

Zusammenfassung

Die Wirkung von Aureomycin auf *in vitro* gezüchtete Bindegewebszellen wurde untersucht. In einer Konzentration von 1 mg/ml und in höheren Konzentrationen konnte eine starke Beeinflussung der Mitose beobachtet werden. Die Rekonstruktionsphase verlängert sich unter gleichzeitiger Verminderung der Prophase. Bei stärkeren Konzentrationen sind die Zellen nicht imstande, die Mitosis zu beenden, so daß in den Kulturen viele 2-3-nukleäre Zellen entstehen. Bis zur Konzentration von 2 mg/ml sind alle diese Beschädigungen reversibel.

The Utilization of the Branched Chain of Isobutyric Acid Studied with C^{14}

Recent work has shown that isocaproic and isobutyric acids are degraded *in vitro* by kidney or liver enzyme preparations following the classic scheme of β -oxidation. This has been accomplished by manometric measurements of oxygen uptake² and by counter-current distribution separation of the reaction products³. A mechanism for the formation of propionic acid from isobutyric acid has been proposed³. On the other hand, COON and GURIN⁴ have reported that leucine is first degraded to isovaleric acid and then β -oxidized to acetic acid and a 3-carbon fragment. It seemed of interest to investigate the behavior of these compounds *in vivo* by the application of radioactive tracer techniques. This paper is a report on experiments carried out with carboxyl- and methyl-labeled isobutyric acid.

Experimental: Sodium isobutyrate-1- C^{14} was prepared by the reaction of isopropyl-magnesium bromide with $C^{14}O_2$ following the directions of CALVIN and coworkers⁵ for the preparation of acetic acid-1- C^{14} . The sodium isobutyrate-3- C^{14} was prepared in a similar manner using methyl-labeled isopropyl bromide and inactive CO_2 . The specific activity of the sodium isobutyrate-1- C^{14} was 1.72 μ c/mg, and that of the sodium isobutyrate-3- C^{14} was 1.50 μ c/mg. The yield for the carboxyl-labeled material was 97.5% based on the radioactive barium carbonate employed⁶. The yield for the methyl-labeled material was 48% based on the isopropyl bromide. The preparations were carried out on a 20 mmole scale.

The sodium salt of the acid, ca. 0.075 mg/g body weight, was injected intraperitoneally into a 200 g (Curtis-Dunning strain) rat that had been fasted for twenty-four hours previously. The animal was immediately placed in a metabolism cage, and the expired carbon dioxide, feces and urine collected. This carbon dioxide was collected at specified time intervals in 1 N sodium hydroxide and converted to barium carbonate. The specific activity of the barium carbonate was determined according to the method of YANKWICH *et al.*⁷. Geiger-Müller or "Nucleometer" (a windowless proportional counter) counters were used, depending on the specific activities being measured.

After five hours the animal was sacrificed. The liver was removed and ground in a glass mortar with sand until very finely divided. The ground mass was fractionated to obtain the total lipid, amino acid and protein, and glycogen.

¹ The work described in this paper was sponsored by the Atomic Energy Commission.

² A. L. GRAFFIN and D. E. GREEN, J. Biol. Chem. 176, 95 (1948).

³ W. A. ATCHLEY, J. Biol. Chem. 176, 123 (1948).

⁴ M. J. COON and S. GURIN, J. Biol. Chem. 180, 1159 (1949).

⁵ M. CALVIN, C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT, and P. E. YANKWICH, *Isotopic Carbon* (John Wiley and Sons, Inc., New York, 1949).

⁶ One μ c = 2.20×10^6 dis/min. The counters used were calibrated using accurately standardized barium carbonate prepared by the Oak Ridge National Laboratories. The efficiency of the counters used was about 5%.

⁷ P. E. YANKWICH, Science 107, 681 (1948). – P. E. YANKWICH and J. W. WEIGL, Science 107, 651 (1948).

Discussion: The results of these experiments are summarized in the accompanying figure and table. The curves for the rate of elimination of C^{14} as $C^{14}O_2$ are shown in Fig. 1. The amount eliminated after five hours approaches a value of 80–85% for the carboxyl-labeled compound and 45–50% for the methyl-labeled compound. In the case of the carboxyl-labeled isobutyrate, the final amount and the general shape of curve A is similar to the curves observed by JONES and coworkers¹ for the straight chain fatty acids. Based upon the amount of activity of the isobutyrate injected, the ratio of the specific activities of the excreted $C^{14}O_2$ should be 1.82. We see from Table I that the ratio is 1.76.

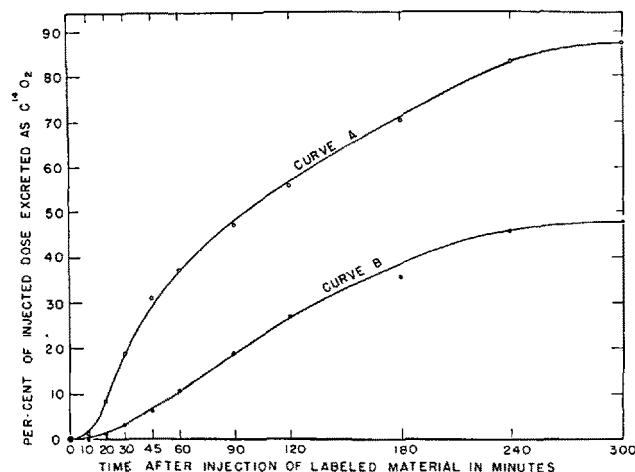


Fig. 1. – Rate of Elimination of C^{14} as $C^{14}O_2$.

There is, however, a definite difference in the initial rates of excretion of labeled carbon dioxide in the breath of the animals injected with sodium isobutyrate-1- C^{14} and sodium isobutyrate-3- C^{14} , that of the animal injected with the isobutyrate-1- C^{14} being the higher.

The difference in these rates together with the amount of radioactivity incorporated into the fraction of the liver leads us to believe that the isobutyrate is degraded to CO_2 and a 3-carbon fragment. This degradation may proceed in either of two ways. The first involves a direct decarboxylation to CO_2 and a 3-carbon fragment, in this case acetone. The second involves β -oxidation to a malonic acid derivative followed by decarboxylation to give CO_2 and a 3-carbon fragment, propionic acid.

If the latter were the major reaction, the propionic acid formed from the carboxyl-labeled isobutyrate would have one-half the activity of that formed from the methyl-labeled material, since it has been shown² that propionate is a direct precursor of liver glycogen. The glycogen formed in the liver of the animal given the carboxyl-labeled isobutyrate should have one-half the activity of that from the animal given the methyl-labeled isobutyrate. From the data in Table I we see that the reverse is true.

Assuming direct decarboxylation, all $C^{14}O_2$ excreted in the breath of the animal injected with methyl-labeled isobutyrate would result from further oxidation of the 3-carbon fragment. Since acetone is a symmetrical molecule, half of the CO_2 would be expected to show radioactivity. Actually, 87% of the radioactivity of the carboxyl-labeled isobutyrate and 47% of the methyl-

¹ H. B. JONES, personal communication.

² J. M. BUCHANAN, A. B. HASTINGS, and F. B. NESBETT, J. Biol. Chem. 150, 413 (1943).

Table I

¹⁴C Content of Tissues and Liver Fractions of Rats Injected with Sodium Isobutyrate-1-¹⁴C and Sodium Isobutyrate-3-¹⁴C

Fraction	Compound Injected*			
	Sodium Isobutyrate-1- ¹⁴ C		Sodium Isobutyrate-3- ¹⁴ C	
	Specific Activity dis/min/mg dry tissue	% of Injected Dose	Specific Activity dis/min/mg dry tissue	% of Injected Dose
Breath	3700	87	2100	47
Urine	10170	1.48	3350	0.25
Total lipid of liver	186	0.11	960	0.4
Total fatty acids of liver	—**	—**	650	0.3
Non-saponifiable	—**	—**	650	0.03
Liver protein	110	0.32	562	1.41
Liver glycogen	926	0.65	300	0.07

* These results are the average of three rats for each compound. Individuals did not vary more than 5% from the mean.

** The specific activity was so low as to make these values insignificant.

labeled isobutyrate was excreted in the breath. We assume, then, that the remainder, 13% and 3%, respectively, goes to the metabolic pool. It has been shown that CO₂ is a precursor of both liver glycogen¹ and urea². Since the ratio of the C¹⁴O₂ available in these two cases is 13:3 or 4:3, we should expect that the ratio of the specific activities of the liver glycogen and the urea would be about the same. We see from the data in Table I that the ratios are 3.09 and 3.03, respectively. The deviation of the value of 3.09 from the theoretical value may be attributed to the incorporation of radioactive pyruvate (see below) into the liver glycogen. We cannot, at present, explain the slight deviation of the value for urea from the theoretical.

To carry the idea of direct decarboxylation further, the acetone formed from carboxyl-labeled isobutyrate would have no activity, whereas that from the methyl-labeled isobutyrate would be labeled in the methyl group. This compound is further oxidized through pyruvate (carboxyl and β-labeled) to acetic acid and CO₂. One-half the activity is now in the acetic acid and

one-half is in the CO₂ (see above). As this C¹⁴O₂ is produced, we get the delayed rise in the curve for the excretion of C¹⁴O₂ in the breath of the animal injected with the methyl-labeled isobutyrate. One-half of the acetic formed in the animal given the methyl-labeled isobutyrate was itself labeled in the methyl group. This accounts for the activity of the fatty acids¹ and sterols² from the liver of this animal, whereas these components from the liver of the animal given the carboxyl-labeled isobutyrate contained an insignificant amount. The same reasoning leads to an explanation of the radioactivity of the liver protein. GREENBERG and WINNICK³ found that the protein of animals fed methyl- or carboxyl-labeled acetic acid contained more activity than those fed radioactive bicarbonate. The difference in radioactivity which we report is greater than reported by these investigators, but this can again be attributed to the incorporation of pyruvate⁴.

Based upon the above discussion, we postulate the following reaction scheme:

¹ J.M.BUCHANAN, A.B.HASTINGS, and F.B.NESBETT, J. Biol. Chem. 150, 413 (1943). — A.K.SOLOMON, B.VENNESLAND, F.W.KLEMPERER, J.M.BUCHANAN, and A.B.HASTINGS, J. Biol. Chem. 140, 171 (1941). — B.VENNESLAND, A.K.SOLOMON, J.M.BUCHANAN, and A.B.HASTINGS, J. Biol. Chem. 142, 379 (1942).

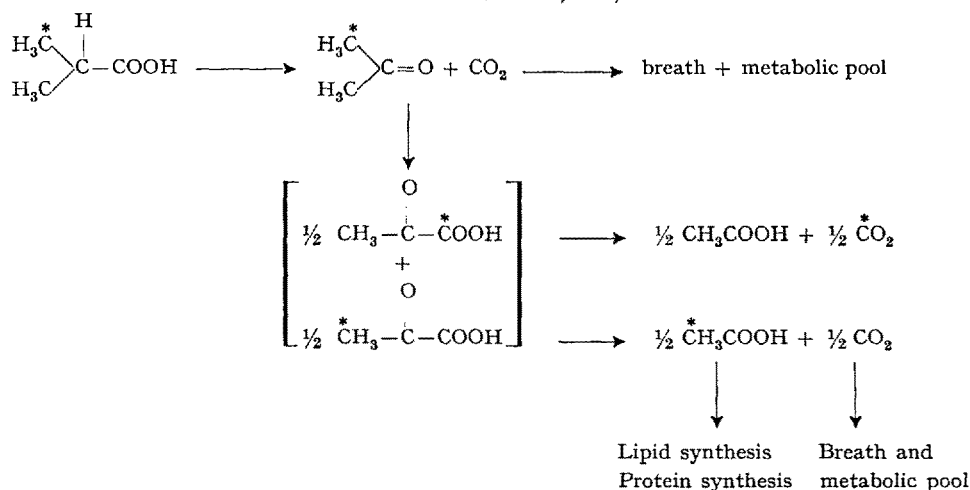
² D.RITTENBERG and H.WAELSCH, J. Biol. Chem. 136, 799 (1940). — E.A.EVANS, JR. and L.SLOTIN, J. Biol. Chem. 136, 805 (1940).

¹ D.RITTENBERG and K.BLOCH, J. Biol. Chem. 160, 417 (1945). — K.BLOCH, Physiol. Rev. 27, 574 (1947).

² K.BLOCH, Physiol. Rev. 27, 574 (1947). — E.BOREK and D.RITTENBERG, J. Biol. Chem. 179, 843 (1949).

³ D.M.GREENBERG and T.WINNICK, Arch. Biochem. 21, 166 (1949).

⁴ E.BALDWIN, *Dynamic Aspects of Biochemistry* (MacMillan Co., New York, 1947).



Acknowledgement: We wish to express our thanks to Prof. MELVIN CALVIN for his kind interest in this work.

IRVING GRAY¹, PATRICIA ADAMS, and HEINRICH HAUPTMANN²

Radiation Laboratory and Department of Chemistry, University of California, Berkeley, May 15, 1950.

Zusammenfassung

Auf Grund von Versuchen über den Metabolismus der carboxyl- und methylsignierten Isobuttersäure im Stoffwechsel der Ratte wird ein Abbaumechanismus für diese Verbindung vorgeschlagen.

¹ Major, Medical Service Corps, United States Army.

² Rockefeller Fellow. While on leave from the Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Azione dei raggi X sul metabolismo degli acidi nucleinici in cellule proliferative e cellule secretrici

Numerosissime sono le ricerche che da vari anni si sono svolte sull'azione dei raggi X sulla cellula vivente. In particolare sono state descritte le anomalie della mitosi e della meiosi e le alterazioni dei cromosomi.

Le indagini sono state condotte da un punto di vista principalmente morfologico, mentre il lato chimico è stato completamente trascurato. Solo il MITCHELL¹ trovò per effetto dell'irradiazione, un accumulo di ribonucleotidi nel citoplasma, dovuto, secondo la sua interpretazione, a mancata sintesi di acido desossiribonucleico (DN) a spese dell'acido ribonucleico (RN).

La presente ricerca ha avuto lo scopo di studiare non tanto le alterazioni morfologiche del nucleo, quanto quelle del metabolismo nucleinico, che è alla base della riproduzione cellulare; e contemporaneamente di indagare le modificazioni che subiscono cellule secretrici non proliferative. Per tale ragione si è scelto come materiale il testicolo di *Asellus aquaticus*, che presenta il duplice vantaggio di essere conosciuto nel suo metabolismo nucleinico durante la spermatogenesi² e di essere fornito di cellule follicolari di rivestimento, delegate a secernere acido RN, e il cui nucleo poliploide presenta variazioni caratteristiche e bene identificabili, in relazione al ciclo di secrezione. In questo materiale si è quindi potuto studiare contemporaneamente l'azione dei raggi X su due tipi di cellule molto diverse, per struttura e per funzione.

I risultati generali indicano che le cellule irradiate subiscono profondi cambiamenti nel contenuto di acidi nucleinici; la sintesi dell'acido DN si arresta e questo ultimo si trasforma lentamente in acido RN, che la cellula successivamente espelle fin quando, rimasta completamente vuota di acidi DN e RN, muore. Tale trasformazione, benché con modalità lievemente diverse, avviene in entrambi i tipi di cellule studiate, proliferative e secretrici.

Tecnica e osservazioni. Gli animali, narcotizzati con CO₂, venivano irradiati con una unica applicazione, con dosi variabili da 250 r a 5000 r, dati con apparecchio Gilardoni, senza filtro a 1030 r/minuto.

Le gonadi venivano prelevate in tempi successivi a cominciare dalla ventiquattresima ora ed esaminate sia in sezione sia in preparati per schiacciamento con le seguenti colorazioni: FEULGEN, UNNA-PAPPENHEIM (secondo BRACHET), ematossilina ferrica, carminio acetico.

L'effetto ottenuto con le varie dosi è sostanzialmente lo stesso, solo con le dosi più alte esso è più intenso ed evidente e i nuclei di tutte le cellule si trasformano in breve in acido RN. Il meccanismo di azione appare identico e verrà descritto come unico.

Nella gonade si assiste ad una rapida scomparsa delle cellule germinali, mentre le cellule follicolari scompaiono

più lentamente. Dopo circa 63 giorni la gonade è ancora reperibile, benché il numero delle cellule sia ridottissimo.

Le spermatogonie appaiono a prima vista le meno colpite. Subito dopo l'irradiazione entrano ancora in mitosi, successivamente non sono più in grado di farlo. La mitosi appare normale fino alla metafase, dopo i cromosomi si contraggono e danno le caratteristiche figure della «stickiness». Il nucleo diviene picnotico e si trasforma lentamente in acido RN, che passa gradualmente nel citoplasma e di qui all'esterno. Le cellule goniali colpite durante la profase precoce si arrestano in metafase e degenerano; se colpite in metafase giungono fino alla anafase o telofase e poi degenerano come descritto precedentemente (fig. 2). Dopo i primi giorni le gonie perdono la capacità di entrare in mitosi e si impoveriscono gradualmente di acido DN: la cromatina appare prima positiva solo per l'acido RN e poi sprovvista di entrambi gli acidi nucleinici.

Gli spermatociti entrano in meiosi solo nei primi due o tre giorni dopo l'irradiazione e appaiono piuttosto normali negli stadi di leptotene, zigotene, pachitene e diplotene. Nei giorni seguenti le alterazioni si manifestano già in questi stadi. Comunque dalla diacinesi inizia la «stickiness» e la degenerazione, analogamente a come già descritto, con la trasformazione di tutta la cromatina in acido RN.

Gli spermatidi tondi appaiono piuttosto anormali soprattutto nella forma, spesso a falce. Con le dosi basse si sono trovati pieni di granuli di acido RN e DN, il che fa pensare che forse provenivano da cellule colpite in telofase o all'inizio della loro trasformazione in spermatidi (fig. 5).

Gli spermatozoi rappresentano lo stadio apparentemente più colpito. Già dopo 24 ore gli spermatozoi immaturi, a bastoncello, presentano strozzamenti, rigonfiamenti, grosse vacuole e diminuita colorabilità sia in diverse zone dello stesso elemento sia in un intero elemento (fig. 4). Si trasformano poi lentamente in acido RN. Gli spermatozoi maturi con coda, si trasformano anch'essi lentamente in acido RN.

Le cellule di rivestimento presentano un ciclo di secrezione con quattro fasi nucleari caratteristiche e seriabili nel tempo perché corrispondono strettamente alle diverse fasi della spermatogenesi. Le fasi sono: una di elaborazione, una di secrezione e due di riposo. Dopo l'azione dei raggi X le cellule continuano il loro ciclo, non vengono cioè bloccate in qualche stadio come le cellule proliferative. Esse però si impoveriscono gradualmente di acido DN e iniziano una intensissima secrezione di acido RN in tutti gli stadi del loro ciclo (fig. 1), anche in quelli che, come struttura, corrispondono agli stadi di riposo (fig. 3 e 6). Nel periodo successivo oltre alla secrezione, si nota la trasformazione dell'intero nucleo in acido RN, che si frammenta in masserelle più piccole le quali vengono espulse. Le cellule continuano il loro ciclo e muoiono quando sono completamente prive di acidi nucleinici.

Discussione. Dai dati riportati è possibile concludere che l'azione dei raggi X consiste essenzialmente in una alterazione del metabolismo nucleinico: cioè una alterazione della sintesi di acido DN e dell'equilibrio acido DN-RN.

Si può pensare che l'irradiazione produce anzi tutto arresto di sintesi di acido DN: infatti le cellule irradiate in riposo, quando cioè deve avvenire la sintesi dei nuovi cromatidi, non entrano in mitosi oppure danno luogo a mitosi anormali, che si bloccano poi in metafase.

Oltre a questo effetto ne compare un'altro: trasformazione dell'acido DN in acido RN. Il fenomeno è gene-

¹ J. S. MITCHELL, Brit. J. Exp. Path. 23, 285 (1942).

² G. MONTALENTI, G. VITAGLIANO e M. DE NICOLA, Heredity, 475 (1950).