

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 tumoreuses 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-Mureş (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. FELDHERR, *J. Cell Biol.* **14**, 65 (1962).

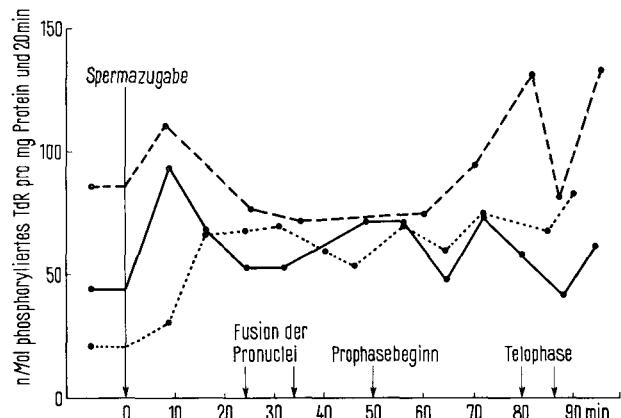
Aktivitätsverlauf der enzymatischen Phosphorylierung von Thymidin während der Entwicklung des Seeigels *Psammechinus miliaris* von der Befruchtung bis zum Zweizeller

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 Glycylglycinpuffer pH 7,8, 0,35 µm TdR) homogenisiert und bis zur

Weiterverarbeitung ca. 2 h bei 0°C aufbewahrt. Kinasetest: 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 µC). 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-JØRGENSEN, Proc. of the 7. Symposium Colston Res. Soc., p. 79 (1954).

¹⁰ M. IZAWA, V. G. ALLFREY 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).

Methode und die Proteinbestimmung nach Angaben von LOWRY et al.¹³.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in der Figur dargestellt. Es treten rhythmische Aktivitätsänderungen auf. Der erste Aktivitätsgipfel wird ca. 10 min nach der Befruchtung, ein weiterer während der Anaphase der ersten Furchungsteilung erreicht. In zwei Versuchen zeichnete sich außerdem eine gesteigerte Aktivität im Metaphasestadium ab. Es bestehen jedoch bei verschiedenen Eiern deutliche Unterschiede im Aktivitätsverlauf der TdR-Phosphorylierung, die wir auf einen unterschiedlichen Reife- bzw. Überreifezustand der Eier im Ovar zurückführen möchten.

Die rhythmischen Aktivitätsschwankungen zeigen, dass die d-Nukleotidreserve der Eier eine gewisse Periodizität der Phosphorylierung von TdR in Abhängigkeit vom Zellzyklus nicht zu unterdrücken vermag. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch an Kröteneiern (*Bufo bufo*) gewonnen.

Aus radioautographischen Untersuchungen an *Echinococcus parma*¹⁴ und aus biochemischen Analysen an *Strongylocentrotus purpuratus*¹⁵ geht hervor, dass die erste DNS-Synthesephase ca. 30 min nach der Befruchtung noch vor dem Verschmelzen der Pronuclei beginnt,

die zweite und die folgenden Synthesphasen während der Telo- und frühen Interphase der Furchungsteilungen einsetzen. Die Gipfel des beobachteten Aktivitätsverlaufes der TdR-Phosphorylierung liegen – wie auch bei den bisher bekannten Fällen – jeweils vor Beginn der zugehörigen Synthesphasen von DNS.

Summary. Although the eggs of sea urchins contain a large quantity of d-nucleotides, the activity of TdR-kinase shows rhythmical variations during mitosis. The activity increased before the beginning of DNA-synthesis.

E. HANSEN-DELKESKAMP und F. DUSPIVA

Zoologisches Institut der Universität, Heidelberg (Deutschland), 9. Dezember 1965.

¹⁴ E. B. SIMMEL und A. D. KARNOFSKY, J. Cell Biol. 10, 59 (1961).

¹⁵ R. T. HINEGARDNER, B. RAO und D. E. FELDMAN, Exp. Cell Res. 36, 53 (1964).

¹³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 256 (1951).

The Distribution of Bilirubin in Rat Liver Fractions

The development of a method to measure bilirubin in liver¹ has enabled a study of the distribution of bilirubin in liver after intravenous infusion of the pigment to be made. The method has also enabled a study of the amount of bilirubin in the tissues of jaundiced GUNN² rats to be made. These concentrations have previously been determined using [¹⁴C]-bilirubin³.

Bilirubin was dissolved in aqueous sodium bicarbonate-sodium chloride⁴ solution and infused intravenously for 30 min into anaesthetized rats. Sufficient bilirubin was infused to produce the serum level of bilirubin found in the GUNN rats investigated (8–12 mg/100). After 30 min the animals were killed, the livers perfused with warm saline and then fractionated into nuclear, mitochondrial, microsomal and cell sap fractions⁵. Livers from male and female jaundiced GUNN rats were fractionated in a similar manner. Bilirubin was determined in the fractions from each set of experiments after resuspending the particulate material in phosphate-citric acid buffer (pH 2.2)⁶. GUNN rat tissues were homogenized in phosphate-citric acid buffer (pH 2.2) and bilirubin determined. Serum bilirubin levels were determined by the method of MALLOY and EVELYN⁷.

The amount of bilirubin in the tissues of male and female jaundiced GUNN rats was determined as shown in the Table. The livers of 14 male and female jaundiced GUNN rats were fractionated and the bilirubin determined in the subcellular fractions (Figure 1). Almost identical means were obtained for the male and female GUNN rats. Figure 2 shows the amount of bilirubin in the subcellular fractions of Wistar rat liver infused with bilirubin for 30 min.

The amounts of bilirubin found in GUNN rat tissues is similar to that found using [¹⁴C]-bilirubin³. Brain tissue

contains only small amounts of bilirubin when determined by both methods. Jaundiced GUNN rats are deficient in UDP-transglucuronylase (uridine diphosphate glucuronate glucuronyl transferase, acceptor unspecific EC 2.4.1.17) using bilirubin as a substrate. The distribution of bilirubin in the subcellular fractions of the liver shows that there is little bilirubin in the microsomal fraction, where the enzyme is situated; most of the bilirubin is in the cell sap. In the infusion experiments using Wistar rats, more is found in the microsomal fraction and less in the cell sap.

Bilirubin concentrations in organs of jaundiced GUNN rats

Tissue	Bilirubin $\mu\text{g/g}$			
	Male		Female	
	Range	Mean	Range	Mean
Liver	52–76	62 \pm 7 (7)	59–68	62 \pm 2 (6)
Spleen	23–54	36 \pm 13 (7)	28–62	47 \pm 17 (4)
Kidney	28–45	39 \pm 7 (7)	37–58	49 \pm 7 (6)
Ileum	13–19	17 \pm 3 (7)	11–27	15 \pm 7 (5)
Lung	34–62	41 \pm 10 (7)	14–63	46 \pm 13 (6)
Brain	6–18	11.5 \pm 4 (7)	3–18	12 \pm 5 (6)

Mean values are \pm I.S.D. Number of animals in parentheses.

¹ T. HARGREAVES, Clinica chim. Acta 11, 278 (1965).

² C. H. GUNN, J. Hered. 29, 137 (1938).

³ R. SCHMID und L. HAMMAKER, J. clin. Invest. 42, 1720 (1962).

⁴ K. WEINBREN und B. H. BILLING, Br. J. exp. Path. 37, 199 (1956).

⁵ W. C. SCHNEIDER und G. H. HOGEBOOM, J. biol. Chem. 183, 123 (1950).

⁶ T. C. McILVAINE, J. biol. Chem. 49, 183 (1921).

⁷ H. T. MALLOY und K. A. EVELYN, J. biol. Chem. 117, 481 (1937).