ce fait inattendu ne pourra être compris entièrement que par l'utilisation d'une méthode moins indirecte que celle de la croissance.

Soulignons enfin l'importance de l'accumulation d'un pool de répresseur dans la mise en évidence de la répression. Le comportement de bactéries récoltées au cours d'une croissance en présence d'un excès de répresseur est la résultante de deux phénomènes qui se neutralisent: répression et accumulation de répresseur. L'état réprimé ne se manifestera donc que chez les bactéries récoltées au moment où la concentration en répresseur est telle que le pool soit négligeable et où la répression n'est pas encore levée. Cet état est très transitoire car, dès que cette faible concentration en répresseur est atteinte, la restauration enzymatique s'accomplit rapidement. Ces phénomènes rendent compte d'échecs rencontrés lors d'essais de mise en évidence de répression après croissance en présence d'un excès de répresseur. On entend par excès de répresseur, une concentration anormalement élevée par rapport aux autres acides aminés du pool.

En plus de l'intérêt immédiat du rétrocontrôle pour l'économie de la cellule, cette notion permet d'interpréter des latences et des irrégularités fréquemment rencontrées au cours des cultures bactériennes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur W. K. MAAS de discussions fructueuses et Madame L. LELEUX-DESMAREZ pour la perfection de son travail expérimental.

Ce travail a été subsidié par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.) et par le Centre Belge d'Enzymologie.

RÉSUMÉ

L'étude de la cinétique de croissance de *Proteus morganii* a permis de mettre en évidence des phénomènes de répression de synthèse d'enzymes par la cystéine et la méthionine.

Ces répressions se manifestent par des latences, ainsi que par des diauxies et des triauxies.

Les réserves intracellulaires de ces répresseurs (pool) interfèrent avec l'expression de la répression.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ S. BOURGEOIS, J. M. WIAME ET H. LELOUCHIER-DAGNELIE, *Arch. intern. physiol. et biochim.*, 67 (1959) 504.
- ² S. BOURGEOIS, J. M. WIAME ET H. LELOUCHIER-DAGNELIE, *Expl. Cell. Research*, 18 (1959) 167.
- ³ J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann, Paris, 1942.
- ⁴ J. MONOD ET G. COHEN-BAZIRE, *Compt. rend.*, 236 (1953) 530.
- ⁵ M. COHN, G. COHEN ET J. MONOD, *Compt. rend.*, 236 (1953) 746.
- ⁶ S. WIJESUNDERA AND D. D. WOODS, *Biochem. J.*, 55 (1953) VIII.
- ⁷ E. A. ADELBERG AND H. E. UMBARGER, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 475.
- ⁸ H. E. UMBARGER, *Science*, 123 (1956) 848.
- ⁹ L. GORINI AND W. K. MAAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 208.
- ¹⁰ H. J. VOGEL, in W. D. McELROY AND B. GLASS, *The Chemical Basis of Heredity*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 276.
- ¹¹ R. A. YATES AND A. B. PARDEE, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 757.
- ¹² J. S. GOTTS, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 57.
- ¹³ H. S. MOYED, *Federation Proc.*, 17 (1958) 279.
- ¹⁴ J. M. WIAME ET R. STORCK, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 268.
- ¹⁵ H. E. UMBARGER AND B. B. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 415.
- ¹⁶ H. HALVORSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 255.