

not have an additive effect but inhibit glucose oxidation to a value intermediate between those obtained when the drugs are used alone at these concentrations. Similar results were obtained with other combinations.

Previous work has indicated that some of these compounds inhibit cytochrome oxidase from rat liver and brain⁷. Reduced triphosphopyridine nucleotide is oxidized slowly by this system. However, TPNH oxidase is present in the erythrocyte and may possibly be the specific enzyme inhibited by these compounds. These experiments were not designed to establish this.

The molar concentrations required in this study were in excess of the pharmacological dose. However, it is possible that the inhibition noted may be the basis for other clinical effects of the drugs. Further work is in progress on the use of human red blood cells in studying enzyme inhibition by phenothiazine derivatives.

Investigation supported in part by Nebraska Fund for Psychiatric Research and Grant M-2204, National Institute of Mental Health, Public Health Service⁸.

M. J. CARVER and NADINE ROESKY

Neurochemical Laboratory, Nebraska Psychiatric Institute, College of Medicine, Omaha (Nebraska), December 1, 1958.

Zusammenfassung

Phenothiazinabkömmlinge unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit als Hemmstoffe im oxydativen Glukosestoffwechsel in menschlichen Erythrozyten. Kombiniert man verschiedene Phenothiazinderivate, so erhält man einen mittleren Hemmungsgrad, der zwischen jenen liegt, die man bei Anwendung der einzelnen Wirkstoffe für sich allein erhalten würde. Somit erscheint es nicht wahrscheinlich, dass Hemmung des oxydativen Glukosestoffwechsels die prinzipielle Wirkungsweise der Phenothiazinabkömmlinge darstellt.

⁸ SKF-5883 was kindly supplied by Smith, Kline and French Laboratories, Philadelphia; Promazine by Wyeth Laboratories, Philadelphia; and Adazine by the Upjohn Company, Kalamazoo.

The Extractibility of Calf Thymus Histone Fractions

It is well known that the calf thymus histone is composed of at least two main fractions. The arginine-rich fraction contains approximately five times more tyrosine than the lysine-rich one¹⁻⁴. The difference in the solubility of the sulphates of these two main fractions of calf thymus histone was used by some authors for its fractionation^{4,5}.

The nuclear material was prepared by modified extraction of the cytoplasm with 0.14 M NaCl according to BUTLER *et al.*⁶. Histone was extracted with diluted hydro-

chloric acid in two ways: in the first, the concentration of the acid, when mixed with nuclear material, amounted to 0.1 N; in the second to 0.2 N. Apart from this method, histone was isolated by extraction of the bulk of proteins

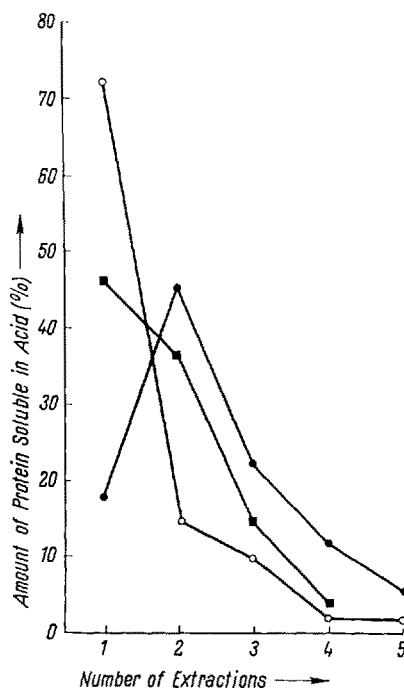


Fig. 1.—The amount of acid-soluble protein (histone) in subsequent extractions of nuclear material, prepared by using 0.14 M NaCl extracted with 0.1 N HCl (●-●-●) and 0.2 N HCl (○-○-○) and of the material prepared according to SEVAG *et al.*⁷ and extracted with 0.1 N HCl (■-■-■).

remaining after isolation of desoxyribonucleic acid (DNA), according to SEVAG *et al.*⁷. This protein-containing material was also extracted with 0.1 N hydrochloric acid. For the complete removal of all the protein soluble in diluted hydrochloric acid, five extractions are necessary (Fig. 1).

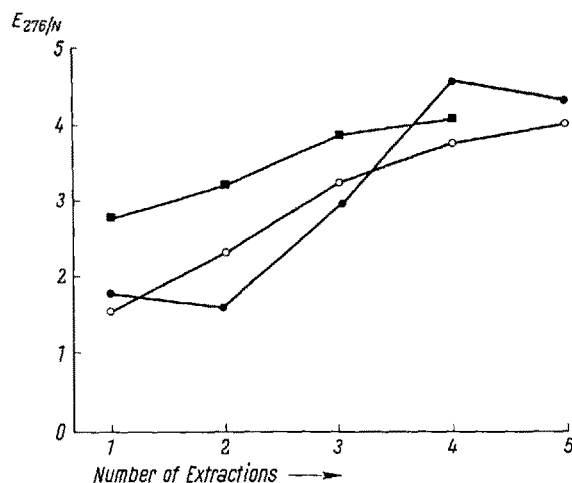


Fig. 2.—The E_{276}/N ratios of subsequent extractions of calf thymus histone. Histone extracted with 0.1 N HCl from the nuclear material prepared by using 0.14 M NaCl (●-●-●), histone prepared from the same material extracted with 0.2 N HCl (○-○-○) and histone extracted with 0.1 N HCl from the proteins resulting from the SEVAG process (■-■-■).

¹ P. F. DAVISON and J. A. V. BUTLER, *Biochim. biophys. Acta* 15, 439 (1954).

² M. M. DALY and A. E. MIRSKY, *J. gen. Physiol.* 38, 405 (1955).

³ Ch. F. CRAMPTON, S. MOORE, and W. H. STEIN, *J. biol. Chem.* 215, 787 (1955).

⁴ N. UR, *Biochim. biophys. Acta* 25, 493 (1957).

⁵ E. STEDMAN and E. STEDMAN, *Philos. Trans. Soc. [B]* 235, 565 (1951).

⁶ J. A. V. BUTLER, P. F. DAVISON, D. W. F. JAMES, and K. V. SHOOTER, *Biochim. biophys. Acta* 13, 224 (1954).

⁷ M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN, and J. SMOLENS, *J. biol. Chem.* 124, 425 (1938).

The content of the aromatic amino acids, especially tyrosine, in the lysine-rich fraction of the calf thymus histone being several times lower than the content of the arginine rich fraction, the ratio between optical density (measured at 276 m μ – density maximum of histone – in 10 mm silica cells) and nitrogen content of the solution could be used as criterion for fraction distribution in samples of isolated histones. Growth of the value of this ratio in individual samples, obtained by successive acid extractions, was observed, following every subsequent extraction. This indicates that in the first extraction the tyrosine-poor (lysine-rich), in the last extractions the tyrosine-rich (arginine-rich) fraction of histone predominates. In Figure 2 these ratios for different types of isolation are expressed graphically.

The content of aromatic amino acids in single extractions obtained by the method described above, expressed as the ratio between E_{276} and N, seems to suggest the stronger binding of arginine – and tyrosine – rich fraction on DNA. Similar results have been obtained by dissociation of different histone fractions from calf thymus deoxyribonucleoprotein in changing the concentration of Ba[OAc]₂ and ethanol⁸.

The extraction with 0.1 N HCl is more specific for preparing calf thymus histones richer in one of the two main fractions (Fig. 1, 2). The fractionating effect of the extraction with diluted sulphuric acid was used for preparation of the two main fractions of calf thymus histone by U1⁴, but the use of the SO₄ ions brings about the aggregation of arginine-rich histones and therefore it is better to replace these by the Cl ions.

By the extraction of the protein-containing material prepared according to SEVAG *et al.*⁷ from calf thymus nuclei with 0.1 N HCl, the greater part of the acid-soluble protein is extracted by the first and by the second extraction. The fractionation effect of this subsequent extraction is therefore very low. In course of the preparation of the deoxyribonucleoprotein by extraction of calf thymus nuclei with 1 M NaCl, or in course of the treating of this deoxyribonucleoprotein with the mixture of chloroform and *n*-butanol (according to SEVAG *et al.*), part of the lysine-rich (tyrosine-poor) fraction disappeared, as can be seen in Figure 2.

L. HNILICA

Oncological Research Institute, Bratislava (Czechoslovakia), November 24, 1958.

Zusammenfassung

Bei der Extraktion von Zellkernen mit Hilfe verdünnter Salzsäure ändert sich die Zusammensetzung einzelner Extrakte in Abhängigkeit von der Konzentration der benutzten Säure. Die Fraktion des Kalbsthymushistons, die an Arginin und Tyrosin reich ist, scheint an die Desoxyribonukleinsäure des Zellkerns fester gebunden zu sein als die zweite, an Tyrosin arme und an Lysin reiche Fraktion.

⁸ CH. F. CRAMPTON, J. *biol. Chem.* 227, 495 (1957).

Action d'un hépatome ascitique du rat sur les acides nucléiques du pancréas et du rein¹

Au cours de travaux antérieurs^{2,3}, nous avons étudié l'effet de la présence d'un hépatome ascitique sur les acides ribo- et désoxyribonucléiques (A.R.N. et A.D.N.) du foie et des surrénales du rat. Il s'est avéré que l'incorporation du ³²P dans l'A.R.N. et la quantité absolue de ce constituant augmentent aussi bien dans le foie que dans les surrénales. Un accroissement de la biosynthèse de l'A.D.N. a été observé seulement dans le tissu hépatique. Il nous a paru intéressant de rechercher dans des conditions expérimentales similaires les modifications éventuelles au niveau du pancréas et du rein.

Nos essais ont porté sur des rats blancs de souche Wistar groupés en lots du même sexe et de la même portée. Dans chaque lot, la moitié des rats a reçu une injection intrapéritonéale de 1 cm³ de liquide d'ascite qui provoque l'apparition d'une abondante ascite⁴ au bout de 5 jours. Les rats sont alors sacrifiés par saignée 24 h après l'injection intra-musculaire de 100 μ c de ³²P par 100 g de poids corporel.

Les organes sont prélevés rapidement, pesés et traités selon les techniques décrites ailleurs pour la détermination de la quantité d'A.R.N. et d'A.D.N., de leurs activités spécifiques et de celle du PO₄ acido-soluble².

Les essais concernant les modifications au niveau du pancréas ont porté sur 46 rats groupés en 5 lots, dont 23 témoins. Pour le rein, nous avons effectué 6 expériences sur 24 rats dont 12 témoins.

Les résultats de nos essais sont résumés dans les graphiques I et II.

Nous y avons consigné les quantités de protéines, de phosphore ribonucléique, de phosphore désoxyribonucléique, l'activité spécifique (A. S.) du PO₄ acido-soluble, l'activité du ³²P incorporé dans l'A.R.N. rapportée à l'A.S. du PO₄ ainsi que l'A.S. de l'A.D.N. pour le pancréas. Nous n'avons pas présenté les valeurs d'A.S. de l'A.D.N. du rein qui sont très faibles chez les témoins comme chez les porteurs d'hépatomes. Pour l'expression de l'incorporation du ³²P dans l'A.R.N., il nous a paru utile de tenir compte de la quantité totale du ³²P retrouvé dans l'A.R.N. et de la rapporter à l'A.S. du PO₄ acido-soluble du tissu car ainsi la comparaison entre témoins et animaux en expérience est plus rigoureuse.

Il ressort de l'examen des graphiques que, dans le cas du rein, on n'observe aucune variation des quantités de protéines, d'A.D.N. et du quotient

$$\frac{{}^{32}\text{P incorporé dans l'A.R.N.}}{\text{A. S. PO}_4}$$

chez les animaux porteurs de tumeur. En ce qui concerne la quantité d'A.R.N., les différences ne sont pas significatives. Au niveau du pancréas les quantités absolues de protéines et d'A.R.N. restent également inchangées alors

¹ Travail effectué avec l'aide matérielle de l'Institut National d'Hygiène.

² M. WINTZERITH, L. MANDEL et P. MANDEL, C. R. Soc. Biol. 151, 2199 (1957).

³ L. MANDEL, M. WINTZERITH et P. MANDEL, J. Physiol. 50, 401 (1958).

⁴ Nous devons la souche d'hépatome ascitique à l'obligeance de M. ZAJDELA de la Fondation Curie, que nous remercions très-vivement.