

to obtain some papers with the two spots separated. The arginine, lysine, histidine can with difficulty be demonstrated simultaneously in both systems of solvents used. In the butanol-acetic solvent the addition of NH_3 or HCN modifies the spot positions. With HCN it is possible to obtain the chromatograms in which three amino acids are identified, while with NH_3 lysine and arginine are in apposition. Histidine also has a distinguishable spot position regarding the other two amino acids in the chromatograms obtained with the phenol and collidine-lutidine.

Discussion and Conclusions: The comparison between the table listing the previous researches and our data on nuclei, isolated chromosomes and histone allowed us to make interesting comparisons. In all our fractions, under these conditions of hydrolysis, we have found the 14 amino acids already noted, with different frequency, by other authors. These 14 amino acids seem roughly to change in their reciprocal quantitative relations in the hydrolysates of different cases. Proline and tyrosine, as we have found in isolated chromosomes, cannot be dependent on nuclear membrane contamination because of the evidence of the spots. Moreover DAVIDSON and coll.¹, BLUMEL and coll.², and BRUNISH and coll.³, found proline and tyrosine in histone of rat and calf cells and in "residual protein" of calf thymus chromosomes. Besides, it should be noted that histidine was always found when using collidine-lutidine and phenol solvents.

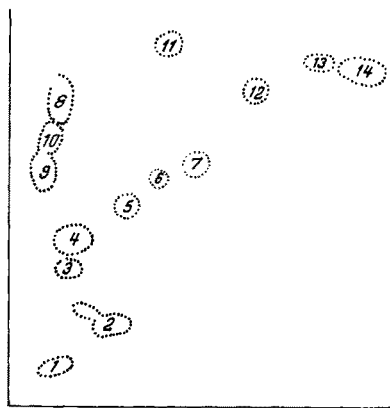


Fig. 2.—1 aspartic acid; 2 glutamic acid; 3 serine; 4 glycine; 5 threonine; 6 alanine; 7 tyrosine; 8 histidine; 9 lysine; 10 arginine; 11 proline; 12 valine; 13 phenyl-alanine; 14 leucine.

Nuclei and isolated chromosomes of leukaemic cells and horse abscess have amino acids not unlike those of normal cells. Therefore it is concluded that these 14 amino acids are constantly present in the chromosomes of the species studied, both under normal and pathological conditions.

Further researches must be made in this direction; firstly to examine quantitatively the amino acids under different conditions and in different species, and secondly to produce a lesser degree of hydrolysis in order to study a higher plane of molecular organization. The possibility may be still considered that some amino acids contained in minimal quantity may not be revealed

by our methods, and that some amino acids may be destroyed during hydrolysis.

Further researches in this direction are being performed.

E. E. POLLI and A. BESTETTI

Institute of Clinical Medicine, University of Milan, April 4, 1952.

Riassunto

Gli Autori hanno compiuto l'analisi cromatografica degli idrolisati di nuclei, cromosomi isolati ed istone di cellule ematiche normali e patologiche. Vennero esaminati: eritrociti di pollo; leucociti (normali e da ascesso) di cavallo; leucociti umani normali; linfociti di leucemia linfatica e leucociti di leucemia mieloide.

I vari componenti cellulari ottenuti mediante il Waring blender e successive centrifugazioni differenziali; vennero idrolizzati con HCL . Con gli idrolisati vennero allestiti cromatogrammi bidimensionali in due sistemi di solventi; butanolo acetico e fenolo, fenolo e collidine-lutidina.

In tutti i cromatogrammi bidimensionali dei due sistemi di solventi si sono potuti mettere in evidenza 14 amino acidi (acido aspartico, acido glutammico, serina, glicina, treonina, alanina, prolina, valina, tirosina, leucina, fenil-alanina, arginina, lisina e istidina).

Quelques effets des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives sur des fragments nucléés et énucléés d'organismes unicellulaires

Nous avons décrit récemment¹ les effets exercés par les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives (dinitro-phénol, acide usnique) sur des amibes intactes et des œufs de Batraciens. Rappelons que, chez ces derniers, l'interruption du couplage entre les oxydations et les phosphorylations conduit à un enrichissement anormal des noyaux en acide ribonucléique. Ce même trouble du métabolisme des acides nucléiques se rencontre dans les hybrides létaux entre Batraciens¹ et dans des œufs de grenouille fécondés par des spermatozoïdes fortement irradiés, puis privés du noyau ovulaire (BRIGGS et ses collaborateurs²). Ces faits nous avaient amené à souligner les ressemblances étroites existant entre les effets cytochimiques produits par des altérations nucléaires d'une part, l'inhibition des phosphorylations oxydatives de l'autre; nous y avons vu un argument indirect en faveur de l'idée que le noyau interviendrait dans le couplage entre les oxydations et les phosphorylations³.

Il nous a paru utile de reprendre cette étude en l'étendant à des fragments nucléés et énucléés d'organismes unicellulaires (*Amoeba proteus* et *Acetabularia mediterranea*). Nous avons constaté, tout d'abord, que le dinitro-phénol (10^{-3} M) et l'usnate de Na (20 à 40 γ/cm^3) n'exercent pas d'effet appréciable sur la basophilie des deux types de fragments: comme nous l'avons montré précédemment⁴, l'énucléation provoque une diminution assez rapide de la teneur en acide ribonucléique des frag-

¹ J. N. DAVIDSON and R. A. LAWRIE, *Biochem. J.* 43, Proc. XXIX (1948).

² J. BLUMEL and H. Kirby, *Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.* 34, 561 (1948).

³ B. R. BRUNISH, D. L. FAIRLEY, and J. M. LUCK, *Nature* 168, 82 (1951).

¹ J. BRACHET, *Exper.* 7, 344 (1951).

² R. BRIGGS, E. U. GREEN et T. J. KING, *J. exper. Zool.* 116, 455 (1951).

³ J. BRACHET, *Exper.* 7, 344 (1951). — J. BRACHET, *Nature* 168, 205 (1951).

⁴ J. BRACHET, *Exper.* 6, 294 (1950). — N. LINET et J. BRACHET, *Bioch. Biophys. Acta* 7, 607 (1951).

ments énucléés, tandis qu'il ne se produit guère de changements à la suite de l'opération dans les moitiés nucléées. Cette évolution de l'acide ribonucléique n'est pas affectée par l'acide usnique et le dinitrophénol, qui se montrent donc incapables de provoquer, comme l'énucléation, une chute rapide de la teneur en acide ribonucléique du cytoplasme. Précisons encore que ces deux poisons se montrent nettement plus toxiques pour les fragments énucléés que pour les autres; cette même susceptibilité accrue du cytoplasme énucléé vis-à-vis de substances ajoutées au milieu de culture se retrouve d'ailleurs pour des corps aussi divers que le glucose (1%), l'urée (0,1%), l'acide zymonucléique (0,5 mg/cm³), l'acide adénylique et les codéshydrogénases I et II (ces dernières substances à la concentration 0,0005 M).

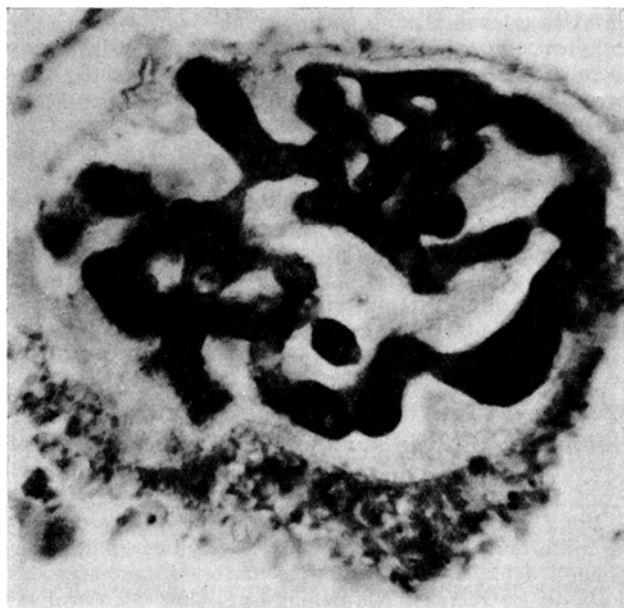


Fig. 1. Noyau d'une *Acetabularia* normale: nucléole très basophile, en forme de boudins.

Mais il n'en va plus de même si on s'adresse, cette fois, à l'acide adénosinetriphosphorique (A.T.P.), dont les effets sur des amibes entières ont déjà été analysés par KRISZAT¹ et par GOLDACRE et LORCH²: à la concentration 0,0005 M, l'A.T.P. tue les amibes en 2 à 3 jours et, dans la majorité de nos expériences, nous avons observé une survie meilleure des fragments énucléés. La toxicité relativement grande de l'A.T.P. ne nous a pas permis d'établir de façon certaine si cette substance empêche ou non la diminution de la basophilie dans les fragments énucléés; en tous cas, les fragments nucléés, qui se contractent et prennent déjà une forme sphérique en 1 à 2 h, ressemblent à s'y méprendre à des fragments énucléés tant en ce qui concerne leur aspect extérieur que leur colorabilité sur coupes.

Cet ensemble de constatations, tout en confirmant l'idée générale que le noyau doit intervenir dans les phosphorylations oxydatives, tend à indiquer que l'interprétation des faits est plus complexe que nous ne l'avions cru d'abord: il se pourrait, par exemple, que l'énucléation, au lieu d'empêcher la synthèse de l'A.T.P., ait pour effet d'entraver l'utilisation de cette substance ou d'altérer sa distribution dans le cytoplasme.

Passons maintenant au cas d'*Acetabularia mediterranea*: la régénération de fragments nucléés est inhibée, de façon pratiquement complète, par l'addition de dinitrophénol (10^{-4} à 10^{-5} M) ou d'usnate de Na (10 à 1 γ /cm³) au milieu de culture. Un pareil traitement provoque, en 1 à 3 semaines, une modification progressive dans la structure du nucléole, qui finit par prendre une forme sphérique tout en se vacuolisant de plus en plus (fig. 1 et 2). Les images que nous avons obtenues, surtout dans le cas de l'acide usnique, se superposent entièrement à celles publiées par STICH¹, qui a étudié les effets de l'obscurité prolongée sur le noyau de l'*Acetabularia* en voie de régénération. Il convient de noter, en outre, que l'acide usnique et le dinitrophénol n'agissent pas exclusivement sur le nucléole: le suc nucléaire des plantes qui ont été soumises à l'action de ces poisons se distingue par une richesse anormale en acide ribonucléique; le noyau de l'*Acetabularia* réagit donc aux inhibiteurs des phosphorylations oxydatives de la même manière que les œufs de Batraciens. Si l'on en juge par l'intensité de la basophilie et sous réserve de mesures quantitatives qui restent à faire, il se pourrait même que le cytoplasme des plantes traitées par les inhibiteurs que nous avons employés s'enrichisse lui aussi en acide ribonucléique. Une telle constatation n'a d'ailleurs rien d'in vraisemblable, puisque MIURA et ses collaborateurs² ont montré que l'acide usnique provoque une accumulation d'acide ribonucléique chez les Bactéries.

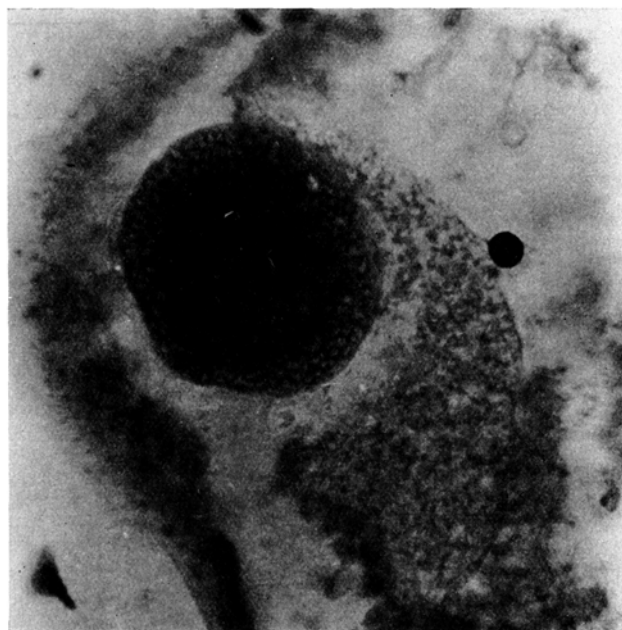


Fig. 2. Noyau d'une *Acetabularia* traitée pendant 15 jours par l'acide usnique (1γ /cm³): nucléole sphérique, spumeux; suc nucléaire basophile.

Quoiqu'il en soit, il ne fait pas de doute que la suppression du couplage existant normalement entre les oxydations et les phosphorylations, tout comme celle de la photosynthèse dans les expériences de STICH¹, exerce des effets profonds sur la structure et la composition chimique du noyau: les conditions énergétiques qui prévalent au sein du cytoplasme influent fortement sur la

¹ H. STICH, Z. Naturforsch. 6 b, 319 (1951).

² Y. MIURA et Y. NAKAMURA, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 1409 (1951). – Y. MIURA, Y. NAKAMURA et H. MATSUDAIRA, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 1577 (1951).

¹ G. KRISZAT, Arkiv Zool. 1, 81 (1949); Arkiv Zool. 2, 477 (1950).

² R. J. GOLDACRE et I. J. LORCH, Nature 166, 497 (1950).

morphologie et la distribution de l'acide ribonucléique dans le nucléole et le suc nucléaire.

J. BRACHET

Laboratoire de morphologie animale, Faculté des sciences de l'Université de Bruxelles, le 23 juin 1952.

Summary

The effects of dinitrophenol, usnic acid and A.T.P. on nucleated and non-nucleated halves of *Amoeba proteus* have been studied.

In regenerating nucleated halves of *Acetabularia mediterranea*, dinitrophenol and usnic acid induce deep changes in the morphology and chemical composition of the nucleus. It is concluded that the nucleus depends on energy production in the cytoplasm for the maintenance of both its structure and its composition.

Influence of Isonicotinic Acid Hydrazide (INH) and 1-Isonicotinyl-2-isopropyl Hydrazide (IIH) on Bacterial and Mammalian Enzymes¹

All basic antibiotics and synthetic basic antituberculous substances so far tested reduce the activity of bacterial diamine oxidase² and of a guanidine-splitting

enzyme present in *Mycobacterium smegmatis*¹. Since INH and IIH are bases, we investigated their possible influence upon bacterial diamine oxidase and guanidine deamidinase. In order to obtain some information about the mode of action of the two new antituberculous drugs on the organism of the host, the behaviour of the mammalian diamine oxidase and monoamine oxidase against INH and IIH was tested. Some typical results are presented in the following tables.

Experiments were carried out at 38°. All results, from which the blanks have been subtracted, are calculated in terms of micromoles per one hour (*Q*). Further experimental details can be obtained from previous publications². (See Tables I and II.)

As expected the two drugs inhibit diamine oxidase (putrescine) and guanidine deamidinase (agmatine) of *M. smegmatis*. Toward diamine oxidase INH is still measurably active at a concentration (4 µg per milliliter) which is within the therapeutical range. When cell-free preparations of guanidine deamidinase are exposed to higher concentrations of the drugs, again a decrease of enzyme activity is found. (See Table III.)

While streptomycin, viomycin, and neomycin are much less effective on the oxidative deamination of diamines by preparations of mammalian origin than by

¹ E. A. ZELLER, L. S. VAN ORDEN, and W. F. KIRCHHEIMER, *Feder. Proc.* 10, 273 (1951), 11, 316 (1952).

² E. A. ZELLER, C. A. OWEN, Jr., and A. G. KARLSON, *J. Biol. Chem.* 188, 623 (1951). – C. A. OWEN, A. G. KARLSON, and E. A. ZELLER, *J. Bact.* 62, 53 (1951). – E. A. ZELLER, L. S. VAN ORDEN, and W. F. KIRCHHEIMER, *Feder. Proc.* 10, 273 (1951); 11, 316 (1952). – E. A. ZELLER, *Oxidation of Amines*, in J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, vol. II (Academic Press, New York, 1951), p. 536.

Table I
Mycobacterium smegmatis

25 mg of wet packed bacteria (streptomycin-sensitive) are suspended in phosphate buffer at pH 7.1. Total volume: 2 ml; incubation: 6 h. Determination of ammonia (putrescine) with *Conway*-units and of the degradation of the guanidine group of agmatine with a modification of the procedure of DUBNOFF and BORSOOK¹.

Substrates	Inhibitor	<i>Q</i>	Inhibition
2·10 ⁻³ <i>M</i> putrescine	—	0.5 µMoles NH ₃	—
<i>M</i> putrescine	3·10 ⁻⁵ <i>M</i> INH	0.4	20%
<i>M</i> putrescine	3·10 ⁻⁵ <i>M</i> IIH	0.2	60%
2·10 ⁻³ <i>N</i> agmatine	—	0.5 µMoles guanidine	—
<i>N</i> agmatine	3·10 ⁻⁵ <i>M</i> INH	0.4 groups disappearing	20%
<i>N</i> agmatine	3·10 ⁻⁵ <i>M</i> IIH	0.4	20%

¹ J. W. DUBNOFF and H. BORSOOK, *J. Biol. Chem.* 138, 381 (1941).

Table II
Cell-free extract from *M. smegmatis*

Washed bacteria in aqueous suspension treated with 9 kilocycles-vibration for 1 h. Supernatant, obtained after centrifugation for 30 min with 10,000 g, contains 1.4 mg of nitrogen per ml. 0.1 ml of it is used in a total volume of 2 ml. Incubation with agmatine for 1 h at pH 7.1 (phosphate buffer).

Substrate	Inhibitor	<i>Q</i> Guanidine groups disappeared	Inhibition
2·10 ⁻³ <i>M</i> agmatine	—	2.4 µMoles	—
<i>M</i> agmatine	5·10 ⁻⁴ <i>M</i> INH	1.4	42%
<i>M</i> agmatine	5·10 ⁻⁴ <i>M</i> IIH	1.5	38%