

Localization of the Exogenous Fluorescent Histones in Ehrlich Ascites Tumour Cells

It has been reported that histones show an inhibitory action on the growth of different tumorous tissues and cells¹⁻⁴. It has recently been shown in this laboratory that the inhibitory effect is independent of the kind of histones used⁴. The present paper deals with the localization of the fluorescent histones in Ehrlich ascites tumour (EAT) cells incubated in vitro with some fluorescent histone derivatives.

Materials and methods. The whole thymus histones (WTH) from fresh calf thymus gland were extracted as previously reported⁴. The calf thymus histone fractions F1, F2a, F2b and F3 were prepared according to the method of JOHNS⁵. The fluorescent conjugates of the histones were prepared with Lissamine Rhodamine B 200 (Gurr, London) as recommended by CHADWICK et al.⁶. The conjugates were purified from free dye by gel filtration on a Sephadex G25 column. Heterogeneity of the histone samples was controlled by starch gel electrophoresis⁷. The UV-microscopy was carried out with a Zeiss light source (Mikroskopierleuchte L, Zeiss, Jena) and by using an UV-filter (UG1/3,5) and a blue filter (BG3/2), with a yellow filter (GG9) above the object.

The EAT cells were used on the 8th to 10th days after transplantation. Since it was found that the uptake of the basic proteins reaches a maximum within the first 60 min^{2,8}, a washed suspension of EAT cells ($1.0-1.8 \cdot 10^6$ cells/ml) in phosphate-buffered saline was incubated in the presence of the respective fluorescent histone (500 μ g/ml) for 15-60 min at 4°C and at 22°C. In another experiment, according to the optimal tumour inhibitory condition reported by VOROBYEV et al.³, the time of incubation was increased to 16-18 h at 4°C and at 22°C. The nuclei from the fluorescent EAT cells were isolated by the FISHER and HARRIS⁹ method.

Results and discussion. In the first experiments (15-60 min incubation) the very highly intense fluorescence of the WTH was found in some areas of the cell surface in the form of large amorphous aggregates, while in others as grain-like loading (Figure, A and B). The WTH-treated cells were agglutinated; the fluorescent histone occupying a narrow intercellular layer (Figure, C), as already demonstrated by KORNGUTH et al.¹⁰ in the case of fluorescent polylysine. The fluorescent WTH was detected on the membrane of most EAT cells, being also demonstrated in the nucleus of some tumorous cells (Figure, A).

In the second experiments (16-18 h incubation) the fluorescence was found not only on the surface of cells but also on the nuclear envelope and in the nucleolus (Figure, D and E).

This fact could be demonstrated in the sections of the fluorescent EAT cells and also on the isolated nuclei. A very weak diffuse fluorescence was present in the cytoplasm. The surface of the nuclear envelope was uniformly covered with histone, while in the nucleoplasm no fluorescent histone was adsorbed, inasmuch as it failed to contain any free acidic areas. This phenomenon may be due to the fact that in the interphase nucleus no free DNA, with histones uncovered, is available in greater quantity¹¹.

The WTH fractions showed a similar localization; while the F1 fraction gave a very weak fluorescence, and in this case the agglutination of the cells could not be detected.

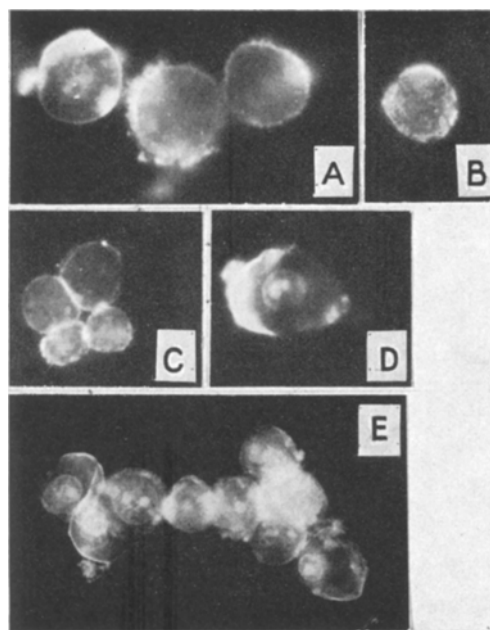
The penetration of histones into the EAT cells is not the result of an active process, since essentially there was no difference in the localization of histones incubating the

cells at 4°C or at 22°C. Similar observations were also made with another basic protein⁸.

A change was demonstrated in the membrane permeability of EAT cells. After a 15 min incubation with histones, a rapid penetration of the dye molecules (Nigrosine¹² or Eosine¹³) into the cells was already observed. After a short incubation with protamine, BECKER and GREEN² also found some cytochemical changes in the EAT cells. This alteration of the cell membrane may be due to the detergent action of histone molecules.

It seems that the non-modified molecules of the fluorescent histone were those which penetrated into the cells and accumulated within them, because the EAT cells incubated with hydrolysed fluorescent WTH (by proteolytic enzymes³) for 60 min or for 16 h at 4°C gave an entirely different picture. In this case, only a few cells had a very diffuse fluorescence and it is very likely that the hydrolysed fragments of the fluorescent WTH penetrated only into the dead cells.

It seems very likely that the penetration of histone molecules across the damaged cell membrane occurs by a simple diffusion. Nevertheless, at present the possibility cannot be precluded that the penetration of this protein



¹ I. B. ZBARSKII and K. I. PEREVOSHCHIKOVA, Byull. eksp. Biol. Med. 38, 61 (1954).

² F. F. BECKER and H. GREEN, Expl. Cell Res. 19, 351 (1960).

³ V. I. VOROBYEV and V. M. BRESSLER, Nature 198, 545 (1963).

⁴ V. A. BLAZSEK and F. GYERGVAY, Expl. Cell Res. 38, 424 (1965).

⁵ E. W. JOHNS, Biochem. J. 92, 55 (1964).

⁶ C. S. CHADWICK, M. G. McENTEGART, and R. C. NAIRN, Immunology 7, 315 (1958).

⁷ E. W. JOHNS, D. M. P. PHILLIPS, P. SIMPSON, and J. A. V. BUTLER, Biochem. J. 80, 189 (1961).

⁸ V. N. SCHUMAKER, Expl. Cell Res. 15, 314 (1958).

⁹ H. W. FISHER and H. HARRIS, Proc. R. Soc. B 156, 521 (1962).

¹⁰ S. E. KORNGUTH, M. A. STAHMANN, and J. W. ANDERSON, Expl. Cell Res. 24, 484 (1961).

¹¹ H. BUSCH, Expl. Cell Res., Suppl. 9, 387 (1963).

¹² J. P. KALTENBACH, M. H. KALTENBACH, and W. B. LYONS, Expl. Cell Res. 15, 112 (1958).

¹³ J. H. HANKS and J. H. WALLACE, Proc. Soc. expl. Biol. Med. 98, 188 (1958).

into the perinuclear cisterna may take place in a direct way, namely through the endoplasmic reticulum, which 'appears to be continuous with the cell membrane and the nuclear membranes'¹⁴ (see 15-17).

A detailed study of these observations will be reported elsewhere.

Résumé. Les auteurs ont étudié la localisation des histones fluorescents dans des cellules tumorales d'ascites Ehrlich soumises à l'incubation in vitro avec les dérivés fluorescents de l'histone de thymus bovin ou avec quelques fractions du même histone. Ils ont démontré qu'après une incubation de courte durée les histones ont été adsorbés sur la surface des cellules, tandis que lors

d'une incubation de longue durée les histones ont réussi à pénétrer dans les cellules.

V. A. BLAZSEK and F. GYERGYAY

*The Research Unit of the Academy of Sciences, and
Institute of Medicine and Pharmacy, Tîrgu-Mures
(Rumania), October 6, 1965.*

¹⁴ G. E. PALADE, J. biophys. biochem. Cytol. 1, 567 (1955).

¹⁵ A. E. MIRSKY and S. OSAWA, in *The Cell* (Academic Press, New York 1961), vol. II, p. 693.

¹⁶ S. L. PALAY, J. biophys. biochem. Cytol. 7, 391 (1960).

¹⁷ C. M. FELDHER, J. Cell Biol. 14, 65 (1962).

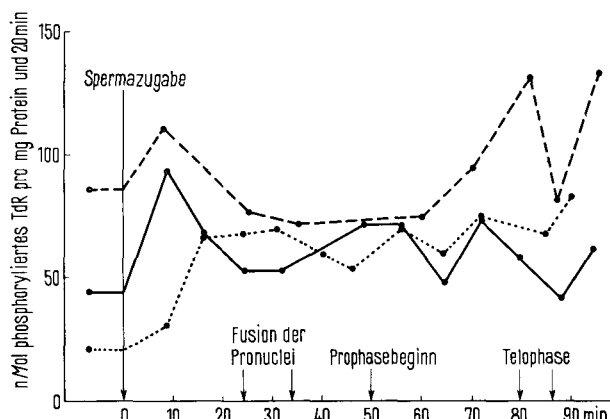
Aktivitätsverlauf der enzymatischen Phosphorylierung von Thymidin während der Entwicklung des Seeigels *Psammechinus miliaris* von der Befruchtung bis zum Zweizeller

In neuester Zeit sind Beispiele bekannt geworden, die darlegen, dass die Periode der DNS-Synthese im Zellzyklus mit einem Aktivitätsanstieg der TdR-Kinase¹ eingeleitet wird^{2,3}. Die Bereitstellung der Desoxynucleotriphosphate als Substrat der Polymerisationsreaktion gilt als wichtigste Voraussetzung der DNS-Synthese. Eine Reihe von Beobachtungen spricht dafür, dass sowohl die Bildungsrate als auch die aktuelle Aktivität der Enzyme, die an der Bildung der Desoxynucleotidtriphosphate – besonders aber von d-TTP¹ – beteiligt sind, einer Kontrolle unterliegen. Die Rolle des Regulators wird der Konzentration an freien Desoxynucleotiden in der Zelle zugeschrieben⁴⁻⁷. OKAZAKI und KORNBERG⁸ konnten an einem gereinigten Präparat aus *Escherichia coli* den Einfluss von inhibierenden Nucleotiden (d-TTP) und diese Hemmung wieder aufhebenden Nucleotiden (d-CDP)¹ auf die Reaktionskinetik der TdR-Kinase demonstrieren. HOTTA und STERN⁹ konnten zeigen, dass der steile Anstieg der TdR-Kinaseaktivität in den Mikrosporen von Lilien nach Abschluss der Meiose auf eine Neubildung von Enzymprotein zurückgeht.

In diesem Zusammenhang kommt den Eiern von Amphibien und Seeigeln ein besonderes Interesse zu, da diese Zellen einen umfangreichen Speicher an d-Nucleotiden enthalten⁹⁻¹¹, dem – einer verbreiteten Meinung nach – das Material zum Aufbau der während der Furchung rasch ansteigenden Kernmasse entnommen wird. Es stellt sich hierbei die Frage, ob eine Regulation der Bildungsrate von TdR-Kinase auch in Gegenwart eines umfangreichen Pools an d-Nucleotiden möglich ist. Zur Prüfung dieser Frage bieten sich Seeigeleier an, da sich die Eier eines Geleges während der frühen Furchungen synchron teilen. Es wurde untersucht, ob nach der Befruchtung der Eier die Aktivität der Phosphorylierung von TdR im Einklang mit dem Teilungszyklus rhythmisch schwankt, wie bei den bisher untersuchten Objekten, oder ob sich ein mehr oder weniger gleichbleibendes Aktivitätsplateau einstellt.

Die Eier wurden in 100–150 ml Meerwasser suspendiert und entwickelten sich bei 15°C. Im Abstand von 8–10 min wurden 2ml-Proben entnommen. Die abzentrifugierten Eier wurden in einer Pufferlösung (0,05 m Glycylglycinepuffer pH 7,8, 0,35 µm TdR) homogenisiert und bis zur

Weiterverarbeitung ca. 2 h bei 0°C aufbewahrt. Kinase-test: 7,9 µl Homogenat wurden mit 7,9 µl Inkubationsmedium 20 min bei 37°C inkubiert. Zusammensetzung des Inkubationsmediums in µMol: 0,48 Tris-HCl pH 7,8, 0,19 MgCl₂, 0,10 ATP, 0,465 m µMol H³-TdR (0,148 µCi). Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach der von DUSPIVA und HANSEN-DELKESKAMP¹² beschriebenen



Aktivitätsverlauf der enzymatischen Phosphorylierung von TdR bei *Psammechinus miliaris*. Jede der dargestellten Kurven wurde mit Eiern eines Weibchens gewonnen.

¹ TdR = Thymidin, d-TTP = Desoxythymidintriphosphat, d-CDP = Desoxycytidintriphosphat.

² Y. HOTTA und H. STERN, J. Cell Biol. 11, 311 (1961).

³ W. SACHSENMAIER, Biochem. Z., im Druck.

⁴ G. E. STONE und D. M. PRESCOTT, J. Cell Biol. 21, 275 (1964).

⁵ G. E. STONE, O. L. MILLER und D. M. PRESCOTT, J. Cell Biol. 25, 171 (1965).

⁶ Y. HOTTA und H. STERN, J. Cell Biol. 25, 99 (1965).

⁷ F. DUSPIVA, in 3. Symposium für Naturforscher und Ärzte (Springer-Verlag, Heidelberg), im Druck.

⁸ R. OKAZAKI und A. KORNBERG, J. biol. Chem. 239, 269 (1964).

⁹ E. HOFF-JORGENSEN, Proc. of the 7. Symposium Colston Res. Soc., p. 79 (1954).

¹⁰ M. IZAWA, V. G. ALFREY und A. E. MIRSKY, Proc. natn Acad. Sci. USA 50, 811 (1963).

¹¹ Y. SUGINO, Biochem. biophys. Acta 35, 376 (1960).

¹² F. DUSPIVA und E. HANSEN-DELKESKAMP, Z. Naturf. 20b, 582 (1965).