

haemolymph, one-dimensional ascending paper chromatography was used³.

Since the preliminary examination of absorption spectrum and the ratio of optical density at 420 and 520 m μ indicated that there might be a number of keto acids present in the haemolymph, it was thought desirable to identify various keto acids present in the haemolymph chromatographically before any quantitative estimations were made. Data presented in the Table indicate that the dinitrophenylhydrazone derivatives of keto acids extracted from the haemolymph, resolved into two components having Rf's comparable with pyruvic and α -ketoglutaric acid, when subjected to paper chromatography. A further confirmation of the presence of pyruvic and α -ketoglutaric acid was obtained by eluting the areas corresponding to the Rf of pyruvic and α -ketoglutaric acid from the chromatograms and determining the ratio of optical density at 420 and 520 m μ . It was found to be from 1.22–1.3 for the component having Rf 0.46, and 1.98–2.10 for the slow-moving component (Rf 0.13). These ratios are characteristic of pyruvic and α -ketoglutaric acids².

The concentration of pyruvic acid in the haemolymph was found to be from 25–30 mM and that of α -ketoglutaric acid 8–10 mM. The presence of both pyruvic and α -ketoglutaric acid in the haemolymph of *Dysdercus* is

not in accordance with the findings reported for the haemolymph of *Bombyx mori* larvae where no pyruvic acid could be detected, although α -ketoglutaric, oxalacetic and glyoxylic acids were found to be present⁴. However, MURTY and SREENIVASAYA⁵ reported only pyruvic and three other unknown keto acids from the haemolymph of *Bombyx mori* larvae. Both pyruvic and α -ketoglutaric acid, nevertheless, have recently been reported from the haemolymph of *Hyalophora cecropia*.

These findings indicate that comparatively high concentrations of keto acids are present in the haemolymph of *Dysdercus* and that these keto acids must be playing a significant role in the ionic balance. The net contribution of keto acids to the total anionic pool, however, cannot be ascertained from the present study⁷.

Résumé. L'hémolymph de *Dysdercus koenigii* (Fabr.) est analysée pour la présence d'acides-kéto. La chromatographie-papier a démontré la présence d'acide pyruvique et d'acide α -ketoglutarique. La concentration de l'acide pyruvique a variée de 25 à 30 mM et celle de l'acide α -ketoglutarique de 8 à 10 mM.

K. N. MEHROTRA⁸

Department of Physiology, G.S.V.M. Medical College, Kanpur (India), December 12, 1963.

Paper chromatography of dinitrophenylhydrazone derivatives of keto acids

Substance	Rf
Pyruvic acid	0.46
α -Ketoglutaric acid	0.13
Oxalacetic acid	0.20
Haemolymph	0.46, 0.12
Solvent: <i>n</i> -butanol-ethanol-ammonia-water 70:10:5:20	

Note. Dinitrophenylhydrazone derivatives of keto acids and haemolymph were prepared for chromatography as outlined by BLOCK et al.⁶.

³ M. F. S. EL HAWARY and R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.* **53**, 340 (1953).

⁴ T. FUKUDA and T. HAYASHI, *J. Biochem. (Tokyo)* **45**, 469 (1958).

⁵ M. R. V. MURTY and M. SREENIVASAYA, *J. Sci. Ind. Res. (India)* **12A**, 314 (1953).

⁶ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM, and G. ZWIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis* (Academic Press, New York).

⁷ **Acknowledgments.** Thanks are due to Prof. S. R. KAPOOR for providing the laboratory facilities and for his keen interest in the problem. Appreciation is also expressed to the Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, for financial assistance.

⁸ Present address: Insect Physiologist, Division of Entomology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi (India).

Autoradiographische Studien über die DNS-Synthese im Hypophysenvorderlappen der Ratte¹

Über den Zellersatz im Hypophysenvorderlappen (HVL) und die DNS-Syntheserate unter funktioneller Belastung bestehen bisher noch keine sicheren Befunde. Es wurden daher autoradiographische Untersuchungen mit H³-Thyminidin an Kontrollen sowie 14 Tage nach Thyreoidektomie und Kastration durchgeführt. Männliche 185–190 g schwere Albinoratten (BD II) erhalten 500 μ C H³-Thyminidin i.p. (spez. Akt. 6,0 C/Mol, Schwarz Bio Research, New York). Dekapitation der Tiere 1 h nach Applikation – gegen Ende der Verfügbarkeitszeit von H³-Thyminidin, jeweils morgens zwischen 9 und 11 h. Paraffineinbettung der Hypophyse, Waschen der entparaffinierten Schnitte in hochkonzentrierter Lösung inaktiven Vor-

läufers zum Auswaschen nicht inkorporierten H³-Thyminidins. Stripping film (Kodak AR 10). Exposition 8–14 d. Nachfärbungen. Bestimmung des H³- und Mitoseindex (45 000–70 000 Parenchymkerne/Tier). Die Tabelle zeigt, dass der H³-Index bei den Kontrollhypophysen zwar sehr niedrig, aber nicht gleich 0² ist. Auf 10 000 Zellen finden sich im Mittel 12,2 markierte Kerne. Größenordnungsmässig kann diese Proliferationsrate mit der von Leberparenchymzellen der Ratte verglichen werden³. Nach

¹ Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung.

² R. M. NAKAMURA, D. S. MIYADA, and D. L. MOYER, *Nature* **199**, 707 (1963).

³ E. STÖCKER und H.-W. ALTMANN, *Naturwissenschaften* **51**, 15 (1964).

HVL	H ³ -Index	Mitose-Index	$Q = \frac{H^3\text{-Index}}{\text{Mitose-Index}}$	Generationszeit (d)
Kontrolle	0,085401	0,007268	11,75	365,92
	M = 0,121771	M = 0,013047	M = 10,08	M = 281,77
	0,158140	0,018826	8,40	197,61
Thyreoidektomie	0,104099	0,008533	12,20	300,20
	M = 0,139268	M = 0,011535	M = 12,10	M = 239,68
	0,174437	0,014536	12,00	179,15
Kastration	0,349217	0,042807	8,16	89,49
	M = 0,293829	M = 0,037468	M = 7,79	M = 110,27
	0,238441	0,032130	7,42	131,06

Thyreoidektomie steigt der mittlere H³-Index nur wenig, nach Kastration dagegen deutlich um den Faktor 2,5 gegenüber den Kontrollen an. Bei funktioneller Stimulation reicht also das Reservoir undifferenzierter 'Stammzellen' nicht aus, um der erhöhten Anforderung gerecht zu werden. Auch der Mitoseindex steigt an, wobei der Quotient H³-Index/Mitoseindex annähernd konstant bleibt. Die gefundenen Quotientwerte stimmen mit Befunden an anderen Zellpopulationen gut überein³⁻⁵. Bei etwa gleichbleibendem Quotient muss die DNS-Synthese im HVL ganz überwiegend nachfolgend zur Mitose führen, eine endomitotische Polyploidisierung bzw. Amitosen können bestenfalls nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Der Impuls für die funktionell induzierte Mitosewelle setzt dabei offenbar nicht an der Mitose selbst, sondern schon an der DNS-Reduplikationsphase an.

Unter der Voraussetzung, dass tageszeitliche Synchronisationen der verschiedenen Generationsphasen der Zelle in sehr langsam proliferierenden Organen nicht existieren^{6,7} und die Länge der DNS-Synthesephase im Mittel 7,5 h beträgt, kann man eine überschlagsmäßige Berechnung der Generationszeit der Parenchymzellen des HVL vornehmen. Bei den Kontrollen beträgt sie im Mittel 282 d, sie verkürzt sich 14 d nach Thyreoidektomie bzw. Kastration auf 240, bzw. 110 d. Diese – von einem «steady state» der Zellproliferation ausgehende – Berech-

nung bezieht sich auf das Gesamtkollektiv der HVL-Zellen. Freilich muss man damit rechnen, dass bei längeren Zeitintervallen zwischen Operation und Tötung bestimmte Teilkollektive der HVL-Zellen in eine mehr exponentielle Proliferationsphase eintreten, die zur Hyperplasie führt.

Summary. By autoradiographic studies with H³-thymidine it is demonstrated that the percentage of labelled nuclei is very low in the anterior pituitary of normal untreated rats and of rats 14 days after thyroidectomy. Following castration, however, a marked increase of DNA-synthesizing cells occurs as well as an increase of mitotic figures.

G. DHOM und E. STÖCKER

Pathologisches Institut der Universität Würzburg (Deutschland), 10. Februar 1964.

⁴ B. SCHULTZE und W. OEHLERT, *Science* 131, 737 (1960).

⁵ H. NOLTENIUS, H. H. SCHELLHAS und W. OEHLERT, *Naturwissenschaften* 51, 15 (1964).

⁶ C. PILGRIM, W. ERB und W. MAURER, *Nature* 199, 863 (1963).

⁷ C. PILGRIM, noch unveröffentlicht.

Phosphoproteinphosphatase Activity in Sea Urchin Embryos

Phosphoproteinphosphatase (Phosphoprotein phosphohydrolase EC.3.1.3.16) is considered to be one of the important enzymes involved in yolk utilization¹⁻⁹. However, in recent times its presence has been noted in a number of adult organs¹⁰⁻¹⁴. Changes in activity of the enzyme in the course of development may give a hint as to the rate at which yolk is utilized by the embryo. In this preliminary note the activity of phosphoproteinphosphatase (PPPase) has been studied during the development of *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* and compared with the known waves of rate of protein synthesis previously described^{15,16}.

Material and Methods. Eggs and embryos of *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* were used. Eggs were collected and washed by the usual methods¹⁵. Jelly coat was removed from the unfertilized and newly fertilized eggs by short exposure to acidified sea water (pH about 5.0). From the blastula stage onwards good homogenization is difficult to achieve. However, a quick washing in cold 0.22 M sucrose in $5 \cdot 10^{-4}$ M EDTA, pH 7.0, renders homogenization easier and more complete.

Homogenization was carried out either in 0.44 M sucrose in 10^{-3} M EDTA pH 7.0 or in 0.1 M KCl in acetate buffer 0.05 M.

A 12% solution of Hammarsten Casein (Merck Co.) prepared as described by LINDERSTRÖM-LANG and