

schen Atomabsorptionsverfahren eingesetzt. Im folgenden wird über die so ermittelten Analysenergebnisse von Magnesium und Zink berichtet.

Probenvorbereitung. Als Ausgangsmaterial diente uns Pulver von gefriergetrockneten Blättern von Feldsalat (*Valerianella olitoria*). Daraus wurden die Chloroplasten nach ¹ isoliert. Untersucht werden im folgenden nicht nur die «reinen» Chloroplasten (ca. 90%, Fraktion I), sondern auch Fraktionen geringeren Reinheitsgrades (II und III), sowie der «Abfall», der hauptsächlich aus Zellulosemembranen und Cytoplasma besteht. Die trockenen Proben werden gewogen und in Platintiegeln im Muffelofen bei 500°C fünf Stunden lang verascht. Die Asche wird gewogen und anschliessend mit 2N HCl aufgenommen. Die überschüssige Salzsäure wird durch Erhitzen weggedampft. Das trockene Chlorid wird im Verhältnis 1 g Asche auf 100 ml mit *aqua dest.* verdünnt. Die verdünnte Lösung wird für die Zinkanalyse im Verhältnis 1:5 mit *aqua dest.* bei den Mg-Analysen 1:100 mit 0,1N H₂SO₄ nachverdünnt. Die Verdünnung mit der Schwefelsäure dient entsprechend unseren früheren methodischen Untersuchungen² zur Unterdrückung des Störeinflusses von Phosphor auf die Magnesiumanzeige.

Eichlösungen. 0,02 g Mg; 0,06 g Ca; 0,005 g Fe; 0,20 g K; 0,005 g Na; 0,001 g Cu; 0,015 g Zn, alles als Chloride aufgefüllt auf 100 ml. Diese Zusammensetzung entspricht etwa dem Elektrolytgehalt von 1 g Chloroplastenasche auf 100 ml. Die Magnesium- bzw. Zink-Blindlösung haben die gleiche Zusammensetzung, nur fehlt bei der Mg-Blindlösung der Mg-Gehalt und entsprechend bei der Zn-

Blindlösung der Zn-Gehalt. Diese Eich- bzw. Blindlösungskonzentrate werden wie die Analysenlösungen vor der eigentlichen Messung nachverdünnt.

Ergebnisse. Wir erhielten aus je 2 verschiedenen Fraktionsgängen mit je 1- bis 3maligem Messen und Mittelwertbildung die in der Tabelle angeführten Ergebnisse.

Diskussion. Man sieht, dass die Mg- und die Zn-Konzentrationen mit zunehmender Reinheit der Fraktionen ansteigen. Im Vergleich zum «Abfall» liegt der Mg-Gehalt der reinsten Fraktion (I) 2,8mal und der Zn-Gehalt 2,7mal höher. Auffällig ist, dass der Anstieg des Zn-Gehaltes weitgehend dem des Mg-Gehaltes entspricht. Dies spricht dafür, dass Zink ebenfalls ein typischer Bestandteil der Chloroplasten ist. Da bei dem von uns angewandten Trennverfahren keinerlei Substanzverluste auftreten können, ist anzunehmen, dass die von uns gefundenen Werte selbst unter Berücksichtigung der 10% Verunreinigungen durch anderes Blattmaterial den Werten *in vivo* sehr nahe kommen. Bei Untersuchungen an wässrig oder nichtwässrig isolierten Chloroplasten dürften die Fehler durch nicht kontrollierbare Extraktionen ungleich höher liegen. Diese Extraktionsverluste können sowohl die zu bestimmenden Elemente als auch andere Bestandteile betreffen und dadurch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Werte am isolierten Material bewirken³.

Summary. The Mg- and Zn-content was determined with atomic absorption in chloroplasts isolated with a new dry method by BEHRENS et al.

R. HERRMANN und W. NEU

Abteilung für Medizinische Physik, Universitäts-Hautklinik; und Abteilung für Zell- und Gewebechemie am Physiologisch-Chemischen Institut, Justus Liebig-Universität, Giessen (Deutschland), 12. März 1965.

Mg- und Zn-Gehalt in % der Asche			
Fraktion	Aschegehalt in % des Trockengewichtes	Mg	Zn
I	6	5,12	0,37
II	11	3,55	0,24
III	16	2,49	0,22
Abfall	10	1,82	0,14

² R. HERRMANN und W. LANG, Z. ges. exp. Med. 135, 569 (1962).
³ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung, Frau B. GUTSCHE für die Durchführung der Absorptionsuntersuchungen, Frl. H. JUNKER für die Isolierung der Chloroplasten.

Repressed Chromatin from Virus Infected and from Differentiated Cells¹

The ability of DNA to serve as a primer for RNA synthesis is restricted during the process of differentiation. When erythrocytes reach the maximum level of functional specialization, the nucleus is either completely eliminated or, if as in bird erythrocytes it is still present, its functions are more and more limited during maturation, till the entire genome is turned off². Elimination of nuclear function was also observed in cells infected by a number of picornaviruses³⁻⁷.
In the present experiments, Ehrlich ascites cells (EAC) were infected for 7 h with Maus-Elberfeld (ME) virus⁸. Suspensions of infected or uninfected cells in swirling cultures at 37°C were labeled for 30 min with 2 µc of L-

arginine-C¹⁴, thymidine methyl-H³ or uridine-H³ (specific activities per mM, 17, 1600 and 3200 mc) for each 1 ml of packed cells.

¹ This work was supported by the Cancer Research Fund of the University of California and by U.S.P.H.S. Grant CA-08192-1.
² T. L. CAMERON and D. M. PRESCOTT, Exp. Cell Res. 30, 609 (1963).
³ E. M. MARTIN, J. MALEC, S. SVED, and T. S. WORK, Biochem. J. 80, 585 (1961).
⁴ R. M. FRANKLIN and D. BALTIMORE, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 27, 175 (1962).
⁵ P. HAUSEN and W. SCHÄFER, Z. Naturf. 17B, 15 (1962).
⁶ J. J. HOLLAND, Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 556 (1962).
⁷ E. F. ZIMMERMAN, M. HEETER, and J. E. DARNELL, Virology 19, 400 (1962).
⁸ V. HOLOUBEK and R. R. RUECKERT, Biochem. biophys. Res. Commun. 15, 166 (1964).

Chicken blood was collected from the carotid artery into siliconized tubes and centrifuged. The packed cells were suspended in Dulbecco buffer with 0.4% versene, centrifuged and leucocytes were removed from the top layer. This operation was repeated three times. After the last centrifugation the erythrocytes were resuspended in Earle's saline to $5 \cdot 10^8$ cells/ml and labeled at 37°C for 30 min as described for EAC.

After labeling the cells were chilled and washed three times with cold Dulbecco buffer. Nuclei were isolated, fractionated into DNA, RNA, acid soluble proteins (histones) and acid insoluble residual proteins; and the specific activity of each fraction was determined as described previously⁸.

Nuclei from uninfected EAC, from 7 h-infected EAC and from chicken erythrocytes were used for preparation of chromatin by the method of BONNER et al.⁹ For trypsin digestion the chromatin was dispersed in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, containing 10^{-3} M MgCl₂, and incubated for 5 min at 37°C with 1 mg of trypsin (Worthington, 2× crystallized) per 50 mg of chromatin. After 25 min 0.2 mg of soybean trypsin inhibitor (Mann Research Lab. Inc., 5× crystallized) per 1 mg of trypsin was added and the treated chromatin recentrifuged on 1.9 M sucrose as described for chromatin isolation⁹. Trypsin hydrolysis removed about 70–80% of the total histone as estimated from the ratio of DNA to acid soluble protein. DNA from chromatin was isolated by the procedure described by KAY et al.¹⁰.

RNA polymerase for use in a cell-free system was prepared from log-phase cells of *E. coli* and the enzyme was purified through ammonium sulfate precipitation as described by CHAMBERLIN and BERG¹¹. Details of the assay mixture are described in the Table. The mixture was incu-

bated for 10 min at 37°C. The tubes were then chilled, 0.1 ml of 0.2% bovine serum albumin were added and the mixture precipitated with 3 ml 5% trichloroacetic acid.

The precipitate was washed, the final pellet was dispersed in 3 ml of water and aliquots used for radioactivity measurement in the Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer.

Noninfected EAC labeled for 30 min with arginine-C¹⁴, thymidine-H³ or uridine-H³ developed marked specific activities in acid soluble nuclear proteins (2835 CPM/mg), DNA (1728 CPM/mg), RNA (5760 CPM/mg) and residual nuclear proteins (2085 CPM/mg). In EAC infected for 7 h with ME virus the turnover of all fractions in the nucleus was suppressed to 10% of the labeling of uninfected cells. Low levels of incorporation of label still present in nuclei of infected EAC can be explained by contamination with noninfected cells. The nuclei of chicken erythrocytes were completely inactive and no label was incorporated.

Chromatin isolated from infected cells and from erythrocytes was unable to serve as template for RNA synthesis in the cell-free system (Table). After tryptic digestion the priming activity of chromatin from infected EAC and from erythrocytes became greater than from noninfected control EAC. After complete removal of all proteins from DNA with detergent, an additional substantial increase in priming activities was achieved. The priming activities of DNA isolated with detergent from all three types of cell were identical.

In experiments with Mengo virus-infected L-cells FRANKLIN and BALTIMORE⁴ found a suppression of the RNA synthesizing ability of an 'aggregate enzyme', an aggregation of deoxyribonucleoprotein with RNA-polymerase. The mechanism of this suppression was not at that time understood. In a previous publication⁸ it was postulated that the suppression of nuclear RNA synthesis by picornaviruses was the result of blockade of DNA priming capabilities in host cells. Present results are in agreement with this hypothesis and suggest an explanation for the suppression of the 'aggregate enzyme' of FRANKLIN and BALTIMORE⁴. Present data also support the conclusion that the mechanism of this blockade can be similar to the one by which the expression of information from genomal DNA is more and more limited during cell differentiation until, as in the case of erythrocyte nuclei, it is suppressed completely¹².

Zusammenfassung. Aus Virus-infizierten Zellen isoliertes Chromatin wurde mit dem Erythrocytenchromatin verglichen. Die durch Infektion oder Differenzierung verlorene Kapazität des Chromatins der RNS-Syntheseunterstützung wird durch Entfernung eines Teiles des Proteins wieder hergestellt.

V. HOLOUBEK

University of California School of Medicine,
Cancer Research Institute, San Francisco
(California USA), January 19, 1965.

RNA synthesis priming activity of chromatin or of DNA from infected and control EAC and from chicken erythrocytes

Addition to otherwise complete reaction mixture	$\mu\mu\text{moles}$ ATP-8-C ¹⁴ incorporated/mg DNA
Chromatin from EAC	72
Chromatin from infected EAC	32
DNA from EAC, deproteinized	214
DNA from infected EAC, deproteinized	230
Chromatin from EAC, digested for 30 min by trypsin	114
Chromatin from infected EAC, digested for 30 min by trypsin	97
Chromatin from chicken erythrocytes	23
Chromatin from chicken erythrocytes digested for 30 min by trypsin	169
DNA from chicken erythrocytes, deproteinized	296
Complete reaction mixture without DNA or chromatin	24

In total volume of 0.5 ml the complete reaction mixture includes 20 μmoles Tris pH 8.0, 2 μmoles MgCl₂, 0.5 μmoles MnCl₂, 6 μmoles β -mercaptoethanol, 0.2 μmoles each of GTP, CTP, UTP and ATP-8-C¹⁴ (8.1 $\mu\text{C}/\mu\text{moles}$), 100 μg DNA (as deproteinized DNA or as chromatin containing 100 μg DNA and *E. coli* RNA polymerase preparation containing 95 μg protein).

⁹ J. BONNER, R. C. HUANG, and R. V. GILDEN, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 50, 893 (1963).

¹⁰ E. R. M. KAY, N. S. SIMMONS, and A. L. DOUNCE, *J. Am. chem. Soc.*, 74, 172 (1952).

¹¹ M. CHAMBERLIN and P. BERG, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 81. (1962).

¹² Author wishes to express his gratitude to Mrs. LOIS FANSHIER for her excellent technical assistance. It is a pleasure to acknowledge the invaluable benefits derived from association and stimulating discussions with Dr. T. TIMOTHY CROCKER during the course of this work.