

das Gerinnsel innerhalb 30 min vollständig, Kaninchenkammerwasser teilweise, bei den übrigen ist makroskopisch keine Lyse zu erkennen.

Es ist damit nachgewiesen, dass Kammerwasser von Mensch und verschiedenen Tieren ein fibrinolytisches Fermentsystem enthält, das sich gegenüber SK qualitativ gleich verhält wie das entsprechende Plasma. Es ist ferner wahrscheinlich, dass die aktuelle fibrinolytische Aktivität im Kammerwasser grösser ist als im Plasma.

A. FRANCESCHETTI und E. EICHENBERGER

Universitätsaugenklinik Genf und Forschungsinstitut Dr. A. Wander A.G., Bern, 25. November 1958.

Summary

In the aqueous humour of human subjects and of various animal species, a fibrinolytic system has been demonstrated which, as regards streptokinase, shows the same properties as the corresponding plasma. Presumably the actual fibrinolytic activity in the aqueous humour is greater than in the plasma.

The Incorporation of H^3 -Thymidine in Newly Differentiated Nuclei of Roots of *Vicia faba*

FRIEDKIN and WOOD¹ have shown that labelled thymidine is readily utilized for desoxyribose nucleic acid (DNA) synthesis, whereas labelled thymine is not, and it has been concluded from biochemical studies that labelled thymidine is incorporated only into the DNA^{2,3,4}. H^3 -thymidine has been used to investigate, by means of autoradiography, the mode of replication of chromosomes^{5,6}. The observations discussed here concern the incorporation of H^3 -thymidine into the DNA in nuclei of cells beginning to elongate in roots of *Vicia faba*.

¹ M. FRIEDKIN and H. WOOD, J. biol. Chem. 220, 639 (1956).

² P. REICHARD and B. ESTBORN, J. biol. Chem. 188, 839 (1951).

³ M. FRIEDKIN, D. TILSON, and D. ROBERTS, J. biol. Chem. 220, 627 (1956).

⁴ M. DOWNING and B. S. SCHWEIGERT, J. biol. Chem. 220, 521 (1956).

⁵ J. H. TAYLOR, P. S. WOODS, and W. L. HUGHES, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 43, 122 (1957).

⁶ L. F. LA COUR and S. R. PELC, Nature 182, 506 (1958).

Seedlings of *V. faba*, with lateral roots, were grown at a temperature of 20°C in separate containers in 30 ml of tap-water to which 25 μ c of H^3 -thymidine (supplied by Messrs. Schwartz Inc. New York) was added. After 12 h the roots were washed in water and the plants transferred to pure tap-water. Roots were fixed at 2, 4, 6, 12, and 24 h after the beginning of treatment and autoradiographs of sections and squash preparations were prepared by the stripping film technique.

A surprising feature of the incorporation of H^3 -thymidine in *Vicia* roots is the intensive incorporation that occurs in the nuclei of some cells beginning elongation (Fig. 1). Autoradiographs over these nuclei show a greater density than any of those over meristematic nuclei, except in a few apical cells adjacent to the root cap. In roots fixed 2 h after the beginning of treatment, this intense labelling is found in about 25% of the cells at a distance of 3 to 5 mm behind the 1.5 to 2 mm of meristem. It begins in cells at a distance of approximately 1.9 mm from the tip of the root (Fig. 2a and 2b), as is evident from roots fixed after 2, 4, and 6 h. Some heavily labelled nuclei occur, however, in diminishing frequency as far back as 9 to 10 mm after 6 h, the full length of the available sections.

The intense labelling is at first confined mainly to long columns of nuclei in the cortex, the most heavily labelled nuclei being those furthest from the meristem. Grain counts show an increase in labelling up to 6 h, then the number of grains per nucleus is stable, indicating that the incorporation of H^3 -thymidine continues in these nuclei during the first 4 to 6 h. The frequency of labelled nuclei also increase for some time, and after 12 and 24 h the nuclei first to become heavily labelled are found further back in the root, in zones about 15 mm and 30 mm respectively.

In addition to nuclei which are evenly and intensely labelled, a few are found in which labelling is confined to some parts of the nucleus (Fig. 3a and 3b). This pattern of labelling is usually not connected with nucleolar chromatin or heterochromatic regions.

In all samples of roots a few labelled nuclei occur in elongating cells of the vascular system, but generally only the large obviously polyploid nuclei are labelled.

With exposures curtailed to 4 days, it was possible to make grain counts in autoradiographs of squash preparations of roots fixed after 2 h from the start of treatment. On average about twice as many grains were found over the nuclei at 4–7 mm from the tip than over the most intensely labelled interphase nuclei of the meristem in the same root. These grain counts indicate that in the clon-

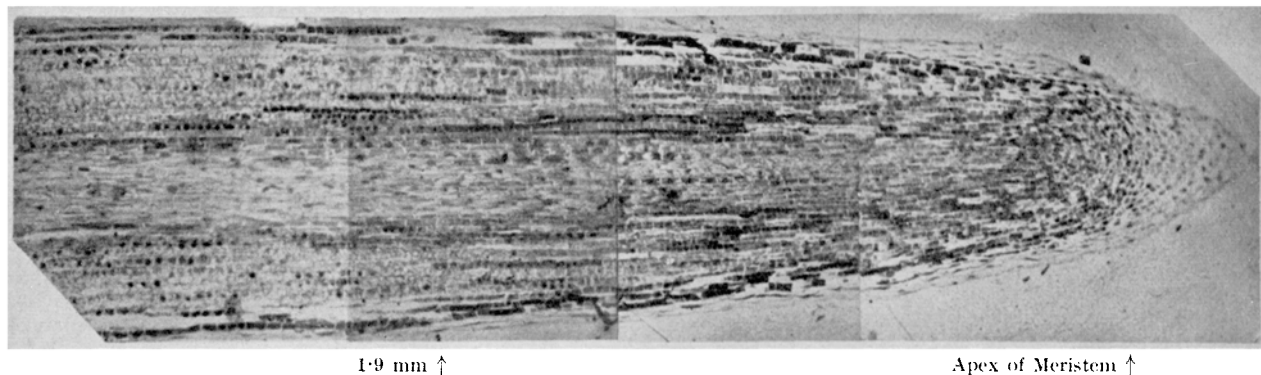


Fig. 1.—Incorporation of H^3 -Thymidine in a root of *Vicia faba*. Autoradiograph of a section, stained after photographic processing with Toluidine blue.

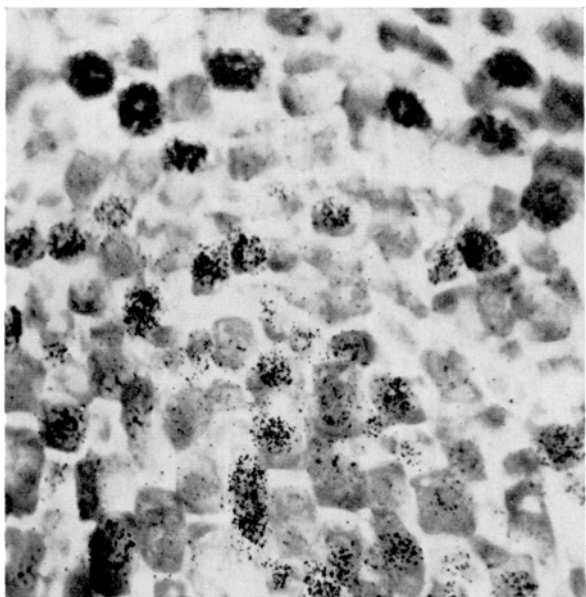


Fig. 2a.—Meristematic region of the same section as Fig. 1. Note the heavy autoradiograph over some nuclei in the developing root cap

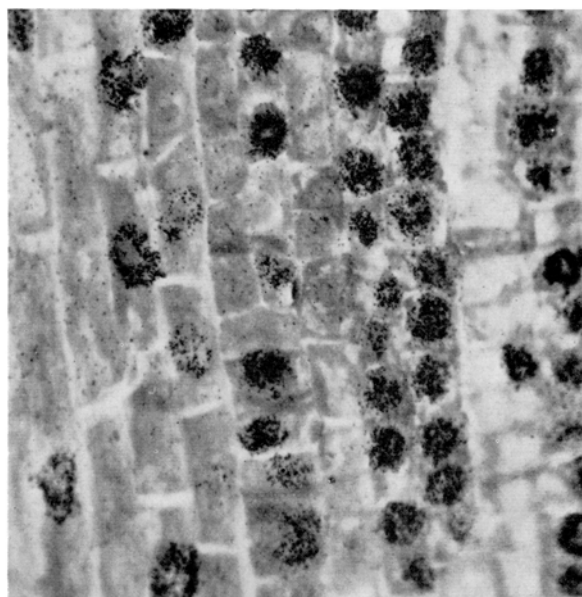
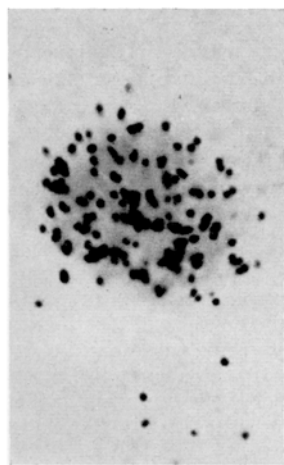
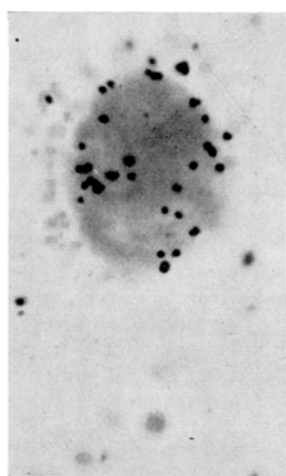


Fig. 2b.—Same section as Fig. 1, 1.9 mm from the tip. Note the columns of heavily labelled cells

gating zone adjacent to the meristem, nuclei in the cortex incorporate twice as much thymidine into their DNA as those in meristematic cells. This intensive incorporation appears to begin in nuclei at about 1.9 mm from the tip of the root and coincides with the time at which cell-division ceases.



a



b

Fig. 3a.—A heavily labelled nucleus 2 h after labelling from a squash taken at a distance of 4–7 mm from the tip. Note the even distribution

Fig. 3b.—A weakly labelled nucleus from the same squash as Fig. 3a. Note the uneven distribution

The amount of DNA per nucleus in roots of *Vicia faba* has been studied by HOLMES *et al.*⁷, JENSEN^{8,9}, and DEELEY *et al.*¹⁰. The available literature suggests some

variation in the length of meristem; our own observations on longitudinal sections agree with those of JENSEN⁸ whose published data⁹ show that nearly all nuclei at a distance of 1.9 mm from the tip of the root contain 4 C (prophase) values of DNA. According to the Feulgen measurements of DEELEY *et al.* a small proportion of nuclei however attain an 8 C value at about 8 mm from the tip. Recently SNOAD¹¹, in material grown under the same conditions as those used by us, has found by means of Feulgen-photometry that nuclei in the cortex contain a 4 C amount of DNA at a distance of 2 mm, but that Feulgen values were reduced by 20–25% between 5 and 20 mm distance from the root tip. It can therefore be confidently assumed that no increase in amount of DNA per cell occurs in cortical tissue at a distance of 2 mm from the tip.

Since heavily labelled nuclei are also found in the developing root cap, side by side with meristematic cells, higher specific activity of thymidine is unlikely to be responsible for the heavy labelling in cells in the cortex. It is clear from the available evidence that the incorporation of thymidine into the DNA of cortical cells about to elongate is unconnected with increase in polyteny or polyploidy, and, since intense labelling can be observed as soon as 2 h after treatment, independent of cell division. Such heavily labelled nuclei have not been observed in *Vicia* roots after labelling of DNA with p^{32} ¹² or C^{14} -adenine¹³. The incorporation of thymidine in these nuclei has therefore to be regarded as either metabolic exchange of this compound or enrichment of the DNA with thymidine i.e. a change in the base ratios. We feel the latter alternative is unlikely.

At present it would be unwise to regard this phenomenon as a regular prerequisite of differentiation in roots and common to all species. On the other hand, it is reasonable to suspect that the intensive incorporation of thymidine reflects a metabolic activity of the DNA, and therefore possibly of the genetic material, in the cortical

⁷ B. E. HOLMES, L. K. MEE, S. HORNSEY, and L. H. GRAY, *Exp. Cell Res.* 8, 101 (1955).

⁸ W. A. JENSEN, *Exp. Cell Res.* 8, 506 (1955).

⁹ W. A. JENSEN, *Exp. Cell Res.* 10, 222 (1956).

¹⁰ E. M. DEELEY, H. G. DAVIES, and J. CHAYEN, *Exp. Cell Res.* 12, 582 (1957).

¹¹ B. SNOAD, unpublished.

¹² A. HOWARD and S. R. PELC, *Exp. Cell Res.* 2, 178 (1951).

¹³ S. R. PELC and A. HOWARD, unpublished.

nuclei of this region of the root in *Vicia faba*. We think it unlikely that the full specificity of all genes in a nucleus would be required for the function of a differentiating cell at a certain stage, but the amount and localization of the incorporated thymidine indicate that all, or at least most of the DNA is involved. We therefore assume that in this instance the specificity of DNA as a chemical compound is required, though not its possible genetic specificity. It is possible that this incorporation indicates a non-specific action of DNA similar to that reported by ALLFREY and MIRSKY¹⁴. Whether however the labelling of parts of nuclei in some cells is due to metabolic activity of a few genes or to asynchrony of the chromosomes is less clear.

S. R. PELC and L. F. LA COUR

Medical Research Council, Biophysics Research Unit, King's College, London and John Innes Horticultural Institution, Bayfordbury, Hertford (Herts), December 10, 1958.

Zusammenfassung

Bohnenwurzeln (*Vicia faba*) wurden mit H³-Thymidin behandelt. Autoradiographien zeigen Aufnahmen von DNS in Zellkernen, welche keine Zellteilungen mehr durchmachen.

¹⁴ V. G. ALLFREY and A. E. MIRSKY, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 43, 589 (1957).

Über den Einfluss des D,L-Methioninsulfoximins auf den Eiweißstoffwechsel bei Erbsen

Methioninsulfoximin (MSI), ein Derivat der lebenswichtigen Aminosäure Methionin, ist für zahlreiche Organismen von besonderer Giftigkeit. Bereits kleinste Mengen von MSI verursachen bei den Versuchstieren epileptische Krämpfe¹⁻³. PACE und DERMOTT⁴ bewiesen, dass MSI *in vitro* die Bildung von Glutamin aus Glutaminsäure hemmt; diese Autoren beobachteten auch einen ungünstigen Einfluss des MSI auf die Samenkeimung. Die toxische Wirkung des MSI auf die Versuchstiere kann durch Methionin aufgehoben werden^{1,5}. Dieser Befund weist daraufhin, dass MSI (als ein Abkömmling des Methionins) vielleicht auf die Proteosynthese störend einwirkt.

Um den Einfluss von MSI auf den Eiweißstoffwechsel zu prüfen, haben wir als verhältnismässig einfaches Modell die Erbsenkeimlinge in Versuch genommen.

Das benutzte MSI wurde grundsätzlich nach den Angaben von BENTLEY⁶ synthetisiert. Zum Versuch wurde der Samen grüner Erbsen (Sorte *Stupicky zeleny*) verwendet. Die Samen wurden in Petrischalen auf Zellstoffwolle, die mit wässrigen Lösungen von MSI (Konzentrationsbereich 10⁻² bis 10⁻⁶ M) übergossen wurde, gekeimt. Als Kontrollen dienten in destilliertem Wasser gekeimte Erbsen. Nach 10 Tagen wurden die Keimlinge

¹ S. N. GERSHOFF und C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. 192, 569 (1951); J. Nutrition 45, 451 (1951).
² S. N. GERSHOFF, Amer. J. Physiol. 184, 43 (1956).
³ Z. LODIN und J. KOLOUSEK, Českoslov. Neurologie 19, 83 (1956).
⁴ J. PACE und E. E. Mc DERMOTT, Nature 169, 515 (1952).
⁵ Z. LODIN und J. KOLOUSEK, Českoslov. Fysiologie, im Druck.
⁶ H. R. BENTLEY, E. E. Mc DERMOTT und J. K. WHITEHEAD, Proc. R. Soc., London [B] 138, 265 (1951)

Tabelle 1
Der Einfluss des Methioninsulfoximins auf die Länge der Wurzeln bei den Erbsenkeimlingen

	Wurzeln	
	Anzahl der Pflanzen	Mittelwert der Wurzellänge in mm
Kontrolle	50	43,6
MSI {	5 · 10 ⁻² M	19*
	10 ⁻² M	35
	10 ⁻³ M	28
	10 ⁻⁴ M	24
	10 ⁻⁵ M	31
	10 ⁻⁶ M	48
		10,6 11,8 20,5 20,6 33,0 34,7

* Bei der Mehrzahl der Samen wurde keine Keimung beobachtet. Alle Werte sind statistisch signifikant.

in die einzelnen Vegetationsorgane (Kotyledonen, Wurzeln, Blätter) zerteilt. Wurzel- und Blattlängen wurden gemessen und abgewogene Mengen des Pflanzenmaterials mit gereinigtem Meersand zerrieben und mit 70%igem Äthanol bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum eingeeengt und chromatographisch analysiert. Zur Entfernung anwesender Peptide wurden bestimmte Extraktmengen in eingeschmolzenen Röhren mit zehnfacher Menge 6 N HCl 48 h bei 110°C im Trockenschrank hydrolysiert.

Nach Extraktion der freien Aminosäuren und Peptide wurde der Pflanzenrest mit einer Mischung von 6 N HCl und 85%iger HCOOH (10:1) bei 110°C innerhalb 48 h hydrolysiert und die erwähnten Hydrolysate im Vakuum von Salzsäureresten befreit.

Zur zweidimensionalen Chromatographie der Aminosäuren, bzw. Peptide in den Extrakten und Hydrolysaten verwendeten wir das Papier Whatman Nr. 1: In erster Richtung im Phenol-Äthanol-Wasser (2:1:1) mit 0,1% Oxin (8-Oxychinolin) in einer Atmosphäre von 3%igem Ammoniak, und in zweiter Richtung in *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5), bei zweimal wiederholter Entwicklung⁷.

Für die Bestimmung der Hauptformen des Stickstoffs wurden Erbsensamen in ähnlicher Weise gekeimt. In jeder Petrischale wurden 100 Erbsensamen in 30 ml der MSI-Lösung in einer Konzentration 10⁻³ M 7 Tage gekeimt. In abgewogenen Mengen vollständig homogenisierter Keimlinge wurden das Trockenmaterial, der Gesamtstickstoff und der Eiweißstickstoff nach BARNSTEIN⁸ bestimmt und der Nichteiweißstickstoff als Differenz zwischen Gesamtstickstoff- und Eiweißstickstoffgehalt berechnet.

Proben des Pflanzenhomogenats wurden nach Kjeldahl mineralisiert und der Stickstoff des Mineralisats als Ammoniak mit der Mikrodiffusionsmethode nach CONWAY⁹ bestimmt.

Der Versuch mit den Erbsenkeimlingen zeigt, dass MSI das Pflanzenwachstum eindeutig und stark hemmt (siehe Tab. I). In der Konzentration 10⁻² bis 10⁻³ M werden bei den Samen keine Koleoptilen mehr gebildet und die Wurzeln sind deutlich kürzer als bei den Kontrollpflanzen. In der Konzentration 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ M bilden sich noch

⁷ J. KOLOUSEK, Naturwissenschaften 41, 398 (1957).
⁸ B. SCHNEIBERG, Metody chemických rozboru krmiv (Bräzda Praha 1951), p. 19.
⁹ E. J. CONWAY, Microdiffusion and Volumetric Error (London 1947).