

This substance, which is present in relatively large amounts in *P. axinellae* and which cannot be related to any other known organic compound occurring in living organisms, probably has no physiological significance in

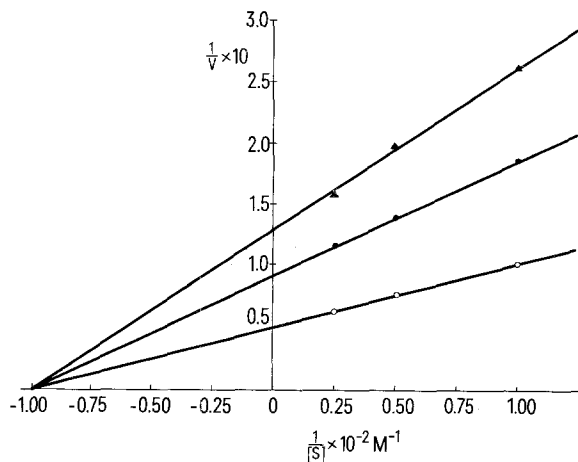


Fig. 2. Reciprocal plots of substrate concentration with respect to initial activity of succinate oxidase system in the presence of inhibitor. Velocities are expressed in per cent O_2 uptake/min. \circ no zoanthoxantin, \bullet $2.76 \times 10^{-4} \text{ M}$ zoanthoxantin, \blacktriangle $5.52 \times 10^{-4} \text{ M}$ zoanthoxantin. The reaction mixture (1.5 ml) contained 60 mM phosphate pH 7.4; 0.554 mg ETP (in terms of protein); 27 μM cytochrome c; zoanthoxantin at the concentration indicated; sodium succinate concentration was varied from 10 mM to 40 mM.

the respiration of the animal. The noncompetitive inhibitory action of zoanthoxantin on succinic oxidase activity indicates that it is not involved in the respiratory chain either as substrate or as coenzyme. However, since the inhibition remained constant with respect to time, it seems unlikely that this substance acts as an electron acceptor but rather exerts its inhibitory action at the site of substrate dehydrogenation.

In view of the strongly fluorescent properties of this molecule, its use as an inhibitor of mitochondrial respiration is of particular interest with respect to its possible utilization as a probe of those molecular events occurring at the site of inhibition.

Résumé. La zoanthoxantine est un nouveau composé aromatique, très fluorescent, caractérisé par le chromophore 1,3,5,7-tétrazacyclopent[f]azulen. On démontre l'action inhibitrice de ce métabolite sur une préparation submitochondriale de cœur de bœuf et le type d'inhibition en a été déterminé. On envisage aussi la possibilité d'utiliser la zoanthoxantine comme indicateur moléculaire dans la zone d'inhibition.

L. CARIELLO and B. TOTA⁴

Department of Biochemistry and Physiology,
Stazione Zoologica, and Institute of Preventive Medicine,
University, Naples (Italy), 28 June 1973.

⁴ We are indebted to Professor A. AZZI for helpful criticism and discussion.

Der Gehalt an freien ninhydrinpositiven Verbindungen im Extremitätengewebe von *Amblystoma mexicanum*

Über das Spektrum der freien Aminosäuren vieler Organismen¹, darunter auch die Amphibien, liegen Daten vor. So hat CHEN² den Gehalt an freien Aminosäuren von verschiedenen Amphibien-Embryonen bestimmt und, abgesehen von geringen quantitativen Unterschieden bei allen untersuchten Spezies, das gleiche Inventar an ninhydrinpositiven Verbindungen registriert. HERNANDEZ und COULSON³ versuchten die Zusammensetzung des Aminosäure-pools als taxonomisches Kriterium zu verwenden. Dabei ermittelten sie die Konzentration der freien Aminosäuren in ganzen Tieren, unter anderem auch bei *Amblystoma tigrinum*. Im Rahmen von Untersuchungen über biochemische Veränderungen während der Extremitätenregeneration wurde festgestellt, dass sich der Gehalt an freien Aminosäuren eng benachbarter Gewebe wie Haut und darunterliegende Muskulatur sehr stark voneinander unterscheidet. Die Bestimmungen erfolgten an etwa 12 Monate alten Axolotln. Das in flüssigem Stickstoff eingefrorene und gefriergetrocknete Material, Haut bzw. darunterliegendes Gewebe (im wesentlichen Muskulatur, der Knochen wurde entfernt) aus dem Stylopodium der Vorderextremität, wurde mit einem Gemisch aus Methanol/Chloroform/Wasser (12/5/3, v/v)⁴ im Glashomogenisator zerkleinert und dreimal extrahiert. Eine vierte Extraktion erfolgte mit 80% Äthanol. Die nach Zentrifugation (4 min bei 10 000 g) vereinigten Überstände wurden zur Abscheidung des Chloroforms mit einer geeigneten Menge Wasser und Chloroform versetzt und 30 sec lang ausgeschüttelt. Die klare, wässrig-methanolisch-äthanolische Phase wurde danach abgetrennt und im Rotationsverdampfer (12 mm Hg; max. 35°C) bis zur

Trockne eingengt. Der Rückstand wurde für die säulenchromatographische Bestimmung in 0,1 n HCl und Natriumcitratpuffer (0,2 n, pH 2,2) aufgenommen.

Die Analyse der Extrakte erfolgte durch Auftrennung in einem Aminosäure-Analysator (Beckmann Unichrom) mit Austauscherharz Typ M 72 (bzw. M 81 für die basischen Aminosäuren). In Abwandlung des üblichen Verfahrens⁵ wurde zur optimalen Auftrennung die Elutionsgeschwindigkeit auf 40 ml/h herabgesetzt. Der erste Elutionspuffer (0,20n Natriumcitrat) wurde von pH 3,25 auf 3,23 abgeändert. Als zweiter Puffer diente wie üblich 0,20n Natriumcitrat pH 4,25. Pufferwechsel erfolgte nach 198 min. Während der Analyse wurde die Säulentemperatur erhöht. Als bester Temperaturgradient, besonders für die Auftrennung von Prolin und Glutaminsäure und der früh im Eluat erscheinenden Verbindungen, erwies sich eine Temperaturerhöhung von 32°C auf 54°C nach 120 min (Aufheizzeit 68 min). Für die basischen Aminosäuren ergab das Standardverfahren⁵ die besten Resultate. Den Extrakten wurde Norleucin als interner Standard zugesetzt (Genauigkeit des Analysenverfahrens = $\pm 2,7\%$).

¹ J. T. HOLDEN, *Amino Acid Pools-Distribution, Formation and Functions of free Amino Acids* (Elsevier, Amsterdam 1962).

² P. S. CHEN, *Int. J. Biochem.* 1, 669 (1970).

³ T. HERNANDEZ und R. A. COULSON, *Comp. Biochem. Physiol.* 38B, 679 (1971).

⁴ R. L. BIELESKY und N. A. TURNER, *Analyt. Biochem.* 17, 278 (1966).

⁵ D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN und S. MOORE, *Analyt. Chem.* 30, 1190 (1958).

Aus statistischen Gründen wurden Gewebeprobe von 6 Tieren für jeweils eine Bestimmung verwandt. Es erfolgten mindestens 5 Bestimmungen für Haut bzw. Muskulatur. Die Elutionsdiagramme der durchgeführten Aminosäureanalysen lieferten insgesamt 39 peaks, von denen 29 eindeutig identifiziert werden konnten.

Der erste unbekannte peak erschien im Eluat nach Taurin und war offensichtlich von mehreren Verbindungen geringerer Konzentration überlagert (Peptide?). An dieser Stelle im Eluat ist auch Harnstoff zu erwarten, konnte jedoch wegen der Überlagerung nicht eindeutig identifiziert werden. Zwei weitere unbekannte Verbindungen erschienen im Eluat nach Alanin, eine nach β -Alanin. Während der basischen Analyse erschienen

Nachweisbare ninhydrinpositive Verbindungen in Muskulatur und Haut der Vorderextremität von *A. mexicanum*

	Muskulatur	Haut
Alanin	4,89 \pm 0,13	4,00 \pm 0,19
β -Alanin	+	+
Arginin	2,04 \pm 0,11	0,41 \pm 0,01
Asparagin/Glutamin	4,52 \pm 0,11	2,21 \pm 0,10
Asparaginsäure	1,45 \pm 0,04	2,93 \pm 0,21
Carnosin	31,87 \pm 2,06	1,04 \pm 0,28
Citrullin	+	+
Cystathionin	0,33 \pm 0,03	—
Cysteinsäure	2,19 \pm 0,06	1,12 \pm 0,05
Glutaminsäure	11,27 \pm 0,34	13,12 \pm 0,69
Glycerophosphoäthanolamin	0,55 \pm 0,02	0,41 \pm 0,01
Glycin	3,24 \pm 0,10	1,29 \pm 0,08
Histidin	1,34 \pm 0,05	0,61 \pm 0,03
Isoleucin	0,45 \pm 0,02	0,57 \pm 0,06
Leucin	0,97 \pm 0,02	1,21 \pm 0,17
Lysin	5,08 \pm 0,19	1,13 \pm 0,03
Methioninsulfoxid	+	+
1-Methylhistidin	0,39 \pm 0,02	0,59 \pm 0,06
Ornithin	+	+
Phenylalanin	0,32 \pm 0,01	0,39 \pm 0,04
Phosphoäthanolamin	0,36 \pm 0,03	5,14 \pm 0,23
Prolin	1,41 \pm 0,12	1,23 \pm 0,04
Sarkosin	+	+
Serin	3,08 \pm 0,06	1,89 \pm 0,03
Taurin	17,05 \pm 1,10	0,93 \pm 0,06
Threonin	3,89 \pm 0,26	3,71 \pm 0,18
Tryptophan	< 0,1	< 0,1
Tyrosin	0,37 \pm 0,01	0,38 \pm 0,03
Valin	0,74 \pm 0,01	1,08 \pm 0,06

Angegeben ist der Gehalt in Nanomol pro Milligramm (nM/mg) Trockengewicht (TG) und der absolute mittlere Fehler des Mittelwertes.

drei unbekannte peaks vor Tryptophan; einer vor und zwei nach Ammoniak. Wegen der geringen Konzentration (≤ 0.1 nM/TG) dieser Verbindungen wurde auf ihre Identifizierung und quantitative Auswertung verzichtet. Cystein und Methionin konnten weder in der Haut noch in der Muskulatur registriert werden. Offensichtlich sind sie im Extremitätengewebe des Axolotl in freier Form nur in äusserst geringer Konzentration vorhanden. Asparagin und Glutamin hätten sich nur schlecht voneinander trennen lassen, sie wurden deshalb gemeinsam ausgewertet. Wie die Tabelle zeigt, sind die Aminosäurepools von Haut und Muskulatur der Axolotlextremität in ihrer qualitativen Zusammensetzung gleich. Eine Ausnahme bildet Cystathionin, das nur im Bereich der Muskulatur nachweisbar ist. Die quantitative Zusammensetzung der Gewebepools zeigt jedoch klare Unterschiede.

Unter den «Nicht-Protein-Aminosäuren» fällt in der Muskulatur der hohe Gehalt an Taurin und besonders an Carnosin auf. Beide Verbindungen zusammen machen fast 50% des Gesamtpools aus. Die Haut andererseits charakterisiert sich durch den vergleichsweise enormen Gehalt an Phosphoäthanolamin, der das 14fache der Muskulatur beträgt.

Bei den «Protein-Aminosäuren» sind ebenfalls grosse quantitative Unterschiede zwischen Muskulatur und Haut zu verzeichnen. Die Lysin-Konzentration übersteigt beispielsweise in der Muskulatur fast das Vierfache, die Glycin- und Serinkonzentration das 2-, bzw. 1,5fache der entsprechenden Konzentrationen in der Haut. Diese weist andererseits gegenüber der Muskulatur den doppelten Gehalt an Asparaginsäure auf.

In beiden Geweben dominiert Glutaminsäure, möglicherweise Ausdruck der zentralen Bedeutung dieser Aminosäure im Intermediärstoffwechsel. Die als essentiell bekannten Aminosäuren Threonin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Tryptophan erscheinen in sehr geringer Konzentration. Ist Threonin mit 3,7 bzw. 3,9 nM/mg TG noch verhältnismässig stark vertreten, so liegt Tryptophan mit weniger als 0,1 nM/mg TG bereits an der quantitativen Nachweisgrenze des gewählten Analysenverfahrens.

Summary. On investigating the free amino acid pool in skin and muscles of the stylopode of *Amblystoma* forelimbs, 39 ninhydrine positive substances could be detected, from which 29 have been identified. High quantitative differences between skin and muscles could be shown.

B. VIELL und H. J. ANTON

Zoologisches Institut, Lehrstuhl für experimentelle Morphologie der Universität, Weyertal 119, D-5 Köln 41 (Deutschland), 7. November 1973.

Polysome Profile and Free Alkaline Ribonuclease Activity of Placenta and Maternal Liver of Intact, Starved and X-irradiated Mice

Protein synthesis is known to be affected by ionizing radiations¹⁻³. Enhanced protein synthesis in liver following irradiation has been correlated with increase in polysomes^{2,3}. Starvation also induces changes in polysome profiles^{4,5}. This study is on hepatic and placental polysome profiles of fed, starved and X-irradiated mice. The activity of free alkaline ribonuclease has also been measured.

Materials and methods. 3-month-old Swiss mice were used on the 15th day of gestation in accordance with an

earlier study⁶. The mice were X-irradiated at a dose of 1000 R, 100 R/min^{1,7}. All except the starved mice were fed ad libitum a balanced diet. During the 24-h period of starvation the animals received only water. The X-irradiated mice were sacrificed at either 2 or 8 h after exposure. All the animals were sacrificed by cervical dislocation; placenta and maternal liver were collected for further processing.

For the study of polysome profiles, the tissues were homogenized in a medium containing 0.25 M sucrose and