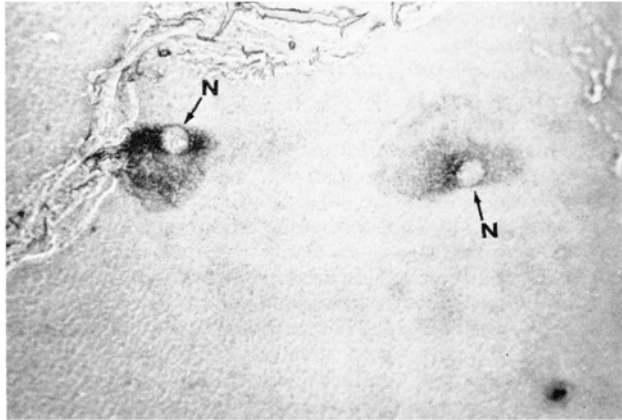


cholesterol⁶ (6 μ C/ml media) for 12 h. The cultured cells in slides were rinsed well and fixed with 10% formalin solution. Further autoradiographic procedure was made by the method reported previously⁹. The Figure illustrates that the high density of tritiated cholesterol is incorporated into cytoplasm of aortic cells. However, H³-grains in nuclei are negligible. The first migrated intact cells from aortic segments were mostly round or oval and seem to be referred to as endothelial cells¹⁰. The same observation was made in fibroblastic aortic cells cultured more slowly

than endothelial cells. Thus, evidence is presented that the cytoplasm is the site of the entry of H³-cholesterol in monkey aortic cells.

Species differences appear to be of importance in understanding the metabolism of cholesterol in aortic cells¹¹. However, the data obtained here clearly indicate that the synthesis and transport of cholesterol in aortic cells are very high in dynamic cellular levels in cultured environments. Analyses of such high metabolic activities in cells appear promising in studying cellular mechanisms which may be masked in vivo environments.



Incorporation of tritiated cholesterol into cytoplasm of monkey aortic cells. Note the absence of H³-grain in the nucleus (N). No staining. $\times 960$.

Zusammenfassung. Synthese und Transport von Cholesterin in Hühner-Aortazellen wurden untersucht: 1. grösste Inkorporationsrate von C¹⁴-Acetat in der Sterin-Fraktion, 2. verminderte Aufnahme von C¹⁴-Cholesterin in Aortazellen nach ihrer Inkubation mit lipämischem Menschenserum. Der Eintritt von H³-Cholesterin in das Zytoplasma der Aortazellen von Affen wurde autoradiographisch festgestellt.

K. MURATA

*Department of Physical Therapy and Medicine,
Faculty of Medicine, University of Tokyo (Japan),
28 June 1968.*

⁹ K. MURATA, *Experientia* 23, 732 (1967).

¹⁰ T. KASAI and O. J. POLLAK, *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 62, 743 (1964).

¹¹ D. L. AZARNOFF, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 680 (1958).

Histone bei dem Phycomyceten *Allomyces arbuscula* (Butl.)

Das Vorkommen von Histonen in höheren Organismen ist gesichert, dagegen ist über ihre Existenz und Funktion bei Mikroorganismen noch wenig bekannt. Seit den Untersuchungen von ALLFREY¹ und BONNER² setzt sich immer mehr die Auffassung durch, dass die basischen Proteine der Zellkerne, vor allem Histone, eine wichtige Rolle als Regulatoren der Genfunktion spielen. Da auch bei dem Phycomyceten *Allomyces arbuscula* eine Reihe interessanter gengesteuerter Differenzierungsprozesse beschrieben wurden³⁻⁶, erschien es lohnend, das Vorkommen von Histonen bei Gametophyt und Sporophyt dieses Pilzes zu analysieren.

Es war nicht möglich, Kerne von Zytoplasma und Hyphenwandresten zu trennen; wir verwendeten darum als Ausgangsmaterial lyophilisiertes Mycel, das homogenisiert und mit Äther und Aceton entfettet wurde. Die Extraktion der basischen Proteine erfolgte mit 0,5N HCl bei 0°C.

100 mg Mycel ergaben eine Ausbeute von ca. 200 μ g basischen Proteinen (Bestimmung nach LOWRY). Mit Hilfe der Polyacrylamid-Elektrophorese nach ORNSTEIN⁷ und DAVIS⁸ in der Modifikation von SHEPHERD und GURLEY⁹ wurden Proben von 80 μ g aufgetrennt. Die Figur zeigt das Ergebnis: Die Trägergele enthalten mindestens 16 Bänder. Die Bändermuster von Sporophyt und Gametophyt sind qualitativ identisch, und zwar sowohl für undifferenziertes als auch differenziertes (Hyphen mit Sporangien bzw. Gametangien) Mycel.

Quantitative Unterschiede sind ebenfalls nicht mit Sicherheit zu konstatieren.

Zur Untersuchung der Histone gingen wir von 1000 mg lyophilisiertem Mycel aus und folgten der für pflanzliches Material ausgearbeiteten Methode von IWAI¹⁰. Dabei wurde das Mycel homogenisiert und zunächst mit 1,5M NaCl zweimal bei 0°C extrahiert. Nach Präzipitierung der im Überstehenden befindlichen Desoxynukleoproteine durch Verdünnung auf 0,5M NaCl und Zufügen von 2 Vol. Äthanol (24-48 h) erfolgte aus dem sehr geringen Präzipitat die Extraktion des Histonanteils mit 0,5N HCl bei 0°C. Diesem Extrakt wurden 2 Vol. Äthanol (pH 10) zugefügt. Nach 48 h bei 0°C war kein oder nur äusserst geringes Präzipitat zu bemerken. Die Eiweissbestimmung nach LOWRY im Zentrifugat ergab keine messbare Proteinmenge. Nach Polyacrylamid-Elektrophorese⁹ traten keine Bänder auf. Aus diesem Ergebnis

¹ V. G. ALLFREY, V. C. LITTAU und A. E. MIRSKY, *Proc. natn. Acad. Sci.* 49, 414 (1963).

² J. BONNER und R. C. HUANG, *J. molec. Biol.* 6, 169 (1963).

³ S. K. DELONG, *Am. J. Bot.* 52, 999 (1965).

⁴ P. FÄHNRIK, *Z. Vererb. 92*, 8 (1961).

⁵ C. STUMM, *Z. Vererb. 89*, 521 (1958).

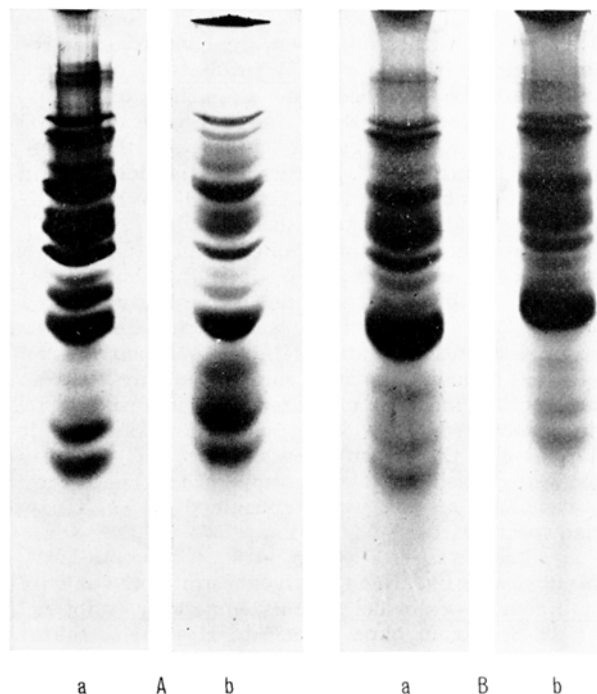
⁶ G. TURIAN, *Devl. Biol.* 6, 61 (1963).

⁷ L. ORNSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321 (1964).

⁸ B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).

⁹ G. R. SHEPHERD und L. R. GURLEY, *Analyt. Biochem.* 14, 356 (1966).

¹⁰ K. IWAI, in *The Nucleohistones* (Ed. J. BONNER und P. Ts'o, Holden-Day, San Francisco 1964).



Muster der basischen Proteine von *A. arbuscula* nach 120 min Elektrophorese bei 4 mA/Trägergel; aufgebrachte Proteinmenge 80 µg/Trägergel. (A) Sporophyt, (a) vegetative Hyphen, (b) differenzierte Hyphen (mit Sporangien); (B) Gametophyt, (a) vegetative Hyphen, (b) differenzierte Hyphen (mit Gametangien).

ist zu schliessen, dass das oben beschriebene Bändermuster der basischen Proteine keine Histone enthält.

Unsere Resultate, die darauf hinweisen, dass Histone bei *A. arbuscula* nicht oder nur in Mengen $< 5 \mu\text{g}/1000 \text{ mg}$ Ausgangsmaterial vorhanden sind, sind bemerkenswert im Hinblick auf die Funktion der Histone als Repressoren der DNS-Transkription durch RNS-Polymerase¹¹. Auch *Escherichia coli* besitzt keine Histone¹², und es wird angenommen, dass die Transkription auf andere Weise reprimiert wird. Bei *A. arbuscula* liegt möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus vor¹³.

Summary. Electrophoresis on acrylamide gel of basic proteins from the fungus *Allomyces arbuscula* (Butl.) yielded at least 16 bands. No differences were found between the banding-patterns of sporophyte and gametophyte. Extraction of histones from 1000 mg lyophilized mycelium and subsequent electrophoresis produced no bands. If histones are present at all, their concentration must be extremely low ($< 5 \mu\text{g}/1000 \text{ mg}$ material).

C. STUMM und J. L. VAN WENT

Genetisches Institut der Universität
Nijmegen (Niederlande), 9. August 1968.

¹¹ J. BONNER und R. C. HUANG, in *Histones* (Ed. A. V. S. DE REUCK und J. KNIGHT; Ciba Foundation Study Group No. 24, London 1966).

¹² G. ZUBAY und M. R. WATSON, *J. biophys. biochem. Cytol.* 5, 51 (1959).

¹³ Frl. E. J. P. HOOS danken wir für die Hilfe bei der technischen Durchführung der Versuche.

The Effect of Heat-Treatment and UV-Irradiation on X-Ray Induced Electron Spin Resonance Centers in Valine

In a recent paper SHIELDS et al.¹ were able to conclude from single-crystal data that the radical trapped in X-irradiated DL-valine at room temperature has the structure $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (I). These investigations confirmed the earlier studies of other authors^{2,3}. On the other hand, a recent paper of BOX et al.⁴ showed with single-crystals of the same substance that X-irradiation at 77°K and warming up the sample to 225°K leads to a definite spectrum which is attributed to the formation of the radical $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\dot{\text{C}}\text{HCOOH}$ (II). Further warming up of the crystal to room temperature leads to the final stable free radical (I). The investigations with single crystals of X-irradiated valine at room temperature show in some orientations equal triplets resulting from a hyperfine interaction of the unpaired electron with the nitrogen nucleus of the amino group¹. In the electron spin resonance spectrum of X-irradiated polycrystalline valine (see Figure a) this hyperfine structure is not resolved. It might be assumed that this is due to an anisotropic contribution of the coupling constant. Moreover SOMMERMEYER et al.⁵ were able to show that an increasing X-ray dose leads to further decrease of the resolution of hyperfine pattern. Therefore, it was surprising to get a well resolved hyperfine structure after warming up the X-irradiated polycrystalline valine to 353°K (see Figure b). In the middle part of the spectrum, the equal triplet resulting from the hyperfine

interaction with the nitrogen is completely resolved and a coupling constant of $7.6 \pm 0.4 \text{ G}$ can be measured. This value is in good agreement with the contribution of the isotropic component^{1,3}. Irradiation of valine with UV light of 254 nm following X-irradiation leads to a similar result. While, however, in the case of heat treatment the radical concentration is diminished to 85% only, the UV irradiation decreases the concentration to 32%.

If valine is irradiated with UV light for only 10 h, a concentration of less than 10^{16} radicals/g is obtained. This UV irradiation applied before X-irradiation does not influence the electron spin resonance spectra of the X-irradiated material. The same applies to heat-treatment of valine before X-irradiation. Therefore, it seems hardly

¹ H. SHIELDS, PH. HAMRICK and D. DELAIGLE, *J. chem. Phys.* 46, 3649 (1967).

² H. SHIELDS and W. GORDY, *Bull. Am. Phys. Soc.* 6, 257 (1961).

³ C. A. McDOWELL and W. C. LIN, *Int. Symp. molec. Structure and Spectroscopy*, Tokyo 1962, D 201.

⁴ H. C. BOX, H. G. FREUND and E. E. BUDZINSKI, *J. chem. Phys.* 46, 4470 (1967).

⁵ K. SOMMERMEYER, J. STEGLE and G. H. SCHNEPEL, *Atompraxis*, 13, 20 (1967).