

Abb. 2. – Totaler Nikotingehalt der Tabakpflanze und Eiweißgehalt der Wurzel. Abszisse: Alter der Pflanzen in Wochen. Ordinate: — Nikotingehalt in g je Pflanze, ---- Eiweißgehalt in g je Wurzel.

der ersten 6 Wochen das Mittel aus einer größeren Anzahl Pflanzen vorstellen, bilden die Werte von der 7. Woche an das Mittel von je drei Pflanzen. Für die Nikotinanalyse im wässrigen Destillat kam die kolorimetrische Methode mit Bromzyan zur Anwendung<sup>1</sup>. Der Eiweißgehalt der Wurzeln wurde nach BARNSTEIN bestimmt<sup>2</sup>.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 3 dargestellt. Bis zur 10. Woche erzeugt die Wurzel etwa gleichviel Gramm Eiweiß wie Nikotin. Weil Nikotin mit 2 N-Atomen je Molekül ungefähr den gleichen Stickstoffgehalt (17,28 % N) besitzt wie Eiweiß (16,0 %), würde dies besagen, daß in der Wurzel je synthetisierte Aminosäure ungefähr ein halbes Molekül Nikotin gebildet wird (?). Da das Nikotin aus dem Stoffwechsel ausscheidet, scheint die Tabakwurzel mit dem aus dem Boden aufge-

nommenen assimilierbaren Stickstoff außerordentlich wenig haushälterisch umzugehen, denn von je zwei N-Atomen wird nur eines im Wurzeleiweiß, das andere dagegen im Nikotin festgelegt! Die Eiweißsynthese im Stengel und in den jungen Blättern ist dabei nicht berücksichtigt; jene verläuft nach unseren heutigen Kenntnissen ohne Beziehung zum Nikotinstoffwechsel.

Um die 12. Woche schickt sich die Tabakpflanze zum Blühen an. Der Eiweißaufbau in der Wurzel tritt dann hinter der Nikotinbildung zurück. Zur Zeit der Samenreife durchlaufen beide Größen ein Maximum und fallen dann mit dem Absterben der Pflanze rasch zurück.

Der festgestellte Parallelverlauf des Nikotingehaltes und der Eiweißsynthese in der Wurzel könnte eine Zufallserscheinung der untersuchten Sorte *Paesana* sein. Es wurde daher in der Literatur nach einer Bestätigung unseres Befundes gesucht. Aus den Analysentabellen von VLADESCU<sup>1</sup> kann tatsächlich ein ähnliches Verhalten einer anderen Tabaksorte abgelesen werden. Leider ist in jenen Tabellen das Trockengewicht als Bezugsgröße gewählt, und das Jugendstadium ist nicht untersucht worden. Da indessen das Gewicht der Versuchspflanzen und deren Wurzeln angegeben ist, kann der Nikotingehalt je Pflanze und der Eiweißgehalt je Wurzel berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. Wie bei unseren Analysen ergibt sich bei blühreifem bzw. pflückreifem Tabak ein ähnliches Überwiegen des Nikotingehaltes über den Gehalt an Wurzeleiweiß. Ferner ist eine analoge Zunahme beider Komponenten bis zur Samenreife festzustellen, wobei der Nikotingehalt steil ansteigt. Zur Zeit der Frucht reife durchlaufen ebenfalls beide Kurven ein Maximum und fallen dann zurück.

Weitere Untersuchungen müssen abklären, ob der gefundenen Beziehung zwischen totalem Nikotingehalt und Wurzeleiweißgehalt der Tabakpflanze wirklich eine stoffwechselphysiologische Koppelung oder nur zufällige Parallelscheinungen zugrunde liegen.

H. SCHMID und M. SERRANO

Pflanzenphysiologisches Institut der ETH. Zürich, den 31. März 1948.

#### Summary

During germination the tobacco seedling produces nicotine from proteins accumulated in the seed. Later on the nicotine formation of the growing tobacco plant is dependent on the protein synthesis in its root. The comparison of the protein production by the tobacco root with the nicotine content of the whole plant shows an interesting parallelism.

<sup>1</sup> A. I. SMIRNOW, *Tabulae biologicae* 18, 86 (1940).

#### Experimenteller Beitrag zur Frage der Mitochondrienfunktion

Obschon die als Mitochondrien, Chondriokonten, Plastosomen usw. bezeichneten Protoplasmaelemente schon seit über 50 Jahren bekannt sind, ist man bezüglich ihrer funktionellen Bedeutung über reine Mutmaßungen nicht hinausgekommen. Neben ihrer Kleinheit und schweren färbereichen Darstellung ist daran in erster Linie ihre Empfindlichkeit gegenüber der Fixation und postmortalen Einflüssen schuld. Im Phasenmikroskop (PM) steht uns heute ein Instrument zur Verfügung, vermittle dessen die Zellelemente *in vivo* ohne vorgängige Färbung und Schrumpfung studiert werden können. —

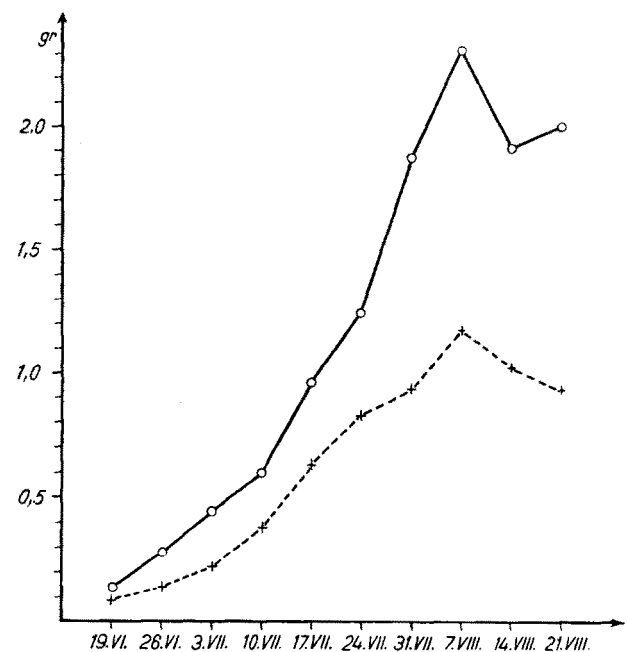


Abb. 3. – Totaler Nikotingehalt der Tabakpflanze und Eiweißgehalt der Wurzel nach VLADESCU. Abszisse: Zeitintervalle in Wochen. Ordinate: — Nikotingehalt in g je Pflanze, ---- Eiweißgehalt in g je Wurzel.

<sup>1</sup> E. WERLE und H. W. BECKER, *Biochem. Z.* 313, 182 (1942); s. auch: H. SCHMID, l.c.

<sup>2</sup> H. BRÜCKNER, *Die Biochemie des Tabaks* (Berlin 1936), p. 364.

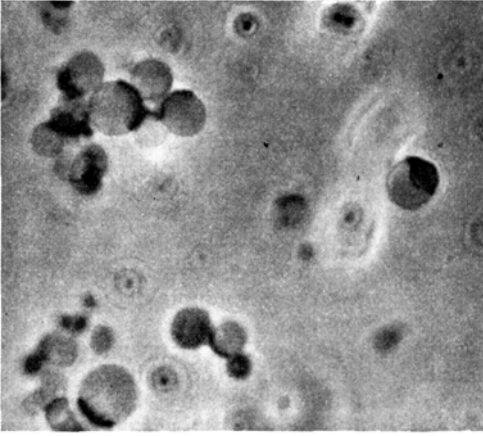


Abb. 1. Frei schwimmende Mitochondrien aus zerstörten Nierentubuli. Mitochondrionmembran bläschenförmig vom (schwarz erscheinenden) Körper abgehoben. PM ungefärbt, 1400 mal.

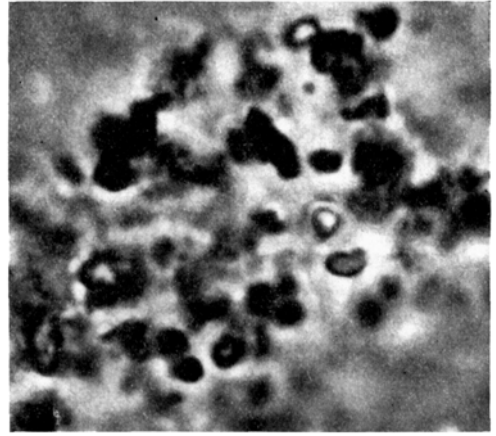


Abb. 2. Massenhaft unregelmäßig geformte, fast kristallartige Gebilde in einer Nierenzelle der Maus, 12 Stunden nach intraperitonealer Eiweißinjektion. PM ungefärbt, 2000 mal.

Über einige Einzelbeobachtungen und die Technik der Versuche haben wir an andern Orten berichtet<sup>1</sup>.

a) *Die trübe Schwellung.* In der pathologischen Anatomie versteht man darunter eine Zellveränderung, welche bei zahlreichen Allgemeininfekten und Vergiftungen, besonders in den Nierentubuli gefunden wird.

Zerquetscht man lebensfrische Zellen von Nierentubuli und schwimmt die Fragmente in molarer Rohrzuckerlösung auf, so sind die Mitochondrien im PM als frei schwimmende, dunkle Stäbchen erkennbar. Die gleiche Form zeigen sie auch in intakten, frischen Nierenzellen und in Zellkulturen<sup>2</sup>, und zwar sowohl im PM als auch im gefärbten Schnitt.

Verwendet man jedoch Tyrode-, Ringer- oder einfach physiologische Kochsalzlösung als Suspensionsmedium, so nehmen die Mitochondrien in intakten Zellen schon nach wenigen Sekunden die Form kleiner Granula an, welche im weiteren Verlauf anschwellen. Dieselbe Formumwandlung zeigen die Mitochondrien in überalterten Zellkulturen (4–6 Tage) und bei der postmortalen Autolyse. Die frei in den erwähnten Medien schwimmenden Mitochondrien lassen dabei erkennen, daß sich die bisher nicht sichtbare Membran des Mitochondrions vom Körper bläschenförmig abgehoben hat. Der Inhalt dieses Bläschens ist wesentlich heller als der eigentliche Mitochondrionkörper (Abb. 1). – Auch im hypertonen Milieu (molares NaCl) findet sich nach anfänglicher Schrumpfung diese Bläschenform, noch viel deutlicher ist sie aber im hypotonen Medium (dest. H<sub>2</sub>O usw.). Die Schwellung ist in diesen beiden Medien reversibel, wenn isotone Lösung dazu gebracht wird. – Nach Kenntnis dieser Befunde ist es uns auch gelungen, die bläschenförmig geschwollenen Mitochondrien auch im gefärbten histologischen Schnitt zu erkennen.

Die trübe Schwellung scheint demnach im wesentlichen auf einer Mitochondrienschwellung zu beruhen. Die künstliche Aufhellung trüb geschwollener Zellen durch verdünnte Essigsäure ist auf die Präzipitation des Bläscheninhaltes an der Mitochondrionmembran zurückzuführen, im Bläschen selbst bleibt nur die klare Flüssigkeit zurück.

Die Vergrößerung der Mitochondrien bei trüber Schwellung kann nach dem oben Gesagten durch reine Osmose (Angebot verdünnter Gewebsflüssigkeit usw.),

durch Störung der Membranpermeabilität (hypertonisches NaCl usw.) oder durch Autolyse bedingt sein.

b) *Speicherfunktion.* Werden einer Maus 2 cm<sup>3</sup> Hühnereiweiß intraperitoneal injiziert, so erscheinen nach einigen Stunden grobe Tropfen in den Zellen der Nierentubuli (OLIVER<sup>1</sup>). Im Schnitt ergeben sie positive Fibrinfärbung, im PM sind sie stark glänzend und etwas unregelmäßig strukturiert (Abb. 2). Untersucht man eine Nierenzellaufschwemmung schon 30 Minuten nach der Eiweißinjektion und wartet, bis die frei schwimmenden Mitochondrien bläschenförmig sind, so lassen einige Mitochondrien im Bereich ihres Körpers eine erneute Anschwellung erkennen. Dieselbe ist in dieser Phase dunkel, später hellt sie sich jedoch auf und wird stark lichtbrechend (Abb. 3). Schließlich erscheint der ganze Mitochondrienkörper als glänzende, unregelmäßig konturierte Kugel.

Derselbe Vorgang, allerdings zeitlich stark verzögert, ist nach massiver Injektion von Trypanblau in die Bauchhöhle zu beobachten, doch sind die glänzenden Gebilde nunmehr tiefblau gefärbt. – Gibt man zu einer Fibroblastenkultur Neutralrot in starker Verdünnung, so schwellen die Mitochondrien ebenfalls und werden dunkelrot.

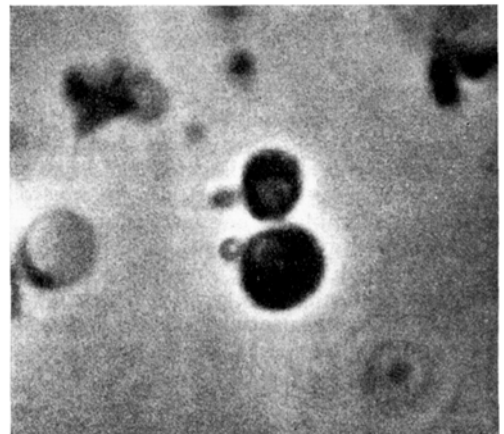


Abb. 3. Zwei frei schwimmende Mitochondrien von Nierenzellen einer Maus, 2 Stunden nach Eiweißinjektion. Die Mitochondrien sind im ganzen auffällig dunkel und enthalten je einen unregelmäßig geformten, glänzenden Körper. PM ungefärbt, 2000 mal.

<sup>1</sup> J. OLIVER und E. M. LUND, J. Exp. Med. 57, 435 (1933).

<sup>1</sup> H. U. ZOLLINGER, erscheint in: Am. J. Path.; ferner Schweiz. Z. Path. 11, 276 (1948); Mikroskopie (Wien) 3, 1 (1948).

<sup>2</sup> H. U. ZOLLINGER, Mikroskopie (Wien) 3, 1 (1948).

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß den Mitochondrien neben der oben erwähnten Aufsaugeneigenschaft für Flüssigkeit auch eine gewisse Speicherfunktion innewohnt. Man weiß ja, daß bei der Vitalfärbung neben der Speicherung auch eine, wenn auch bescheidene Schädigung der Zellen entsteht, die ihrerseits zur Kombination von Farbstoffspeicherung mit Eiweißakkumulation in den Mitochondrien führt. So entsteht das Doppelbild von Eiweiß- und Farbstoffspeicherung. H. U. ZOLLINGER

Pathologisches Institut der Universität Zürich, den 7. April 1948.

#### Summary

In the phase microscope it can be seen that cloudy swelling is the consequence of an enlargement of the mitochondria, whereby the membrane of the mitochondria is detached from the body of the mitochondrion. An increased water intake seems to be the reason of this phenomenon.

The intraperitoneal injection of hen egg albumen is followed after several hours by an accumulation of hyaline droplets in the protoplasm of the renal tubule cells. The PM reveals that this foreign protein is stored within the mitochondria, which are converted into brilliant granules. The same is true for the accumulation of vital dyes in kidney tubule cells, but in this case there is a combination of the dye with protein deriving from a slight lesion of the cells.

### Comportamento delle fosfatasi alcaline all'azione di alcuni veleni carioclastici

*Iprite*<sup>1</sup>. Da nostre esperienze con iprite a dosi alte (concentrazione  $6 \cdot 10^{-3}$  M) su mitosi embrionali di *Aselelus aquaticus*, abbiamo visto che essa agisce come veleno carioclastico, altera cioè profondamente il processo senza però avere una vera e propria azione di blocco metafase, tipica della colchicina.

Gli effetti si possono descrivere così: dalla profase alla metafase la mitosi appare indisturbata, dalla metafase alla telofase i nuclei sono profondamente alterati e i cromosomi, pur senza perdere la loro individualità, appaiono impastati. Quando le cellule vanno a morte mostrano nei nuclei grossi blocchi cromatici contratti, che derivano dai cromosomi. Tutto appare quindi come se la cromatina del nucleo non si possa disciogliere, dopo la telofase.

Questo fatto e l'osservazione che l'azione avvelenante più spiccata sembra entrare in giuoco quando inizia il processo di degradazione dell'acido timonucleico, poteva far supporre che fosse alterato il processo di defosforilizzazione, che presiede alla scissione degli acidi nucleici. Tale azione poteva essere dovuta a inibizione o distruzione degli enzimi implicati in questo processo, cioè delle fosfatasi. Abbiamo quindi provato l'azione dell'iprite su gonadi di Cimotoidi. Abbiamo usato due metodi: uno, quello di trattare per 15 min. ovari già fissati e sezionati con la soluzione acquosa satura di iprite (concentrazione  $6 \cdot 10^{-3}$  M), l'altro di esporre la gonade viva *in toto*, per 15 min., appena estratta dall'animale, e fissarla poi per la reazione di Gomori.

Col primo metodo abbiamo ottenuto inibizione totale delle monofosfatasi, eccetto che nel nucleolo, che appariva poco o nulla alterato. Col secondo metodo abbiamo potuto notare un'azione graduale, dovuta al fatto che l'iprite agiva con diversa intensità nei diversi strati.

Negli strati esterni sono alterati citoplasma, nucleo e molto leggermente anche il nucleolo. Man mano che si procede verso l'interno del preparato, la reazione riappare prima nel nucleo e poi anche nel citoplasma. È interessante notare che le fosfatasi del nucleolo anche degli strati più esterni non sono mai totalmente alterate.

A parte quindi il diverso potere di penetrazione dell'iprite, v'è una diversa resistenza delle fosfatasi proprie delle varie strutture della cellula.

L'inibizione è stata provata anche sulle difosfatasi, seguendo il primo metodo, cioè il trattamento delle sezioni; anche in questo caso è minore nel nucleolo che nel nucleo.

*Sali di mercurio*. È noto<sup>1</sup> che alcuni sali di mercurio e principalmente il nitrato, in concentrazioni 0,001 M, inferiori cioè ai limiti di fissazione, hanno sulle mitosi azione di tipo colchicinico e diminuiscono la colorabilità della eucromatina.

Abbiamo quindi esaminato l'azione di tale sale sulle fosfatasi, trattando sezioni con una sua soluzione per cinque ore e mezzo. La reazione delle fosfatasi è stata interamente distrutta, eccetto che nel nucleolo. Azione cioè del tutto simile a quella dell'iprite.

*Conclusioni*. Le fosfatasi alcaline sono inattivate da alcuni veleni carioclastici, iprite e sali di mercurio. La loro inibizione è diversa a seconda che appartengano al nucleo o al citoplasma. Riteniamo pertanto probabile che l'azione carioclastica di detti veleni sia almeno in parte imputabile a distruzione di fosfatasi.

Quanto alla resistenza delle fosfatasi nucleolari, noi poniamo l'ipotesi che esse, pur essendo del tipo di quelle citoplasmatiche e nucleari, ne differiscano, data la loro maggiore resistenza e attività, per un numero diverso di gruppi ad attività enzimatica, che sarebbero insensibili o avrebbero un bassissimo fattore di competizione con l'iprite. Solo ulteriori ricerche chimiche potranno chiarire questo punto.

Le nostre esperienze possono anche trovar ragione del comportamento all'iprite delle cellule proliferative osservato da GILMAN<sup>2</sup>. Le cellule esposte all'iprite durante il periodo di mitosi subiscono profonde alterazioni: e ciò ci sembra una prova che le fosfatasi siano essenziali ai processi mitotici. Cellule esposte a tale azione durante il riposo, subiscono solo un ritardo all'entrata in mitosi. Noi supponiamo quindi che le mono e le difosfatasi nucleolari, non essendo attaccate dall'iprite, sopprimeranno il nucleo di quelle andate distrutte, e il ritardo della cellula ad entrare in mitosi indicherebbe il tempo necessario a tale trasformazione.

In conclusione, dunque, ci sembra di poter affermare:

1.° che l'azione carioclastica dell'iprite e dei sali di mercurio sia da imputarsi, almeno parzialmente, a distruzione di fosfatasi alcaline;

2.° che le mono e le difosfatasi alcaline nucleolari presentano qualche differenza da quelle nucleari e citoplasmatiche;

3.° che le fosfatasi alcaline sono indispensabili ai processi mitotici e meiotici.

G. MONTALENTI e M. DE NICOLA

Istituto di Genetica dell'Università di Napoli e Centro di Citologia Genetica del C.N.R., il 2 febbraio 1948.

#### Summary

The effect of an aqueous solution ( $6 \cdot 10^{-3}$  M) of mustard oil on phosphatases was tested in cymotoid oocytes by treatment either of fixed and sectioned

<sup>1</sup> Fornita dall'Ispettorato di Artiglieria del Ministero della Guerra, che vivamente ringraziamo.

<sup>1</sup> A. LEVAN, *Hereditas* 32 (1946).

<sup>2</sup> A. GILMAN e F. PHILIPS, *Science* 103, 409 (1946).