

## SUR L'ACTIVATION DU TRYPSINOGENE DE BOEUF PAR UNE PROTEINASE CRISTALLISEE D'*ASPERGILLUS SAITOI*

C. GABELOTEAU ET P. DESNUELLE

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)*

(Reçu le 4 Janvier, 1960)

---

### SUMMARY

*On the activation of beef trypsinogen by a crystallized proteinase of Aspergillus saitoi*

1. A proteolytic enzyme derived in crystallized form from *Aspergillus saitoi* is capable of activating trypsinogen and chymotrypsinogen-A at pH 4.5. In the case of trypsinogen, activation is rapid at 0°. Its kinetics are of the first order, and a specific activity equal to the maximum value attained by the classical method of auto-activation can be reached.

2. The mechanism of this new kind of activation appears to be the same as that of auto-activation. It comprises—like self-activation—the specific rupture of the sixth bond (Lys·Ileu) of the trypsinogen chain. Due to its higher specificity, the enzyme of *Aspergillus saitoi* seems to be capable of breaking another linkage in the trypsinogen, without, however, diminishing the final activity.

---

### INTRODUCTION

KUNITZ a montré depuis longtemps que le trypsinogène de boeuf est activé par au moins trois enzymes différents: la trypsine (autocatalyse) à pH 7.8 (voir réf. 1, 2), l'entérokinase à pH 5.6 (voir réf. 3) et une préparation mal définie obtenue à partir d'une souche non identifiée de *Penicillium* et active à pH 3 (voir réf. 4).

Les modifications subies par la structure covalente du trypsinogène au cours de son autoactivation ont fait l'objet d'études approfondies. On sait que la trypsine coupe la 6° liaison (liaison Lys·Ileu) de la chaîne du zymogène. Cette coupure a deux conséquences: remplacement en position N-terminale du résidu de valine du zymogène par le résidu d'isoleucine de la trypsine et ablation sous la forme d'un hexapeptide (Val(Asp)<sub>4</sub>Lys) de la séquence N-terminale située en deçà de la liaison coupée<sup>5-7</sup>.

Par contre, le mécanisme d'activation par l'entérokinase n'est pas encore définitivement établi. YAMASHINA<sup>8</sup> a bien constaté qu'en traitant le trypsinogène par une préparation purifiée d'entérokinase, il apparaissait, comme pendant l'auto-activation, un résidu N-terminal d'isoleucine dont les proportions augmentaient avec le degré d'activation. Mais, selon toute vraisemblance, l'autoactivation se déclenche

---

Abréviations utilisées: DFP, diisopropylfluorophosphate, DP-trypsine, enzyme spécifiquement inhibé par 1 mole du réactif précédent; FDNB, fluorodinitrobenzène; DNP, radical di-nitrophényl.

déjà à pH 5.6. Si l'on omet de paralyser l'activité trypsique par un moyen quelconque, cette activation peut jouer un rôle prépondérant, et il devient difficile de savoir ce qui revient réellement à l'entérokinase dans les phénomènes observés. Les expériences de YAMASHINA devraient être refaites en présence d'un inhibiteur spécifique de la trypsine.

Quant à l'activation par l'enzyme du *Penicillium*, rien de précis n'est connu à son sujet. Elle est pourtant intéressante car elle s'effectue à un pH suffisamment acide pour que l'autoactivation et l'autolyse ultérieure de la trypsine formée ne soient pas à craindre.

La souche de *Penicillium* de KUNITZ semblant être perdue, nous nous sommes adressés à un enzyme élaboré par *Aspergillus saitoi*. Obtenu récemment à l'état cristallisé, cet enzyme coupe, comme la trypsine, les liaisons basiques. Son pH optimum est 4.5 environ<sup>9</sup>.

#### TECHNIQUES

##### Matériel d'étude

Après un certain temps de stockage, le trypsinogène commercial manifeste souvent une activité trypsique très appréciable. Il convient donc d'abord, soit de le purifier par chromatographie, soit de choisir un échantillon faiblement activé. Notre échantillon contenait 2 % de trypsine. Il a été simplement traité 15 min à 0° et pH 7.8 par 5 moles/mole de DFP, dialysé contre HCl 10<sup>-3</sup> M et lyophilisé. Tous les calculs relatifs à cette substance sont basés sur les valeurs suivantes:  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  à 280 mμ, 13.9; poids moléculaire, 25,000.

L'enzyme cristallisé d'*Aspergillus saitoi* nous a été aimablement fourni par Dr. F. YOSHIDA. Sa préparation, ses propriétés et sa spécificité ont été récemment décrites<sup>9</sup>. Il hydrolyse rapidement à pH 4.5 le substrat caractéristique de la trypsine, le benzoyl-L-argininamide. Mais il s'en différencie nettement par une spécificité beaucoup plus large.

##### Réalisation des expériences

**Extrémités N-terminales:** Le trypsinogène (1 % dans l'acétate d'ammonium 0.05 M pH 4.5) est traité à 0° pendant des temps variables par 10<sup>-3</sup> mole/mole d'enzyme cristallisé. On dose l'activité trypsique sur le benzoyl-L-arginine éthylester et on détermine les extrémités N-terminales apparues par la technique classique de SANGER. Dans le but d'éviter toute action de la trypsine pendant la condensation avec FDNB, on refroidit à 0°, on amène le pH à 7.8 et on ajoute immédiatement 50 moles/mole de DFP. Puis, on agite avec FDNB en présence d'éthanol et de triméthylamine, d'abord 2 h à 0°, puis 2 h à 20°. Après extraction à l'éther, on acidifie et on extrait plusieurs fois par HCl N, l'éthanol, la méthyléthylcétone et l'éther. On admet que la partie insoluble contient des DNP-protéines et que la partie soluble contient des DNP-peptides. Les 2 fractions sont hydrolysées séparément et les hydrolysats sont étudiés de la manière habituelle.

**Extrémités C-terminales:** Après avoir traité le trypsinogène par l'enzyme pendant 4 h, on porte à 80° pendant 3 min à pH 2.4 pour arrêter la réaction, on refroidit 30 min dans la glace pour laisser à la trypsine le temps de se renaturer et on dialyse contre HCl 10<sup>-3</sup> M. Puis, on élimine par 2 lyophilisations successives l'eau et l'acétate d'ammonium du dialysat (D) et du liquide dialysé (L).

Les extrémités C-terminales de (L) sont alors déterminées par la technique à la carboxypeptidase-A et la technique d'hydrazinolyse sous sa forme modifiée<sup>10</sup>. La première technique est utilisée comme suit: Afin d'inhiber la trypsine, on traite le liquide L 15 min à 0° par 20 moles/mole de DFP dans un tampon véronal 0.02 M pH 7.8 contenant 0.01 % de Tween 20. On ajoute à 25° 0.03 mole/mole de carboxypeptidase-A préalablement dialysée et traitée par DFP. Les amino acides libérés sont déterminés et dosés par la méthode de LEVY<sup>11</sup>.

*Chromatographie des peptides:* Les peptides de (D) sont séparés par passage à travers une colonne de Dowex-50 x 2 dans les conditions précisées dans la légende de la Fig. 3. Une fraction sur quatre est traitée par la ninhydrine en présence de SnCl<sub>2</sub><sup>12</sup>. La composition de chaque pic est étudiée en prélevant des échantillons au sommet et sur les branches, en échangeant leurs ions avec ceux de l'acétate d'ammonium, en éliminant ces derniers sous vide et en effectuant des chromatographies sur papier avant et après hydrolyse.

## RESULTATS EXPÉRIMENTAUX

### Etude de l'activation et extrémités N-terminales

La Fig. 1 indique la cinétique de l'activation et permet de connaître les proportions des résidus N-terminaux au cours de ce processus. On voit que l'activation est assez rapide et qu'elle est "complète", en ce sens que 1 mole de trypsinogène donne naissance dans les conditions de l'essai à une activité contre le benzoylarginine éthylester égale à celle de 1 mole de la trypsine classique. Comme le montre la Fig. 2, la réaction d'activation est du 1<sup>er</sup> ordre. Nous sommes donc certainement en présence, non pas de l'activation autocatalytique par la trypsine, mais d'une nouvelle activation réalisée par l'enzyme d'*Aspergillus saitoi* agissant de façon autonome.

Au cours de cette activation, 4 amino acides: l'isoleucine, la valine, la sérine et l'acide aspartique (ou l'asparagine) apparaissent en position N-terminale dans la

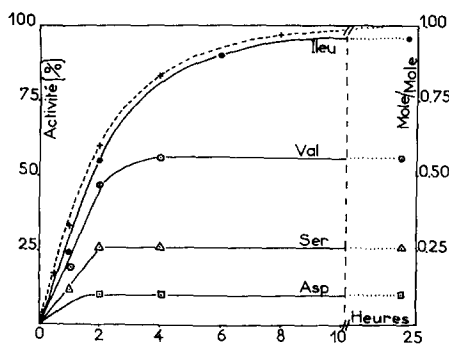


Fig. 1. Activation et résidus N-terminaux des "protéines" du mélange. Les ordonnées de droite indiquent le % d'activité, en prenant pour base 100 l'activité maximum qu'acquiert une même quantité de trypsinogène par activation autocatalytique. Les ordonnées de gauche indiquent le nombre de résidus N-terminaux par mole de trypsinogène en jeu. +, % d'activité vis à vis du benzoyl-L-arginine éthylester. ●, △ et □, respectivement, isoleucine, sérine et acide aspartique apparus en position N-terminale pendant l'activation. ○, valine N-terminale formée au cours de l'activation, compte-tenu de la valine N-terminale du trypsinogène (voir le texte).

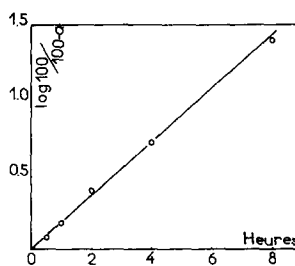


Fig. 2. Ordre de la réaction d'activation.  $a$  est l'activité au temps  $t$  en % de l'activité potentielle totale.  $100$  représente donc la quantité initiale de trypsinogène et  $100-a$ , la quantité restante au temps  $t$ .

fraction protéique des mélanges. Les proportions d'isoleucine sont considérables. Suivant fidèlement le % d'activation, elles atteignent 1 mole/mole quand l'activation est complète. Pour ce qui concerne la valine, il faut tenir compte du résidu N-terminal que contient le trypsinogène et qui passe progressivement dans la fraction peptidique pendant l'activation (Tableau I). Nous calculons donc la valine réellement formée

TABLEAU I  
ETUDE PRÉLIMINAIRE DES PEPTIDES FORMÉS AU COURS DE L'ACTIVATION

Durée de l'activation (h)	Résidus après hydrolyse (mole par mole de trypsinogène en jeu)			
	DNP-Val	$\epsilon$ -DNP-Lys	Asp	Autres résidus
1	0.2	—	0.8-1.0	0
2	0.8	0.5	2-3	0.2
23.5	0.9	1.0	3-4	1.3

en retranchant de la valine totale la valine appartenant au trypsinogène restant, elle-même déduite du % d'activation. C'est ainsi par exemple qu'après 2 h, la quantité totale de valine N-terminale déterminée à l'état de dérivé DNP est 0.86 mole/mole alors que le trypsinogène contient 0.97 mole/mole de valine N-terminale et que le % d'activation est 60. La quantité de valine N-terminale apparue en 2 h est :

$$0.86 - 0.40 \times 0.97 = 0.47 \text{ mole/mole}$$

La Fig. 1 montre que la formation de valine N-terminale est presque aussi rapide au début que celle de l'isoleucine. Puis, elle s'arrête brusquement dès que l'activation est à peu près complète. La quantité maximum est d'environ 0.5-0.6 mole/mole. Les proportions de sérine et d'acide aspartique N-terminaux sont beaucoup plus faibles. Elles ne dépassent pas 0.25 et 0.10 mole/mole, respectivement.

Le Tableau I indique les DNP-amino acides et les amino acides libres formés par hydrolyse de la fraction "DNP-peptides".

Les "autres résidus" mentionnés dans la dernière colonne du Tableau I étant au nombre d'environ 9 et leurs proportions individuelles n'étant jamais supérieures à 0.3 mole/mole, nous pouvons dire que la fraction "DNP-peptides" contient surtout DNP-Val,  $\epsilon$ -DNP-Lys et Asp dans le rapport molaire 1:1:3-4. Le peptide principal engendré par l'activation est donc très vraisemblablement le même que celui de l'auto-activation, à savoir: Val(Asp)<sub>4</sub>Lys. Ce fait va être confirmé un peu plus loin par chromatographie directe des peptides sur Dowex-50.

#### *Etude des extrémités C-terminales*

Traitée par la carboxypeptidase-A pendant 15 min, la partie protéique des mélanges (durée de l'incubation: 4 h) engendre de nombreux amino acides parmi lesquels on distingue: l'asparagine (0.6 mole), la sérine (0.5 mole), la tyrosine (0.5 mole), la valine (0.4 mole), la thréonine (0.4 mole), la leucine ou l'isoleucine (0.3 mole). Par hydrazinolyse, cette même fraction fournit: 0.2 mole de sérine et 0.3 mole de glycolle.

#### *Etude des peptides libérés pendant l'activation*

La Fig. 3 reproduit le diagramme obtenu en chromatographiant les peptides

selon la technique de MOORE ET STEIN<sup>12</sup>. Ce diagramme met en évidence 7 pics plus ou moins bien différenciés dont la composition et les proportions sont données dans le Tableau II.

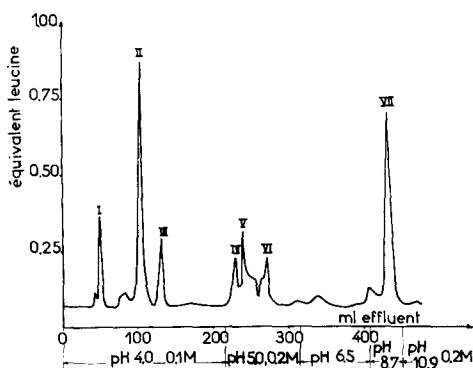


Fig. 3. Chromatographie des peptides sur Dowex-50. Colonne (0.9 × 60 cm) de Dowex-50 × 2 (parties égales de grains à 100–200 et 200–400 mailles). Débit, 4 ml/h. Fractions de 1 ml. Les liquides d'élution sont, dans l'ordre, tampon citrate 0.1 M pH 4.0, tampon citrate 0.2 M pH 5.0, tampon citrate 0.2 M pH 6.5, bicarbonate 0.2 M (pH 8.45) et carbonate 0.2 M (pH 10.9).

TABLEAU II

ANALYSE DES PICS DE LA Fig. 3

L'équivalent-leucine de chacune des substances est supposé être égal à 1, sauf dans le cas des pics II et III où il est pris égal à 1.75 pour tenir compte de la présence d'un résidu de lysine<sup>13</sup>. Les astérisques (\*) indiquent que le pic considéré contient plusieurs peptides dont les proportions individuelles sont très faibles.

No. des pics	Composition	Nb de moles pour 1 mole de trypsinogène
I	Val(Asp) <sub>3</sub>	0.12
	Ser	0.24
II	Val(Asp) <sub>4</sub> Lys	0.75
III	Asp·Lys	0.14
IV	Ammoniaque	—
V	*	—
VI	*	—
VII	*	0.90

#### DISCUSSION

Les résultats obtenus ci-dessus peuvent être commentés comme suit:

1. Le fait que la réaction d'activation se produise à pH 4.5 et qu'elle soit d'ordre 1, prouve que cette réaction n'est pas due à la trypsine. Des expériences-témoins montrent d'ailleurs que le trypsinogène traité à 0° et pH 4.5 par 20 % de trypsine pendant 5 h ne s'active qu'à concurrence de 6 %. Nous nous trouvons donc bien en présence d'un nouveau mode d'activation du trypsinogène dont le mécanisme mérite d'être éclairci.

2. Les deux phénomènes principaux que l'on observe au cours de cette nouvelle activation sont identiques à ceux qui accompagnent l'autoactivation. Un résidu N-terminal d'isoleucine (Fig. 1) et une mole d'hexapeptide Val(Asp)<sub>4</sub>Lys (Tableau I et Fig. 3) apparaissent par mole de trypsinogène en jeu. Une très bonne corrélation

peut, d'autre part, être établie entre les deux phénomènes précédents et le degré d'activation. En outre, aucun résidu C-terminal n'est engendré en proportions stoechiométriques pendant l'activation. Il semble donc évident que le trypsinogène est activé par l'enzyme d'*Aspergillus saitoi* de la même façon que par la trypsine. Dans l'un et l'autre cas, l'activation est provoquée par la rupture de la 6° liaison (liaison Lys·Ileu) de la chaîne.

3. Néanmoins, l'enzyme d'*Aspergillus saitoi* fait également apparaître dans la fraction protéique des mélanges les résidus N-terminaux suivants: valine (0.56 mole), sérine (0.26 mole) et acide aspartique (0.1 mole). Tous ces résidus sont-ils caractéristiques de l'activation par *Aspergillus saitoi* où se forment ils aussi, par une série de réactions secondaires, au cours de l'autoactivation? Pour le savoir, on traite une solution de trypsinogène à 1 % pendant 15 h à pH 7.8 par 2.3 % de trypsine. L'activation est totale. On trouve dans la partie protéique de l'isoleucine N-terminale (0.95-1.0 mole), de la valine (0.10-0.15 mole), de la sérine (0.25 mole) et de l'acide aspartique (0.10 mole). Seule la valine semble donc caractéristique de la nouvelle activation.

4. Etant donné que la formation de valine N-terminale cesse brusquement au moment où l'activation est complète, on peut supposer que l'enzyme d'*Aspergillus* est capable de rompre une liaison de la valine dans le trypsinogène et qu'il est incapable de rompre cette même liaison dans la trypsine. Une telle hypothèse est confirmée par l'expérience suivante: On traite par l'enzyme une solution à 1 % de DP-trypsine dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'activation complète du trypsinogène. La technique ordinaire indique qu'il s'est formé 0.26 mole de sérine N-terminale et 0.1 mole seulement de valine. Nous sommes donc en présence d'un exemple particulièrement frappant de l'influence exercée par la structure tertiaire d'une protéine sur la protéolyse de certaines de ses liaisons. Un autre exemple est fourni, rappelons-le, par la chymotrypsine- $\pi$  qui autolyse rapidement une liaison Leu·Ser dans sa propre molécule et qui n'attaque pas cette même liaison dans le chymotrypsinogène<sup>14</sup>.

5. L'étude réalisée au moyen de la carboxypeptidase-A et de l'hydrazinolyse n'a pas donné de résultats très nets. Elle prouve néanmoins, comme nous l'avons déjà signalé, qu'aucun résidu C-terminal n'apparaît en quantités stoechiométriques pendant l'activation. Mais la nature du résidu C-terminal qui, en toute logique, doit correspondre à la valine N-terminale, n'apparaît pas clairement. La comparaison entre les résultats fournis par les deux techniques suggère néanmoins d'attribuer à l'asparagine une signification particulière. C'est en effet l'acide aminé le plus abondant parmi ceux libérés par la carboxypeptidase-A; l'hydrazinolyse, laquelle donne par ailleurs des résultats à peu près négatifs, n'est pas susceptible de le déceler.

En somme, il paraît bien établi que l'enzyme d'*Aspergillus* coupe principalement deux liaisons du trypsinogène: la liaison stratégique Lys·Ileu qui correspond à sa spécificité principale<sup>9</sup> et une autre liaison reliant peut-être un résidu d'asparagine à un résidu de valine. Cette rupture supplémentaire n'est d'ailleurs pas surprenante car, comme toutes les protéinases des microorganismes, l'enzyme d'*Aspergillus* possède une spécificité beaucoup moins étroite que la trypsine<sup>9</sup>. On notera à l'appui de cette proposition que le mélange de peptides illustré par la Fig. 3 contient des quantités notables de Val(Asp)<sub>3</sub> et de Asp·Lys. L'enzyme a donc coupé l'hexapeptide Val(Asp)<sub>4</sub> Lys au niveau d'une liaison Asp·Asp.

6. Si l'hypothèse d'une rupture supplémentaire est admise, nous sommes conduits à penser que cette rupture n'influe pas sur l'activité estérasique de la trypsine et que l'enzyme d'*Aspergillus* engendre à la fois la trypsine classique et une "neotrypsine" possédant deux chaînes ouvertes. Mais rien de définitif ne peut être dit à ce sujet avant d'avoir séparé et caractérisé les protéines formées pendant l'activation.

7. Signalons pour terminer que l'enzyme d'*Aspergillus saitoi* active également le chymotrypsinogène-A de boeuf. Les courbes de la Fig. 4 montrent que cette

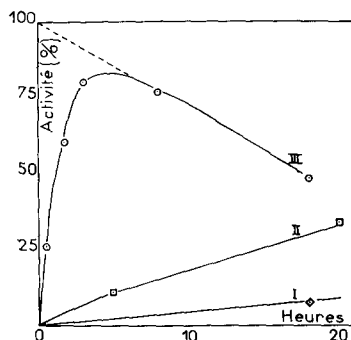


Fig. 4. Activation du chymotrypsinogène-A par l'enzyme d'*Aspergillus saitoi*. L'ordonnée 100 correspond à l'activité spécifique de la chymotrypsine-S. Courbe I: rapport molaire enzyme/substrat:  $10^{-3}$ . Température,  $0^{\circ}$ . Ces conditions sont identiques à celles utilisées pour l'activation du trypsinogène (Fig. 1). Courbe II: rapport molaire enzyme/substrat:  $2 \cdot 10^{-2}$ . Température,  $0^{\circ}$ . Courbe III: rapport molaire enzyme/substrat:  $2 \cdot 10^{-2}$ . Température,  $25^{\circ}$ .

activation est plus lente que celle du trypsinogène. Il faut utiliser à la fois une quantité plus grande d'enzyme (rapport molaire enzyme-substrat  $2 \cdot 10^{-2}$  au lieu de  $10^{-3}$ ) et une température plus élevée ( $25^{\circ}$  au lieu de  $0^{\circ}$ ) pour que les deux activations progressent à un rythme comparable. Dans ces conditions, la ou les chymotrypsines formées sont assez rapidement inactivées. Néanmoins, l'allure de la courbe III de la Fig. 4 suggère que, si aucune inactivation se produisait, l'activité spécifique des mélanges atteindrait vraisemblablement celle de la chymotrypsine- $\pi$ , c'est à dire la valeur maximum obtenue au cours de l'activation classique par la trypsine.

## RÉSUMÉ

1. Un enzyme protéolytique obtenu à l'état cristallisé à partir d'*Aspergillus saitoi* est capable d'activer le trypsinogène et le chymotrypsinogène-A à pH 4.5. Dans le cas du trypsinogène, l'activation est rapide à  $0^{\circ}$ . Elle suit une cinétique d'ordre 1 et permet d'atteindre une activité spécifique égale à la valeur maximum obtenue par le processus classique d'autoactivation.

2. Le mécanisme de cette nouvelle activation paraît identique à celui de l'autoactivation. Il comporte comme cette dernière la rupture spécifique de la 6<sup>e</sup> liaison (liaison Lys-Ileu) de la chaîne du zymogène. Toutefois, par suite de sa spécificité plus large, l'enzyme d'*Aspergillus saitoi* semble capable de couper dans le trypsinogène une autre liaison, sans que l'activité finale en soit diminuée.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1939) 293.
- <sup>2</sup> M. R. McDONALD ET M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1941) 53.
- <sup>3</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1939) 429.
- <sup>4</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 21 (1938) 601.
- <sup>5</sup> M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.
- <sup>6</sup> E. W. DAVIE ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 515.
- <sup>7</sup> P. DESNUELLE ET C. FABRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 49.
- <sup>8</sup> I. YAMASHINA, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 739.
- <sup>9</sup> F. YOSHIDA ET M. NAGASAWA, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20 (1956) 257, 262.
- <sup>10</sup> J. H. BRADBURY, *Nature*, 178 (1956) 912.
- <sup>11</sup> A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- <sup>12</sup> S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- <sup>13</sup> P. DESNUELLE ET C. GABELOTEAU, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67 (1957) 475.
- <sup>14</sup> M. ROVERY, M. POILROUX, A. YOSHIDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 608.

*Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 230-237

## ON THE METABOLIC STABILITY OF NUCLEIC ACIDS IN MITOTICALLY INACTIVE ADULT TISSUES LABELED DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT

L. L. BENNETT, JR., LINDA SIMPSON AND HOWARD E. SKIPPER

*Kettering-Meyer Laboratory\*, Southern Research Institute, Birmingham, Ala. (U.S.A.)*

(Received January 4th, 1960)

---

### SUMMARY

[8-<sup>14</sup>C]adenine was administered to pregnant mice in order to incorporate isotope into DNA and RNA of dividing fetal tissue (brain and liver) that subsequently becomes mitotically inactive in the adult animal. The radioactivity in the DNA and RNA purines of these and other tissues from the offspring were determined at periods from nine days to one year after birth. During this period there was no loss of <sup>14</sup>C from the DNA purines of brain and liver, whereas the RNA of these tissues did lose radioactivity. These results further confirm the metabolic stability of DNA and indicate that radioactive atoms incorporated into DNA of the liver and brain of embryos may remain fixed for the life of the animal.

---

### INTRODUCTION

The results of many studies in a variety of biological systems have pointed to the metabolic stability of deoxyribonucleic acid (DNA). In bacteria<sup>1,2</sup>, in mammalian cells in tissue culture<sup>3</sup>, and in the intact animal<sup>4-9</sup>, convincing evidence has been obtained that DNA is synthesized only for cell division and, once synthesized, is meta-

---

\* Affiliated with Sloan-Kettering Institute for Cancer Research.