

normal values, the most marked grouping of the proteins was observed in the B zone, corresponding to serum albumin. The number of different identifiable components was significantly decreased in the treated animals: the nuclear fraction appeared resolved into 7–8 (after 1 and 5 days respectively) components, against 9 of the controls; the mitochondrial one into 7–6 and 10 respectively (Figure 1).

In our opinion the patterns observed can be considered as an expression of protein denaturation, as firstly suggested by DAVIS, HOLLANDER, and GREENSTEIN¹⁰.

As regards the glycoproteins, we have found significant changes for the mitochondrial fraction: after 5 days a

Percentual amounts of the soluble proteins isolated from rat liver nuclear, mitochondrial and cytoplasmic fractions, in CCl₄ induced fatty change

	A	B	C	D	E	F	G
Nuclear fraction							
Normal liver	16.8	32.2	19.9	13.7	8.5	4.5	4.4
After 24 h	1.4	37.4	32.9	19.6	6.7	2.0	—
After 5 days	11.2	52.7	24.4	5.1	5.2	1.4	—
Mitochondrial fraction							
Normal liver	6.7	44.4	24.4	16.5	6.2	1.5	0.3
After 24 h	1.2	18.5	52.9	20.1	7.3	—	—
After 5 days	4.8	59.4	24.1	5.1	4.5	2.1	—
Cytoplasmic fraction							
Normal liver	1.8	29.5	20.9	12.2	20.8	10.1	4.7
After 24 h	1.5	16.2	23.6	20.8	24.4	10.2	3.3
After 5 days	11.1	24.7	22.7	9.8	19.7	12.0	—

typical grouping of components in the albumin-like zone was observed (Figure 2a).

It is of interest that no difference of lipoprotein pattern for the nuclear and cytoplasmic fractions were noted, while for the mitochondrial we observed only one β -lipoprotein-like peak, instead of the two well defined peaks corresponding to the normal mitochondrial pattern (Figure 2b).

Riassunto. Gli autori hanno studiato, mediante elettroforesi su agar, il comportamento delle proteine solubili isolate dalle diverse frazioni cellulari di epatociti di ratto, in corso di steatosi da CCl₄.

A carico delle frazioni nucleare e mitocondriale è stata osservata una diminuzione dei componenti più e meno dispersi, con un raggruppamento in zone a motilità intermedia, pari a quella delle α_1 -globuline sieriche o delle albumine, accanto ad una riduzione del numero dei componenti proteici chiaramente individuabili.

Analoghe modificazioni sono state rilevate a carico dei componenti glico- e lipoproteici – nella sola frazione mitocondriale.

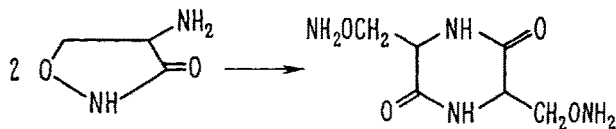
F. R. SONNINO and P. P. GAZZANIGA

Istituto di Patologia Generale della Università, Roma (Italy), January 19, 1962.

¹⁰ B. D. DAVIS, A. HOLLANDER, and J. GREENSTEIN, *J. biol. Chem.* **146**, 663 (1942).

Über die tuberkulostatische Aktivität von 2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin, eines Umwandlungsproduktes des Cycloserins

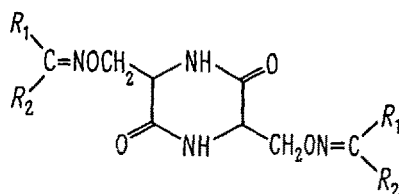
In den wässrigen¹, wässrig-alkoholischen oder essig-sauren² Lösungen fällt 4-Amino-3-isoxazolidon (Cycloserin) bis zu einem gewissen Grad einem interessanten Dimerisierungsvorgang anheim. Das Endprodukt dieses intermolekularen Umamidierungsprozesses ist 2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin (DKP)¹. Je nach der Darstellungsweise und dem Reinigungsverfahren enthalten sämtliche Handelsprodukte des Cycloserins bestimmte Mengen von DKP.



Aus den wässrigen Lösungen lässt sich DKP leicht in Form von Dihydrochlorid isolieren. Aus diesem kann freie Base auf übliche Weise zurückgewonnen werden. Das DKP wurde weiter als Monosulfat und Dipikrat charakterisiert.

Als Träger von zwei Aminooxygruppen reagiert DKP sowie sein Dihydrochlorid oder Sulphat mit überraschender Leichtigkeit mit einer Reihe von Oxoverbindungen zu den entsprechenden 2,5-Bis-(alkylden- bzw. aralkylden-aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazinen.

Diese Kondensationsprodukte, von denen manche eine biologische Aktivität aufweisen, werden an anderer Stelle näher besprochen. Es ist jedoch von Interesse, dass die oben angeführten Derivate des DKP auch direkt vom



Cycloserin ausgehend durch Einwirkung verschiedener Oxoverbindungen in wasserfreiem Alkohol zugänglich gemacht werden konnten. Ihre Struktur wurde auf Grund der Ergebnisse der katalytischen Hydrierung und der Hydrogenolyse gesichert; zum Beispiel konnte 2,5-Bis-(benzylidenaminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin auf diese Weise zum Serinanhydrid und Benzylamin gespalten werden. Die Bildung der entsprechenden Schiffchen Basen konnten wir unter den gegebenen Reaktionsbedingungen in keinem Falle beobachten.

Der Wirkungsmechanismus des Cycloserins wird von verschiedenen Autoren^{3–5} unter anderem eben auf die Bildung einer Schiffchen Base von Cycloserin mit Pyridoxal bzw. Pyridoxal-5-phosphat zurückgeführt.

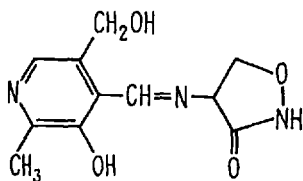
¹ PH. H. HIDY, E. B. HODGE, V. V. YOUNG, R. L. HARNED, G. A. BREWER, W. F. PHILLIPS, W. F. RUNGE, H. E. STAVELY, A. POHLAND, H. BOAZ und H. R. SULLIVAN, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 2345 (1955).

² H. BRETSCHNEIDER und W. VETTER, *Mh. Chem.* **90**, 779 (1959).

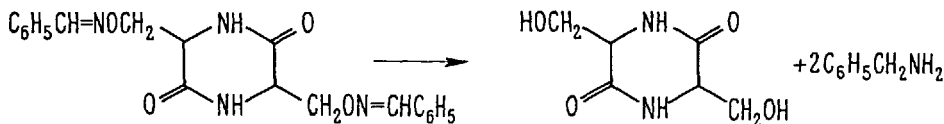
³ T. AOKI, *Kekkaku* **32**, 605 (1957); *Chem. Abstr.* **52**, 7427 (1958).

⁴ N. K. KOTSCHETKOW, R. M. CHOMUTOW, M. J. KARPEISSKI, E. J. BUDOWSKI und J. S. SSEVERIN, *Dokl. Akad. Nauk UdSSR* **126**, 1132 (1959).

⁵ N. K. KOTSCHETKOW, *Österr. Chem. Z.* **62**, 276 (1961).



Unsere eigenen Untersuchungen brachten uns zur Vermutung, dass Cycloserin auf bis jetzt von uns nicht völlig geklärte Weise teils über DKP hinaus seine biologische Aktivität entfaltet. Die interessanten pharmakologischen Eigenschaften des DKP bieten eine gewisse Stütze für unsere Anschauungen über die Wirkungsweise von Cycloserin.



Es wurden vergleichende Untersuchungen über die antituberkulose Wirksamkeit von *D,L*-Cycloserin und *D,L*-2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin *in vitro* an einer 12 Tage alten Kultur des *Mycobacterium tuberculosis* var. hominis H₃₇Rv in flüssigem Nährmedium nach Proskauer-Beck durchgeführt. Die verwendeten Präparate wiesen Konzentrationen von 0,78 γ /ml bis 100 γ /ml auf. Nach 14tägiger Inkubationszeit bei 37° wurden die Ergebnisse makroskopisch abgelesen. Die vollständige Wachstumshemmung des *Mycobacterium tuberculosis* bewegte sich bei beiden Präparaten im Konzentrationsbereich von 6,25 bis 12,5 γ /ml. Die *in vivo* durchgeführten Orientierungsversuche brachten ebenfalls günstige Resultate.

Die Toxizität des *D,L*-2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazins ist bei peroraler Verabreichung gleich gross wie die des *D,L*-Cycloserins (DL₅₀ 4 g/kg). Die nach der Applikation des *D,L*-2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-

diketopiperazins beobachteten toxischen Symptome sind durch starke Niedergeschlagenheit gekennzeichnet, welche von Ptosis und Katalapsie begleitet wird. Jedoch ruft jede von aussen kommende Anregung starke Reizbarkeit hervor. Später treten Atmungsschwierigkeiten und Cyanosis hinzu. Nach Verabreichung von *D,L*-Cycloserin wurden praktisch dieselben toxischen Symptome beobachtet.

Im Gegensatz zum *D,L*-Cycloserin, das die Thiopentnarkose bei Mäusen bedeutend verlängert, zeigte sich *D,L*-2,5-Bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin in dieser Hinsicht ohne Einfluss. Die Resultate der vorläufigen pharmakologischen Untersuchungen deuten auch in anderen Richtungen auf die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Präparate hin (zum Beispiel in der Wirkung auf die krampferregenden Stoffe). Das 2,5-Bis-

(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazin sowie seine Derivate sind Gegenstand weiterer pharmakologischer Untersuchungen.

Summary. It has been ascertained that racemic 2,5-bis-(aminooxymethyl)-3,6-diketopiperazine, being a transformation product of *D,L*-cycloserine, possesses the same effect against *Mycobacterium tuberculosis* as *D,L*-cycloserine itself.

J. MICHALSKÝ, J. ČTVRTNÍK,
Z. HORÁKOVÁ und V. BYDŽOVSKÝ

Forschungsabteilung des VEB Farmakon Olomouc und Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie Prag (Tschechoslowakei), 11. Januar 1962.

Uptake by Mammalian Cells of Nucleic Acids Combined with a Basic Protein

When nucleoproteins are dissociated with different techniques, nucleic acids apparently retain the whole genetic information^{1,2} and protein moiety most of the immunological properties of the original complex. In addition, nucleoproteins have some biochemical and biological characteristics which are not displayed by their components: a remarkable resistance toward hydrolysis with enzymes for instance. The host-specificity and high efficiency of infection that whole viruses (but not the extracted V-DNA and V-RNA) possess, and the ability of ribosomes to serve as template for protein synthesis³ (a property which is not shared by R-RNA) are other characteristics of intact nucleoprotein particles only.

We have been interested in investigating the properties of artificial ribonucleoprotein complexes deriving from the *in vitro* combination of a basic protein with nucleic acids of different types and sources, with the aim of using them as biochemical tools for a study of more complex systems such as viruses and ribosomes.

Experimental. Basic protein (MA) was prepared by methylation with methanol and HCl of bovine serum

albumin (fraction V, Armour Labs.)⁴⁻⁶. Nucleic acids were obtained from mammalian cells and viruses by extraction with cold phenol^{7,8}. HeLa cells, homogenously labelled by suspension culture in modified Hank's medium containing P³²-orthophosphate, and suspended in 0.1 M NaCl buffered at pH 7.1 with 0.1 M phosphates, were extracted with 2% duponol and water-saturated phenol^{7,8}. Protein-free nucleic acids, precipitated with ethanol (95%, 6 vol, 18 h, 3°C) and redissolved in buffered saline (0.1 M NaCl, pH 7.1) were fractionated with 1.5 M NaCl (18 h, 3°C) into a sediment containing most of the high molecular weight

¹ A. GIERER and G. SCHRAMM, Z. Naturforsch. 110, 138 (1956).

² H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER, and R. C. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta 25, 87 (1957).

³ M. B. HOAGLAND, P. C. ZAMECNÍK, and M. L. STEPHENSON, Biochim. biophys. Acta 24, 215 (1957).

⁴ H. FRAENKEL-CONRAT and H. S. OLCOTT, J. biol. Chem. 161, 259 (1945).

⁵ L. S. LERMAN, Biochim. biophys. Acta 18, 132 (1955).

⁶ J. D. MANDELL and A. D. HERSHEY, Anal. Biochem. 1, 66 (1960).

⁷ C. COCITO and P. DE SOMER, Proc. int. biophys. Congr. Stockholm (1961), p. 220.

⁸ C. COCITO, A. PRINZIE, and P. DE SOMER, Nature 191, 573 (1961).