

Thermal Exposures of Ectoderm Cells Isolated from Amphibian Gastrulae

The neuralizing effect of various unrelated chemical compounds acting upon gastrula ectoderm in amphibia can be understood if one accepts HOLTFRETER's¹ explanation of a sublethal cytolysis of the cells as the "common denominator" of all these reactions. HOLTFRETER's hypothesis gains additional support from the fact that almost all the artificial inductors so far tested produce a sublethal cytolysis. In order to explore the underlying mechanism of this sublethal cytolysis of cells, a study of the action of thermal exposures on the isolated ectoderm cells of gastrula has been made; an attempt has also been made to follow the basophilia after such a thermal treatment.

The presumptive ectoderm cells were removed from early gastrulae of *Triturus alpestris*. In a specially designed thermostat, the cells were exposed for the desired length of time, the temperature varying between 26° and 42°. Following the heat treatment, the cells were transferred to normal HOLTFRETER solution at 19° for culture. The total number of explants made was 150. The minimal period of culture was 7 days, the maximal 14 days. The explants were fixed in ZENKER's fluid with acetic acid and the sections were stained in Toluidin blue to follow the basophilia of the cells.

Discussion. The foregoing experiments make it clear that thermal shocks exerted on the isolated gastrula ectoderm are ineffective in producing neuralization. The changes produced by a sublethal cytolysis are thus not necessarily the same in heat treated and chemically treated cells. It looks as if a certain "type" of mild cytolysis, but not all cytolysis, can lead to neural differentiation.

BRACHET's claim that nucleoprotein granules play a part in the process of induction and differentiation of cells is in agreement with the failure of differentiation in our heat-treated ectoderm cells: whenever there is a weak or no cytoplasmic basophilia in the cells, there is invariably a blocking of development. That heat shocks result in the depolymerization of DNA with an increase in the maximum of ultraviolet absorption (THOMAS²), and produce a complete inhibition of ribonucleic acid synthesis (STEINERT³), is already known.

¹ J. HOLTFRETER, Symp. Soc. exp. Biol. 2, 17 (1948).
² R. THOMAS, Exper. 7, 261 (1951).
³ M. STEINERT, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 549 (1951).

At the low range of temperature shocks, some of the cells may become revitalized and differentiate into epidermal structures. This confirms, on explants, what BRACHET¹ had observed after implantation of heat-treated cells into normal gastrulae. He has observed that this revitalization of the cells is linked with a reappearance of the basophilic granules; we have been able to observe cytochemically a similar phenomenon in our cells. But one should insist on the mode of differentiation shown by the revitalized cells: they become epidermal and not neural. Thus the cytolytic action of the heat, if there is any, does not initiate the neuralization of the isolated gastrula ectoderm cells, in contrast with the cytolytic actions of chemicals. It is thus clear that neuralization can only result from a certain "type" of sublethal cytolysis and that thermal exposures in the temperature range studied do not provide for such a tissue reaction in isolated condition. S. MOOKERJEE²

Laboratory for Animal Morphology, University of Brussels, May 28, 1953.

Résumé

Des explantats ectodermiques de gastrulas de *Triturus alpestris* ont été soumis à des chocs thermiques dans des conditions variées; il ne s'est jamais produit de neuralisation des explantats, dont la basophilie était très faible. Il faut en conclure que la neuralisation des explantats ectodermiques ne se produit que lorsque les cellules ont été soumises à un type particulier de précytolyse.

¹ J. BRACHET, Symp. Soc. exp. Biol. 63, 173 (1952).
² Present address: Cell Research Unit, Chittaranjan Cancer Hospital, Calcutta 26, India.

Abhängigkeit der Katalaseaktivität von der H₂O₂-Konzentration

Die seit mehr als 20 Jahren beschriebene Abhängigkeit der Katalaseaktivität (monomolekulare Reaktionskonstante) von der verwendeten H₂O₂-Konzentration wird nach Untersuchungen von THEORELL¹, BONNICHSEN, CHANCE und THEORELL² als Artefakt angesehen, das

¹ H. THEORELL, Exper. 4, 100 (1948).
² R. K. BONNICHSEN, B. CHANCE und H. THEORELL, Acta chem. scand. 1, 685 (1947).

Results

Thermal exposure at °	No. of cases	Time exposed, in hours or minutes	Nature of basophilia	Type of differentiation
26	12	1 hour	low	blocked
28	12	1 hour	low	blocked
28	8	24 hours	low	blocked
20	12	1 hour	weaker	blocked
30	8	2 hours	weaker	blocked
32	8	3 hours	very weak	blocked
34	12	1 hour	very weak	blocked
34	8	2 hours	very weak	blocked
35	8	2 hours	very weak	blocked
37	12	1 hour	almost removed	blocked
37	8	3 hours	almost removed	blocked
40	12	5 minutes	almost removed	blocked
40	8	15 minutes	almost removed	blocked
42	12	3 minutes	removed	blocked
Control (19)	10	—	rich	epidermal

auf der Verwendung zu niedriger Enzymkonzentrationen beruht. Durch Inaktivierung und Adsorption soll ein Teil der Katalase unwirksam werden, wodurch der gefundene Verlauf der Aktivität erklärt wird. Seit den Arbeiten von EULER, JOSEPHSON¹ und WILLIAMS² wird vielfach eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration beschrieben. Sie hat im Sinne der Michaelisschen Theorie³ zur Definition einer Substrat-Enzym-Verbindung nach dem Massenwirkungsgesetz und somit zu einer Bestimmung der «Michaeliskonstante» geführt. Zweifellos wird, wie auch die erst genannten Autoren ausführen, ein solcher Tatbestand nicht vorliegen, da sich bei den schnell ablaufenden, zum Teil irreversiblen Reaktionen ein Gleichgewicht niemals einstellen kann.

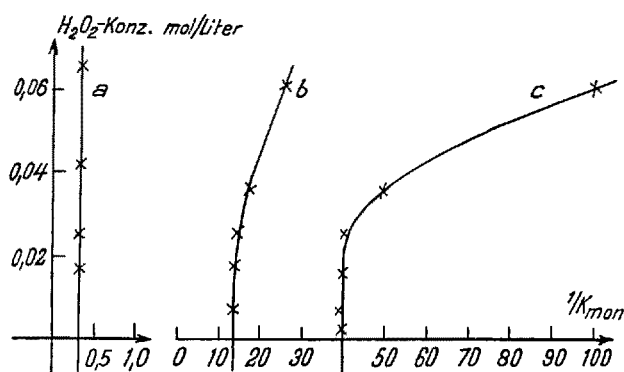


Abb. 1. Abhängigkeit des reziproken Wertes der monomolekularen Reaktionskonstanten von der H_2O_2 -Konzentration bei kristallisierter Rinderleberkatalase in verschiedenen Verdünnungen (Erläuterungen siehe Text).

Trotzdem bleibt die Frage offen, ob die gefundene Abhängigkeit zu Recht besteht oder durch Inaktivierung und Adsorption erklärt werden kann.

Wir haben deshalb H_2O_2 -Spaltungsgeschwindigkeiten von Katalasepräparaten verschiedener Herkunft und Konzentrationen gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 zusammengestellt. Nach der von VEIBEL und LILLELUND⁴ abgeänderten Methode von LINNEWEAVER und BURK⁵ ist die H_2O_2 -Konzentration s gegen den reziproken Wert der monomolekularen Reaktionskonstanten $k_{mon} = 1/t \log_e s_0/s$ aufgetragen. Als Enzympräparate dienten kristallisierte Rinderleberkatalase (Kat. f = 30 000), Kolibakterien sowie zellfreie Katalaselösung aus zermahlenen Bakterien. Die Reaktion erfolgte bei 20°C in $n/50$ Phosphatpuffer, pH = 7,0. Bei Spaltungsansätzen mit konzentrierteren Enzymlösungen wurden alle 10 s 10 cm³ der Reaktionslösung in verdünnte Schwefelsäure geblasen und das nicht zersetzte Wasserstoffperoxyd titrimetrisch bestimmt. Bei den weniger konzentrierten Enzymlösungen erfolgte die Entnahme alle 2 min. k_{mon} muss dann auf den Zeitpunkt $t = 0$ extrapoliert werden.

Wie Abbildung 1a zeigt, ist bei der Leberkatalase k_{mon} von der verwendeten H_2O_2 -Konzentration unabhängig. Verdünnt man die Enzymlösung auf das etwa 40fache (Abb. 1b), so nimmt k_{mon} bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen ab. Wird die Katalaselösung nochmals auf das etwa 3fache verdünnt (Abb. 1c), so vergrößert sich die

Abnahme der Aktivität bei höheren Substratkonzentrationen. Hierbei handelt es sich also eindeutig um einen durch Enzymverdünnung und H_2O_2 -Konzentration bewirkten Effekt, denn bei geringerer Wasserstoffperoxydkonzentration bleibt k_{mon} von der Substratkonzentration unabhängig.

Anders verhält sich die hier verwendete Kolikatalase. Ihre Aktivität zeigt in jedem Falle trotz gleicher Enzymkonzentration eine Abhängigkeit von der zugesetzten H_2O_2 -Menge, gleichgültig, ob die Enzymkonzentration hoch oder niedrig ist. Die Funktion $s = f(1/k_{mon})$ stellt bei niedriger Wasserstoffperoxydkonzentration wieder eine Gerade dar, die aber eine Neigung gegen die Abzisse besitzt. Dieselbe Abhängigkeit zeigt auch eine verdünnte

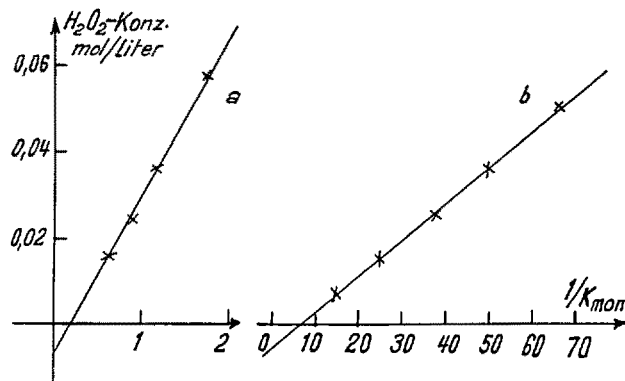


Abb. 2. Abhängigkeit des reziproken Wertes der monomolekularen Reaktionskonstanten von der H_2O_2 -Konzentration bei zwei verschiedenen Konzentrationen einer Zellaufschwemmung von *E. coli* (Erläuterungen siehe Text).

Zellaufschwemmung von *Escherichia coli* (Abb. 2b). Bei verdünntem zellfreiem Extrakt wird bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen wieder eine Abweichung von der Geraden beobachtet. Diese muss ebenfalls als ein Inaktivierungsvorgang durch Wasserstoffperoxyd gedeutet werden.

Um zu untersuchen, wie weit Verunreinigungen einen Einfluss auf den Aktivitätsverlauf haben, wurden Versuche mit Leberbrei durchgeführt. Die Funktion $s = f(1/k_{mon})$ besitzt geometrisch dieselbe Gestalt, wie sie auch die aus dem Brei gewonnene kristallisierte Katalase zeigt. Ebenso besitzt eine gereinigte Katalaselösung aus *E. coli* dieselben hier erwähnten Eigenschaften wie ungereinigte.

Die Versuche beweisen, dass die bei der hier verwendeten Bakterienkatalase gefundene Abhängigkeit auch für hohe Enzymkonzentrationen gilt und somit vom Verdünnungsgrad unabhängig ist. Lediglich die Steigerung der Geraden $s = f(1/k_{mon})$ ändert sich mit der Enzymkonzentration. Je größer die Enzymmenge ist, desto steiler verläuft die Gerade. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate bleibt innerhalb des hier untersuchten Bereiches unverändert. Eine Täuschung durch Artefakte ist unwahrscheinlich.

Das Verhalten der Aktivität verschiedener Katalasepräparate kann daher bei Variation der H_2O_2 -Konzentration verschieden sein. Der bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen erlittene Aktivitätsverlust lässt sich vom normalen Verhalten unterscheiden. Ob es bei der katalatischen H_2O_2 -Zersetzung verschiedene Reaktionsmechanismen gibt, muss geprüft werden. Hierüber soll an anderer Stelle berichtet werden.

H. LÜCK¹

Dairy Industry Control Board, Windhoek (Südwestafrika), den 21. April 1953.

¹ Jetzige Adresse: Windhoek (Südwestafrika), Control Board, P. O. B. 520.

¹ H. EULER und K. JOSEPHSON, Liebigs Ann. Chem. 452, 1 (1927).

² J. WILLIAMS, J. General Physiol. (Amer.) 11, 309 (1928).

³ L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Z. 49, 333 (1913).

⁴ S. VEIBEL und H. LILLELUND, Kgl. Vidensk. Selsk. Math.-fys.-med. (Dän.) 17, Nr. 6 (1940).

⁵ H. LINNEWEAVER und D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934).

Summary

Catalase preparations of different origin indicate different behaviour during the splitting of the H_2O_2 . The monomolecular reaction constant in spite of the same amount of enzyme can be changed by variation of the beginning concentration of H_2O_2 , or remain constant. An interpretation of the first case through inactivation of the enzyme leads to no satisfactory explanation.

ATPase Activity of Myofibrils and Granules Isolated from Muscle

Action of Progesterone and Desoxycorticosterone

It was explained in some recent researches made in our Institute¹ that the contraction of myofibrils isolated from guinea pig skeletal and heart muscle is inhibited by progesterone and desoxycorticosterone added in small amounts. As a continuation of the investigations on this question, the reaction of ATPase activity of both myofibrils and granules from muscle and heart towards the same two hormones was now tested. The results are described in this paper.

The fibrils were isolated from myocardic and skeletal muscle of guinea-pig according to SCHIKE and HASS², a very pure preparation being obtained with this method. Since tryptic digestion is involved in this method, a new procedure was also tried in order to avoid this step, since trypsin might produce some modifications of enzyme activity. The tissue was cut to slices with a freezing microtome and the slices kept in 0.25 M sucrose. The suspension was homogenated in a blender for 30 s, then centrifuged for 10 min at 600 g. The sediment was again suspended in 0.25 M sucrose and submitted to a new centrifugation for 3 min at 400 g in order to eliminate the larger impurities. The supernatant fluid was then centrifuged for 10 min at 2000 g and the sediment particles washed with pH 6.9 borate buffer, until a perfectly clear supernatant fluid was obtained. The

sediment consisted of pure myofibrils without cytoplasmatic elements contaminatio.

Many methods have been described in the last years permitting the separation of cytoplasmic granules (mitochondria?) from skeletal and heart muscle homogenate (PAUL et coll.¹, HARMAND and FEIGELSON², GREEN and coll.³, PLAUT and PLAUT⁴). Since all these methods did not give optimal results because of the great contamination with myofibrils and cellular debris material, a new method was developed, including the preparation of these sections with a freezing microtome prior to homogenization in blender. The guinea-pig cardiac and skeletal muscle was cut in 15 μ slices with a freezing microtome and the slices kept in 50 ml of 0.25 M sucrose. The slices suspension was then homogenated in blender for 45 s. The homogenate was centrifuged for 10 min at 600 g and the sediment was washed with 0.25 M sucrose and centrifuged again at 600 g for 10 min. The combined supernatant fluids were centrifuged at 12 000 g for 15 min. A Servall type S-S-1 centrifuge was used for this investigations and all procedures were performed in a cold room at + 5°C.

A very fine mitochondria preparation was obtained. The granules had characteristic spherical shape and appeared to be smaller than liver mitochondria. No modification was observed in their shape after suspension in water. They were able to be maintained for 2 days at 2°C without any evident modification of shape and enzymatic activity, but complete disintegration occurred after this time. The term "mitochondria" is used in this paper for indicating these granules.

The ATPase activity of myofibrils and mitochondria was determined in the following manner⁵. As a rule the test system was composed of 1 ml myofibrils and mitochondria suspension, 1 ml substrate solution (1×10^{-3} M ATP), 0.05 ml of 0.1 M $CaCl_2$, and 0.35 ml of borate buffer, pH 6.9 (containing 0.05 M boric acid and 0.008 M NaOH), amounting to a total of 2.4 ml. The mixture was

¹ F. MOR, Arch. Sci. Biol. (1953). (In the press).

² A. F. SCHICKE and G. M. HASS, J. Exper. Med. 91, 655 (1950).

³ M. H. PAUL and coll., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 349 (1952).

⁴ J. W. HARMAN and M. FEIGELSON, Exp. Cell. Res. 3, 47 (1952).

⁵ D. E. GREEN and coll., J. Biol. Chem. 172, 389 (1948).

⁶ G. W. E. PLAUT and K. A. PLAUT, J. Biol. Chem. 199, 141 (1952).

⁷ K. G. STERN and coll., J. Biol. Chem. 188, 273 (1951).

ATPase activity expressed by P/mg N

	N°	Normal	With progesterone	With desoxycorticosterone
Heart mitochondria	1	111.2	64.4	75.5
	2	89.5	65.8	86.2
	3	102.0	73.9	74.0
	4	105.3	79.4	82.5
	5	94.7	68.0	70.8
	Media	100.54	70.78	73.80
Skeletal muscle mitochondria	1	140.5	125.8	92.5
	2	185.5	145.5	147.3
	3	164.4	134.2	114.2
	4	170.0	140.0	135.5
	5	159.4	128.0	130.4
	Media	162.52	134.70	123.98
Skeletal muscle myofibrils prepared without trypsin . .	1	116.9	76.2	72.2
	2	120.3	98.5	90.8
	Media	118.60	87.35	81.50
Skeletal muscle myofibrils prepared with trypsin . . .	1	125.5	100.5	107.5
	2	150.0	113.0	101.5
	Media	137.75	106.70	104.50
Heart myofibrils prepared without trypsin	1	98.1	78.6	75.3