

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 MIRSKY<sup>14</sup>. 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 H<sup>3</sup>-Thymidin behandelt. Autoradiographien zeigen Aufnahmen von DNS in Zellkernen, welche keine Zellteilungen mehr durchmachen.

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

Über den Einfluss des D,L-Methioninsulfoxims 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 Krämpfe<sup>1-3</sup>. PACE und DERMOTT<sup>4</sup> 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<sup>1,5</sup>. 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 BENTLEY<sup>6</sup> 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<sup>-2</sup> bis 10<sup>-6</sup> M) übergossen wurde, gekeimt. Als Kontrollen dienten in destilliertem Wasser gekeimte Erbsen. Nach 10 Tagen wurden die Keimlinge

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

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

	Wurzeln	
	Anzahl der Pflanzen	Mittelwert der Wurzellänge in mm
Kontrolle . . . . .	50	43,6
MSI {	5 · 10 <sup>-2</sup> M . . . . .	19*
	10 <sup>-2</sup> M . . . . .	35
	10 <sup>-3</sup> M . . . . .	28
	10 <sup>-4</sup> M . . . . .	24
	10 <sup>-5</sup> M . . . . .	31
	10 <sup>-6</sup> M . . . . .	48

\* 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 Entwicklung<sup>7</sup>.

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<sup>-3</sup> M 7 Tage gekeimt. In abgewogenen Mengen vollständig homogenisierter Keimlinge wurden das Trockenmaterial, der Gesamtstickstoff und der Eiweißstickstoff nach BARNSTEIN<sup>8</sup> 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 CONWAY<sup>9</sup> bestimmt.

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

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

Tabelle II

Der Stickstoffgehalt in den Kontrollpflanzen und in den durch Methioninsulfoximin gehemmten Erbsenpflanzen. Alle Werte sind auf Trockengewicht berechnet

		Trockengewicht in %	Gesamt-N in %	Eiweiss-N in %	Nichteiweiss-N in %
Kontrolle . . . . .		22,10 $s = \pm 0,20$	4,26 $s = \pm 0,22$	3,25 $s = \pm 0,33$	1,02 $s = \pm 0,12$
MSI $10^{-3}$ M . . . . .		28,18 $s = \pm 0,20$	4,71 $s = \pm 0,37$	4,39 $s = \pm 0,32$	0,32 $s = \pm 0,25$
Differenz zwischen den Kontroll- und MSI- gehemmten Pflanzen	Kontrolle . . . . .	100	100	100	100
	MSI $10^{-3}$ M. . . . .	127,51	110,36	135,41	30,82
	Statistik . . . . .	FG = 4; $P < 0,01$	FG = 4; $P < 0,1$	FG = 4; $P < 0,01$	FG = 4; $P < 0,01$

FG = Freiheitsgrad ( $N+1-2$ ;  $N$  = Zahl der Bestimmungen).  $s$  = mittlere Abweichung der einzelnen Bestimmung.

Wurzeln und Blätter, die kürzer als bei den Kontrollpflanzen bleiben. Die Hemmung ist in der Konzentration  $10^{-6}$  MSI noch sichtbar.

Die freien Aminosäuren in Erbsen wurden nur soweit berücksichtigt, als sie zum Thema gehörten. Im übrigen wurden sie für das erwähnte Material bereits ausführlich beschrieben<sup>10,11</sup>.

Bei zweidimensionaler Papierchromatographie konnten wir zeigen, dass durch die durch MSI hervorgerufene Hemmung Veränderungen nur im qualitativen Bild der freien Aminosäuren der Wurzeln erfolgen. Mit steigender Hemmung sinkt der Gehalt an Asparagin bis zum Verschwinden (Konzentration  $10^{-4}$ ). In den Wurzeln der so gehemmten Pflanzen ist der Gehalt an freien Aminosäuren und Peptiden erniedrigt, manche Peptide fehlen sogar völlig. In den Blättern kamen keine Veränderungen des Aminosäurenbildes zur Beobachtung. Bei einer Konzentration  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  M MSI verschwindet Asparagin in den ganzen Pflanzen und auch der Gehalt an verschiedenen Peptiden ist erniedrigt.

Jedoch waren in den sauren Hydrolysaten des Pflanzenmaterials nach Extraktion der freien Aminosäuren und Peptide keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen festzustellen.

Der Stickstoffgehalt der Kontrollpflanzen und der mit MSI gehemmten Pflanzen ist in der Tabelle II angegeben.

Als erstes Keimungskriterium des Samens kann das Auftreten des freien Asparagins<sup>12,13</sup> und des Prolins<sup>14</sup> gelten. Bei der durch MSI hervorgerufenen Hemmung sinkt im Gegenteil die Menge des Asparagins stark oder verschwindet ganz. Die Hemmung der Keimung der Erbsensamen durch MSI ist durch eine Vermehrung des Trockengewichtes und des Eiweißstickstoffgehalts sowie durch eine Erniedrigung des Nichteiweißstickstoffgehalts und Verschwinden des Asparagins gekennzeichnet. Alle Befunde zeigen, dass eine steigende Konzentration von MSI eine steigende Hemmung der Proteolyse sowie Proteosynthese zur Folge hat. Würde die Wirkung des MSI nur in der Hemmung der Amidbildung bestehen, dann müsste der Ammoniakgehalt im Gewebe ansteigen, was

auch eine Vermehrung des Nichteiweißstickstoffgehaltes verursachte, was aber nicht der Fall ist: der Nichteiweißstickstoffgehalt sinkt ab. Die Menge des Eiweißstickstoffs im Trockengewicht der Versuchspflanzen ist um 35% höher als in den Kontrollpflanzen; was wiederum dafür spricht, dass das MSI eine Hemmung der Proteolyse hervorruft. Auf Grund unserer Befunde kommen wir zur Auffassung, dass es sich beim MSI um einen Hemmstoff der Proteolyse handelt.

J. KOLOUŠEK und V. JIRÁČEK

*Physiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften und Biochemisches Institut der Karlsuniversität, Prag, 12. November 1958.*

Summary

The influence of the D,L-Methioninesulphoximine on the nitrogen metabolism of germinating seeds has been studied on peas. It has been shown that D,L-Methioninesulphoximine, even at low concentrations, inhibited the germination of seeds and produced a decrease of growth of the roots. The inhibited germinating seeds contained less non-protein-nitrogen and less asparagine than the control plants. On the basis of the experimental results, D,L-Methioninesulphoximine could be considered as an inhibitor of proteolysis.

Die Serumphosphatasen der Ratte  
in verschiedenen Lebensaltern

Die alkalische Blut-Serumphosphatase normaler Tiere stammt hauptsächlich aus den Knochen, die saure Serumphosphatase dagegen grösstenteils aus Leber, Milz, Nieren und nur zum kleinern Teil aus den Knochen<sup>1</sup>. Beim Menschen liegen die Aktivitäten beider Serumphosphatasen im Kindesalter hoch und nehmen zur Zeit der Pubertät ab<sup>2</sup>. Gleichzeitig steigt die Ausscheidung der sauren Phosphate im Harn an<sup>3</sup>. Die Schwankungen der alkalischen Phosphataseaktivität werden den Veränderungen der osteoblastischen Tätigkeit zugeschrieben<sup>2</sup>. Diese beim

<sup>10</sup> J. K. MIETTINEN, Ann. Acad. Sci. fenn. [A.S.], 1955, 520.

<sup>11</sup> A. J. VIRTANEN, A. M. BERG und S. KARI, Acta chem. scand. 7, 1423 (1953).

<sup>12</sup> J. BONNER, Plant Biochemistry, 1. Aufl. (Academic Press Inc., New York 1950), p. 293.

<sup>13</sup> D. N. PRJANIŠNIKOFF, zitiert nach <sup>12</sup>.

<sup>14</sup> E. NĚMCOVÁ-FABIÁNOVÁ und J. KOLOUŠEK, Sborník čsl. akad. zeměděl. věd, Rostlinná výroba 29, 155 (1956).

<sup>1</sup> A. B. GUTMAN, J. Amer. med. Assoc. 120, 1112 (1942).

<sup>2</sup> L. C. CLARK, E. I. BECK und N. W. SHOCK, J. Gerontol. 6, 7 (1951). – R. EMMRICH und H. SCHEFFLER, Z. Altersforschung 6, 156 (1952).

<sup>3</sup> D. KNORR, Klin. Wschr. 36, 760 (1958).