

	Nitrogen mg	Phosphorus μg
Cytochrome solution . . . . .	1.428	6.90
Lecithine emulsion (in 0.10 ml) . .	0.154	15.8
Precipitate . . . . .	0.756	16.22
Supernatant . . . . .	0.840	6.48

It is clear from the Table that a large part of cytochrome C is precipitated from the solution by the addition of lecithine emulsion. The precipitate was insoluble in acetone, but was soluble in ether; the colour of the solution was red. The absorption curve of this solution is shown in Figure 2. It is clear that the curve shows a striking difference from that of cytochrome C in the regions between 300 and 400 m $\mu$ , and between 500–560 m $\mu$ . Lecithine material from different sources was also treated for its ability to precipitate cytochrome C. Lecithine extracted from rat or rabbit livers was as active as that from baker yeast. Lecithine prepared from chicken eggs produced, on the contrary, only a very faint precipitate when added to cytochrome C solutions.

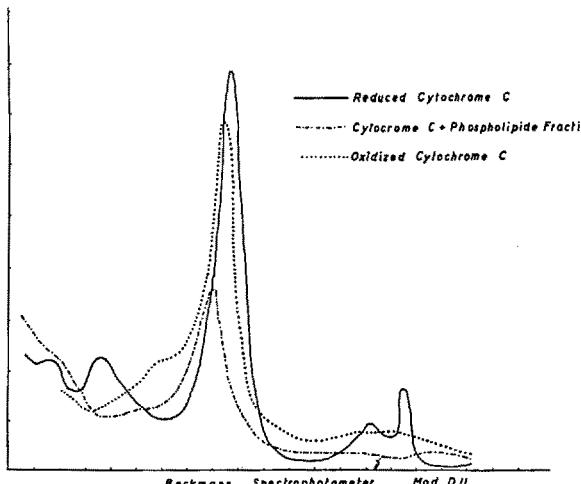


Fig. 2.

The digestion of yeast or liver lecithine fraction with 5 mg Clostridium Welchii lecithinase (20 min at 38°C) did not modify their ability to precipitate cytochrome C. Also tryptic and papainic digestions were ineffective.

Treatment of fraction I with saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  produced the formation of a dense conglomerate on the surface of the fluid. This material retained its ability to precipitate cytochrome C after dialysis against distilled water at 0°C for 48 h. Heating at 100°C for 20 min did not modify the precipitating power. The addition of a small amount of the lecithine emulsion to an albumine solution from chicken eggs or to human haemoglobin dissolved in distilled water did not produce any precipitation. A strong precipitate was formed, however, when fraction I was added to a solution of iron salt such as  $\text{FeSO}_4$  or Ferric ammoniacal citrate.

Modifications of the biological properties of cytochrome C: In this experiment the reaction system contained 0.3 ml of a 10% suspension of rat liver mitochondria in 0.25 M sucrose, 6 mg of Na ascorbate, 2 mg cytochrome C, 0.2 ml 30% KOH in the central well. Gaseous environment was 100%  $\text{O}_2$ .

In some instances, 0.1 ml of fraction I was added. In these cases, the precipitate was rapidly formed and the

$\text{O}_2$  uptake was nil. In another experiment, the amount of cytochrome C was 10 mg instead of 2 mg. This represented a large excess with respect to the amount of fraction I which was added. The aim of this experiment was to see if cytochrome C which remained in solution after treatment with the lecithine fraction maintained its biological activity. The  $\text{O}_2$  uptake observed in this experiment was 52.7 l, while it was 49.5 l in the system in which fraction I was not added, this means that the biological activity was not lost by cytochrome C remaining in solution.

L. MICHELAZZI

Department of General Pathology, University of Genoa, June 16, 1955.

### Riassunto

Nel corso di ricerche sopra l'azione esplicata da alcune frazioni lipidiche sulla succinossidasi presente nei mitocondri di fegato di ratto, l'autore ha osservato che il citocromo C aggiunto al sistema precipita in presenza della frazione contenente lecitine, céfaline e fosfatidi, estratta dal lievito o dal fegato di animali diversi.

Di questo materiale è stata compiuta l'analisi elettroforetica su carta che non ha rivelato proteine migranti. L'analisi cromatografica su carta non ha mostrato aminoacidi liberi, ma dopo idrolisi 6–10 aminoacidi sono evidenziabili. Il precipitato risultante dalla unione della frazione lecitinica con il citocromo C è stato analizzato per il suo contenuto in P ed in N comparativamente ai materiali di origine. Detto precipitato è solubile solo in etere e la curva spettrofotometrica del citocromo C in queste condizioni appare modificata rispetto alla norma.

La frazione lecitine non precipita in presenza di albumina di uovo e di emoglobina umana, mentre dà un forte precipitato in presenza di solfato di Fe e di citrato ferrico ammoniacale.

L'attività biologica del citocromo C si annulla completamente con la precipitazione.

### Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Astacus flaviatilis*

Bei *Drosophila melanogaster* konnte mit papierchromatographischen Methoden das Vorkommen zahlreicher fluoreszierender Stoffe und deren mengenmässige Abhängigkeit von Erbfaktoren nachgewiesen werden<sup>1</sup>. Ähnliche Untersuchungen wurden an *Ephestia kuhniella*<sup>2</sup> und *Bombyx mori*<sup>3</sup> durchgeführt. Neuerdings ist es nun auch gelungen, die chemische Natur einiger dieser Substanzen aufzuklären<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> E. HADORN und H. K. MITCHELL, Proc. Nat. Acad. Sci. 37, 650 (1951). – E. HADORN, Arch. Julius-Klaus-Stiftung 26, 470 (1951). – S. NAWA und T. TAIRA, Proc. Japan. Acad. 30, 632 (1954). – E. HADORN, Exper. 10, 483 (1954).

<sup>2</sup> E. HADORN und A. KÜHN, Z. Naturf. 8b, 582 (1953).

<sup>3</sup> S. NAWA und T. TAIRA, Proc. Japan. Acad. 30, 632 (1954). – S. NAWA, M. GOTO, S. MATSUURA, H. KAKIZAWA und Y. HIRATA, J. Biochem. (Japan) 41, 657 (1954). – R. TSCHESCHE, Angew. Chemie 66, 302 (1954).

<sup>4</sup> S. NAWA und T. TAIRA, Proc. Japan. Acad. 30, 632 (1954). – S. NAWA, M. GOTO, S. MATSUURA, H. KAKIZAWA und Y. HIRATA, J. Biochem. (Japan) 41, 657 (1954). – R. TSCHESCHE, Angew. Chemie 66, 302 (1954). – H. S. FORREST und H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. 76, 5656 (1954). – M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER und E. HADORN, Helv. Chim. Acta 38, 397 (1955). – M. VISCONTINI, E. LOESER, P. KARRER und E. HADORN, Helv. Chim. Acta 38, 1222 (1955).

Zweck der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob gleiche oder ähnliche Fluoreszenzstoffe nicht nur bei Insekten, sondern auch bei anderen Arthropoden vorkommen. Als Objekt für unsere Untersuchungen wählten wir *Astacus fluviatilis* (Flusskrebs).

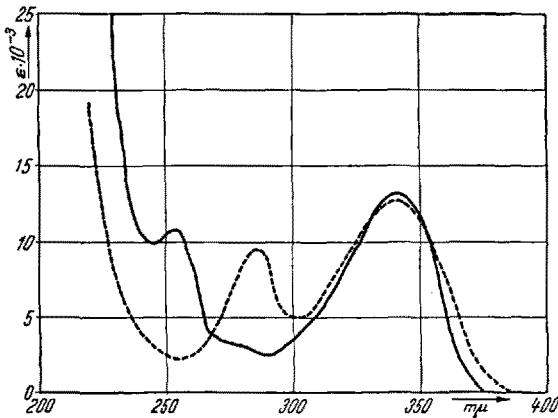


Abb. 1. Spektren von Isoxanthopterin aus *Astacus fluviatilis*.  
 — in 0,1 n-NaOH-Lösung    - - - - in 0,1 n-HCl-Lösung

Wir verwendeten etwa 3 kg in Äthanol konservierte Krebse, deren Eingeweide zum grössten Teil fehlten. Das Material wurde zu einem feinen Brei zermahlen und daraus die in Alkalien löslichen fluoreszierenden Substanzen mit 50%igem wässrigem Äthanol, welches 2% NH<sub>3</sub> enthielt, extrahiert. Aus diesem Extrakt isolierten wir mit Hilfe von Adsorption und Chromatographie einige fluoreszierende Produkte. Als Adsorptionsmittel wurden Tierkohle, Papierpulver und Aluminiumoxyd verwendet, als Lösungsmittel Methanol, Butanol, Ammoniak, Eisessig und Wasser in verschiedenen Zusammensetzungen. Die Reinheit der Substanzen wurde laufend mit Papierchromatogrammen überprüft. Für die Vergleichschromatogramme trugen wir jeweils die reinen Stoffe sowie deren Mischung nebeneinander auf das gleiche Blatt auf. Dieses Verfahren lässt einen direkten Vergleich der Rf-Werte zu, wobei alle Zufälligkeiten ausgeschaltet sind.

Mit den oben erwähnten Trennungsmethoden erhielten wir folgende Produkte:

1. 2 mg Isoxanthopterin (I) (2-Amino-6, 9-dioxypterin). Diese Verbindung, die in wässriger Lösung intensiv blauviolett fluoresziert, wurde durch ihre Rf-Werte in vier verschiedenen Lösungsmitteln und auf Grund ihrer UV-Absorptionsspektren identifiziert (Tabelle und Abb. 1).
  2. Geringe Mengen einer in wässriger Lösung himmelblau fluoreszierenden Substanz II, welche mit HB<sub>1</sub> (2-Amino-6-oxypterin) von *Drosophila*<sup>1</sup> identisch ist. Der Nachweis erfolgte ebenfalls durch Chromatogramme und UV-Spektren (Tabelle und Abb. 2).
  3. Spuren eines zweiten Stoffes (III) mit gleicher himmelblauer Fluoreszenz, dessen Rf-Werte in 4 Lösungsmitteln mit denen von HB<sub>2</sub> von *Drosophila*<sup>1</sup> übereinstimmen (Tabelle).

Ausserdem fanden wir noch zwei weitere himmelblaue fluoreszierende Verbindungen, die wir als  $\text{HB}_{2a}$  und  $\text{HB}_{3a}$  bezeichneten. Die geringen Substanzmengen liessen

keine genaue Charakterisierung zu, es konnte aber an Hand von Papierchromatogrammen bewiesen werden, dass beide nicht identisch sind mit der in *Drosophila* gefundenen 2-Amino-6-oxypterin-8-carbonsäure<sup>1</sup> (Tabelle).

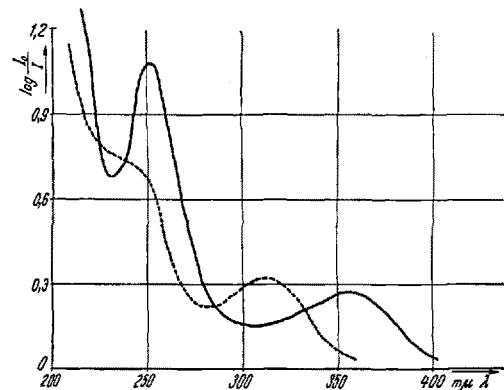
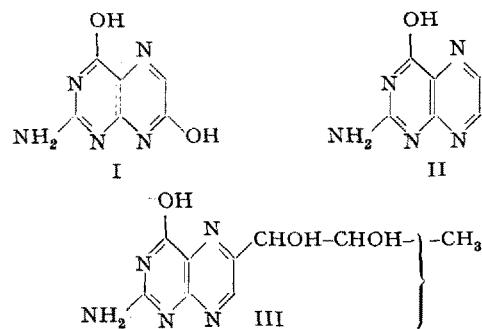


Abb. 2. Spektren von 2-Amino-6-oxypterin aus *Astacus fluviatilis*.  
 — in 0,1 n-NaOH-Lösung    - - - - in 0,1 n-HCl-Lösung

Da wir in erster Linie auf die Isolierung von Isoxanthopterin hinarbeiteten, ist es sehr wohl möglich, dass wir Fluoreszenzstoffe mit stärker abweichenden Eigenschaften nicht berücksichtigten. Das Stoffinventar er-



hebt also keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die bisherigen Ergebnisse beweisen aber, dass einige fluoreszierende Verbindungen mit Pterincharakter bei systematisch sehr verschiedenen Vertretern der Arthropoden und sogar bei Tieren aus einem anderen Stamm auftreten können, da Isoxanthopterin offenbar auch bei Fischen

### Rf-Werte der isolierten Substanzen in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Butanol 20 Eisessig 3 Wasser 7	Propanol 2 Ammoniak 1 (1%, wässrig)	Pyridin 4 Essigester 3 Wasser 3	wässriges Ammon- chlorid (3%)
Isoxantho- pterin (I) . . .	0,21	0,14	0,37	0,31
Pterin II ( $HB_1$ )	0,35	0,31	0,56	0,51
Pterin III ( $HB_2$ )	0,31	0,31	0,61	0,65
$HB_{2a}$ . . . . .	0,38	0,32	0,38	0,74
$HB_3$ . . . . .	0,12	0,08	0,41	0,15

<sup>1</sup> M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER und E. HADORN, *Helv. Chim. Acta* **38**, 397 (1955).

<sup>1</sup> M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER und E. HADORN, *Helv. Chim. Acta* 38, 397 (1955).

(*Cyprinus*) und Amphibien (*Rana nigromaculata*) nachgewiesen worden ist<sup>1</sup>.

M. VISCONTINI<sup>2</sup>, H. SCHMID<sup>3</sup> und E. HADORN<sup>3</sup>.

Chemisches Institut der Universität und Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich, den 11. Juli 1955.

### Summary

We succeeded in isolating three fluorescent substances from *Astacus fluviatilis* (crayfish) which were recently found also in *Drosophila melanogaster*. These compounds are Isoxanthopterin (2-amino-6,9-dioxypterin), 2-amino-6-oxypterin and HB<sub>2</sub>.

<sup>1</sup> S. NAWA, M. GOTO, S. MATSUURA, H. KAKIZAWA und Y. HIRATA, J. Biochem. (Japan) 41, 657 (1954). - T. HAMA, Exper. 9, 299 (1953).

<sup>2</sup> Chemisches Institut der Universität.

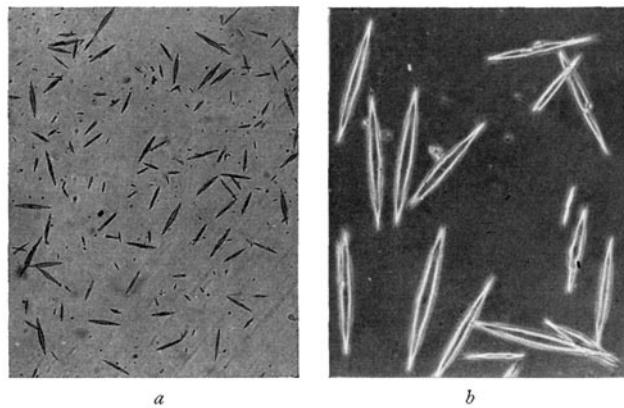
<sup>3</sup> Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich.

### Isolierung von Charcot-Leydenschen Kristallen<sup>1</sup>

Die 1853 von CHARCOT und ROBIN<sup>2</sup> im Blut und 1872 von v. LEYDEN<sup>3</sup> im Sputum erstmals beobachteten Kristalle sind schon lange als Produkt eosinophiler Granulozyten bekannt. Ihre Genese und pathogenetische Bedeutung stand aber bis in jüngste Zeit immer noch zur Diskussion. Durch AYRES<sup>4</sup> konnte erstmals mit Sicherheit nachgewiesen werden, dass ihre Entstehung an die Zytolyse eosinophiler Leukozyten gebunden ist. ESELLIER, MARTI und MORANDI<sup>5</sup> haben gezeigt, dass es sich um ein unbeständiges Zwischenprodukt beim Zerfall einer sehr labilen Substanz aus Zellkern oder Zytoplasma der Eosinophilen handelt. Die chemische Natur der Kristalle ist bis heute nicht eindeutig abgeklärt. Auf Grund histochemischer Untersuchungsmethoden wird schon seit langem angenommen, dass die Kristalle aus Eiweiss oder einem eiweissartigen Stoff bestehen müssen (NEUMANN<sup>6</sup>). Voraussetzung für weitere Untersuchungen ist aber eine Isolierung der Kristalle, die bis heute nicht möglich war. AYRES<sup>4</sup> und uns<sup>5</sup> ist es mit verschiedenen Methoden gelungen, Charcot-Leydensche Kristalle auf dem Objektträger aus Eosinophilen zu erzeugen. Die derart erhaltenen Mengen sind aber sehr klein, und eine Abtrennung der Kristalle war bisher unmöglich, da Kristalle und Zellen in bezug auf Grösse und spezifisches Gewicht allzu geringe Unterschiede aufweisen.

Wir haben deshalb einen anderen Weg beschritten, indem wir die Zellen und Zelltrümmer durch Fermente und oberflächenaktive Stoffe auflösen, wobei die Kristalle selbst nicht verändert werden. Wir benutzen hierzu folgende Arbeitsmethode: Ein an Eosinophilen reiches Ausgangsmaterial (Plasma, Pleuraexsudat, Ascites

menschlicher Herkunft) wird zur Verhinderung der Gerinnung im Verhältnis 1:5 mit 3,5%iger Na-Citrat-Lösung gemischt und bei +4°C so lange aufbewahrt, bis sich reichlich Kristalle gebildet haben. In der Regel sind dazu mehrere Wochen bis Monate erforderlich, während welcher Zeit das Material regelmässig kontrolliert werden muss. Aus dem zellreichen Sediment entsteht im Verlauf der Autolyse eine gallertige Masse, welche die Kristalle in sich schliesst. Sobald sich massenhaft und vor allem grosse Kristalle gebildet haben, deren Grösse ein Vielfaches der Zellgrösse der Eosinophilen betragen soll, wird die Masse mit einem Streptokinase- und Streptodornase-Präparat (etwa 0,1 mg Varidase [Lederle]/2 cm<sup>3</sup>) versetzt und 12 h bei +37°C inkubiert. Während dieser Zeit verflüssigt sich das Material, ohne dass die Kristalle zerstört werden.



Isolierte Charcot-Leydensche Kristalle in *Aqua dest.* a) Vergr. 1:63, b) mit Phasenkontrastoptik, Vergr. 1:250.

Dann wird durch wenig Watte filtriert, um allfällige grössere, nicht aufgelöste Bestandteile zu entfernen. Kristalle und Zellreste werden zunächst 4mal mit Tyrode III gewaschen (4 min bei 2000 U./min zentrifugiert; Zentrifuge Christ UJ2). Schliesslich werden die noch verbleibenden Zellen und Zelltrümmer durch einen oberflächenaktiven Stoff vollständig lysiert (Zusatz eines linsengrossen Stückes Aerosol MA = Dihexyl-Na-sulfo-succinat (American Cyanamid Co.) je 5 cm<sup>3</sup>). Die Kristalle lassen sich daraufhin durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren (4 min bei 2000 U./min) bis 90–95% anreichern (vgl. Abb.). Die Kristallsuspensionen sind unbeständig, da die Kristalle fermentativ weiter abgebaut werden (ESELLIER, MARTI und MORANDI<sup>1</sup>). Alle Untersuchungen der Kristalle müssen deshalb unmittelbar nach deren Anreicherung vorgenommen werden.

A. F. ESELLIER, R. L. JEANNERET und H. R. MARTI

Medizinische Universitätshklinik Zürich, den 12. Juni 1955.

### Summary

A method is described for isolation of Charcot-Leyden crystals from high eosinophil-count blood specimens or from eosinophil rich exudates. Once the crystals have been formed, isolation is accomplished by lysing the blood cells with an enzyme and a wetting agent.

<sup>1</sup> A. F. ESELLIER, H. R. MARTI und L. MORANDI, Klin. Wschr. (im Druck).

<sup>1</sup> Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch ein Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ermöglicht.

<sup>2</sup> J. M. CHARCOT und C. ROBIN, C. r. Soc. Biol. 5, 44 (1853).

<sup>3</sup> E. v. LEYDEN, Virchows Arch. path. Anat. 54, 324 (1872).

<sup>4</sup> W. W. AYRES, Blood 4, 595 (1949).

<sup>5</sup> A. F. ESELLIER, H. R. MARTI und L. MORANDI, Klin. Wschr. (im Druck).

<sup>6</sup> A. NEUMANN, Hdb. allg. Haematol. 1, 354 (Urban & Schwarzenberg, Berlin 1932).