

counts while it should theoretically contribute 6.91×10^3 counts. This good agreement between found and calculated values shows that tritium is evenly distributed throughout the molecule of cholesterol- H^3 prepared by WILZBACH's method.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass Cholesterin- H^3 , nach Behandlung von besonders gereinigtem Handelscholesterin mit Tritium entsprechend der Vorschrift von WILZBACH, bei sechsmal wiederholter Bromierung nach

FIESER frei von Cholestanol- H^3 erhalten wird. In so gereinigtem Cholesterin- H^3 ist der schwere Wasserstoff gleichmässig über alle wasserstofftragenden Kohlenstoffatome verteilt.

E. SCHWENK and ERZSEBET JOACHIM

Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury (Mass., U.S.A.), May 7, 1962.

The Mucopeptide Turnover in the Cell Walls of Growing Cultures of *Bacillus megaterium* KM

A protein turnover of approximately 1%/h takes place in the cells of growing bacilli¹ while, under the same conditions, the proteins in cells of Gram-negative bacteria remain stable and disintegrate only in a medium lacking nitrogen². Certain changes in the cell walls occur in growing cultures of *Bacillus megaterium* KM and are responsible for their increased sensitivity to lysozyme and the release of part of the mucopeptides³. Investigations were carried out in order to ascertain whether the changes in the mucopeptidic moiety of the cell walls cause the release of their components into a pool. In measuring the velocity of the turnover, the circumstance was taken into account that the cells of *Bacillus megaterium* to a certain degree decarboxylate diaminopimelic acid to lysine which is utilized for the protein synthesis⁴. In the experiment, the cell walls of the culture were prelabelled with ^{14}C diaminopimelic acid (DAP)⁵. The culture was grown on C agar with 1% lactose, 0.1% peptone and $0.03 \mu C$ ^{14}C -DAP/ml. Lysine was added to the medium in order to restrict the utilization of degradation products of DAP for protein synthesis. The fully grown culture was washed and incubated for 2 h in C medium, containing 0.5% glucose. As a result, the content of ^{14}C DAP and its products in pool were reduced to 7%. Having been centrifuged and washed, the cells were cultivated for another 6 h in fresh C medium (400 ml of medium, containing 0.5 mg dry weight of cells/ml at 32°C and 0.3 l/min aeration).

In intervals of 1 h, samples of the suspension (10 ml) were collected and the β -galactosidase established⁶ in the medium and in the cells. Another sample of the medium, containing 40 mg dry weight, was used to determine the radioactivity of the proteins and mucopeptides. Trichloroacetic acid (TCA) was added to a concentration of 5%. Nucleic acids were removed from the material by extraction with hot TCA, while the lipids were removed by extraction with alcohol, ether and acetone. The protein and mucopeptidic fractions were then isolated⁷. The samples, containing 0.2–0.4 mg dry weight/ml, were counted with the Friesecke-Hoepfner counter in the atmosphere of methane. Employing the KOCH-LEVY method⁸, the rate of mucopeptide degradation was derived from the increase in the percentage of radioactivity in the protein moiety.

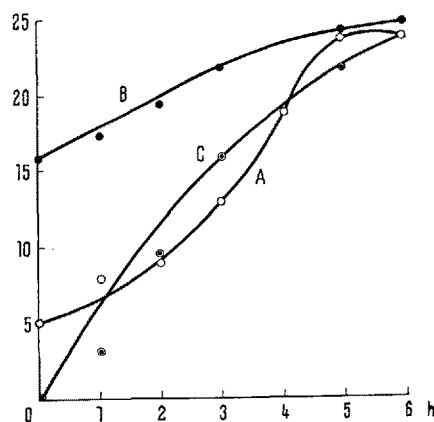
In our case the probability coefficient (q) for the decarboxylation of the released diaminopimelic acid and its incorporation into the proteins in the form of lysine was, on the average, equal to 0.44 (Table). As indicated in our illustration, a considerable cell wall turnover occurs in multiplying cells (Figure), equalling a velocity of 4%/h and a half-time of 17.3 h. Provided that 7% of the radioactivity present in the cell pool at the beginning of the

experiment are fully utilized during the growth, the rate of turnover drops to approximately 3%/h, while the half-time of the mucopeptidic moiety of the cell wall increases to 22.6 h. Since during 6 h of cultivation no measurable amount of β -galactosidase was released from the cells, and consequently, the cells did not die during the experiment,

Incorporation of ^{14}C from DAP into the cells of *Bacillus megaterium*

Min	Radioactivity in the proteins	Radioactivity in the cell wall	q
30	5263 cpm	7565 cpm	0.41
60	8930 cpm	11268 cpm	0.44
90	14618 cpm	15120 cpm	0.49

The washed culture was incubated in C/G medium (1.6 mg/ml), containing $0.03 \mu C$ ^{14}C DAP/ml. The cells were fractionized by the PARK-HANCOCK method⁷.



The mucopeptide turnover in a growing culture of *Bacillus megaterium*. A: growth expressed in mg of dry weight/10 ml. B: % ^{14}C in the protein fraction. C: % of turnover of the mucopeptidic component in the cell wall.

¹ C. R. URBÁ, Biochem. J. 77, 513 (1959).

² J. MANDELSTAM, Biochem. J. 69, 110 (1958).

³ J. CHALOUPEK, P. KŘEČKOVÁ, and L. ŘÍHOVÁ, Folia microbiol., in press.

⁴ J. CHALOUPEK and K. VEREŠ, Z. allg. Mikrobiol. 1, 325 (1961).

⁵ J. CHALOUPEK and K. VEREŠ, Exper. 17, 562 (1961).

⁶ H. W. RICKENBERG, Biochim. biophys. Acta 35, 122 (1959).

⁷ J. T. PARK and R. HANCOCK, J. gen. Microbiol. 22, 249 (1960).

⁸ A. L. KOCH and H. R. LEVY, J. biol. Chem. 217, 949 (1955).

the established rate of mucopeptide turnover must be considered as proof of profound changes in the cell walls of the growing and dividing bacterial cells.

Zusammenfassung. Die Zellwände von *Bacillus megaterium*, in der Vorkultur durch $2\text{-}^{14}\text{C}$ Diaminopimelinsäure (DAP) markiert, geben im Lauf ihrer weiteren Kultivierung DAP in den metabolischen «Pool» frei. Ein Teil der freigewordenen DAP wird zu ^{14}C Lysin dekarboxyliert und erscheint in Eiweiss inkorporiert. Aus dem Verhältnis

der Radioaktivitäten in der Eiweiss- und in der Mucopetidfraktion wurde die Geschwindigkeit des Mucopetidumsatzes in den sich vermehrenden Zellen auf 3–4% in der Stunde festgestellt.

J. CHALOUPKA, P. KŘEČKOVÁ, and L. ŘÍHOVÁ

Department of General Microbiology, Microbiological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), April 30, 1962.

Librium als Strahlenschutzsubstanz für Mäuse

In der letzten Zeit wurden auch psychotrope Drogen, wie Chlorpromazin¹ oder Reserpin², als Strahlenschutzstoffe ermittelt. Das in der Psychiatrie neuerdings ver-

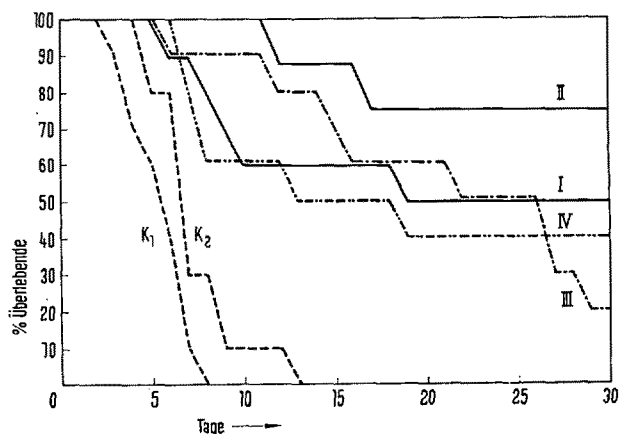


Fig. 1. Zeitverlauf des Prozentsatzes überlebender Mäuse in 30 Tagen nach einmaliger Röntgenbestrahlung (800 r), allein und unter Vorbehandlung mit Librium. K 1, K 2: Kontrollreihen von jeweils 10 Tieren, I: 7,5 mg/kg Librium (10 Tiere, $\chi^2 = 8,69$, $P > 0,001$, $< 0,01$), II: 8,75 mg/kg (8 Tiere, $\chi^2 = 12,85$, $P \leq 0,001$), III: 10 mg/kg (10 Tiere, $\chi^2 < 1$, nicht signifikant), IV: 12,5 mg/kg (10 Tiere, $\chi^2 = 4,00$, $P \sim 0,05$). (χ^2 -Test für den 30. Tag).

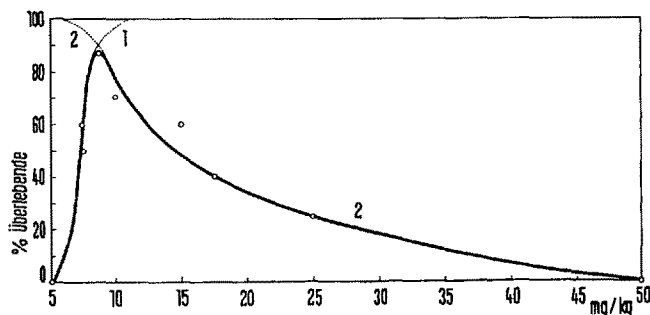


Fig. 2. Beziehung zwischen % Überlebenden (bei 800 r) und der Dosis von Librium. Beobachtungszeit: 15 Tage. Die unterbrochenen Linien deuten, als Fortsetzung der experimentellen Kurven, die einander entgegengesetzten Vorgänge (1: Schutzwirkung, 2: toxische Wirkung) an.

wendete Librium «Roche» (7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxyl-hydrochlorid) wurde auf diese Wirkung hin noch nicht untersucht. Obwohl es sich in seinen psychischen Effekten von anderen Tranquillizern unterscheidet³, zeigt es mit diesen Gemeinsamkeiten im Wirkungsmechanismus, z. B. in der Senkung der Körpertemperatur⁴.

Zur Prüfung von Librium auf Strahlenschutzwirkung verwendeten wir männliche Mäuse im Durchschnittsgewicht von 15 g (Laborzucht), die mit Röntgenstrahlen (190 kV, 8 mA, 2 mm Al-Filter, FA 40 cm) in der Dosis von 800 r (Dosisrate 40 r/min) ganzbestrahlt wurden. Neben mehreren Kontrollreihen wurden jeweils 8–10 Tiere mit verschiedenen Librium-Dosen 15 min vor Beginn der Bestrahlung i.p. injiziert. Einige repräsentative Ergebnisse (mit statistischen Daten) gibt Figur 1: es zeigte sich, dass innerhalb des Zeitraums von 30 Tagen die Libriumdosis von 8,75 mg/kg ein 75%-Überleben (im Vergleich zu 100% Mortalität in den Kontrollreihen) hervorruft. Dass dennoch die Schutzwirkung des Libriums nicht sehr beträchtlich ist, geht aus den Unterschieden der Ergebnisse zwischen gleichen Versuchsreihen hervor: so ergab eine Wiederholung der Reihe mit 7,5 mg/kg (10 Tiere) nur 30% Überlebende ($\chi^2 = 2,67$, $P > 0,05$, insignifikant) (vgl. mit Figur 1). Auch gewisse Unregelmässigkeiten in der Wirkung kommen vor; so sind 10 mg/kg weniger wirksam als 12,5 mg/kg.

Die Figur 2 lässt erkennen, dass der aktive Dosisbereich von Librium eng ist und zwischen 7,5 und 12,5 mg/kg liegt; höhere und niedrigere Dosen haben eine geringere oder keine Schutzwirkung. Dieser Befund eines schmalen wirksamen Dosisbereichs steht im Einklang mit Beobachtungen an Serotonin⁵, dessen Strahlenschutzeffekt für Mäuse ein Optimum bei der Dosis 50 mg/kg hat, also einer etwa 10fach höheren Dosis als bei Librium. Hier dürfte es sich um die Superposition zweier Vorgänge handeln, von denen offenbar der eine, nämlich die Verminderung des Schutzes bei Libriumdosen über 12,5 mg/kg, mit der zunehmenden toxischen Wirkung der Substanz selbst (deren LD_{50} i.p. etwa 75 mg/kg = $\sim 1/10$ LD_{50} oral sein dürfte) im Zusammenhang steht.

¹ E. H. BETZ, D. J. MEWISSEN und J. CLOSON, Arch. int. Pharmacodyn. 121, 134 (1959). – S. M. KUSKIN, S. C. WANG und R. RUGH, Amer. J. Physiol. 196, 1211 (1959).

² H. J. MELCHING und M. LANGENDORFF, Naturwiss. 44, 377 (1957). – Th. J. HALEY, A. M. FLESHER und L. MAVIS, Nature 192, 1309 (1961).

³ L. O. RANDALL, Dis. nerv. Syst. (USA) 21, 7 (1960).

⁴ A. LOCKER und E. KOFFER, Exper. 18, 28 (1962).

⁵ D. B. HOPE, Biochem. Soc. Symp. 17, 93 (1959).