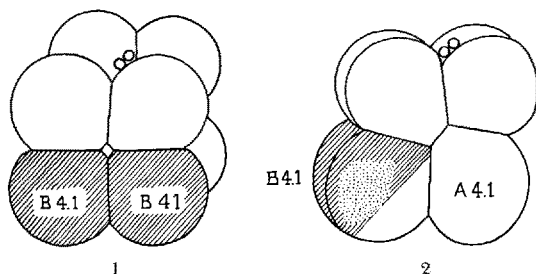
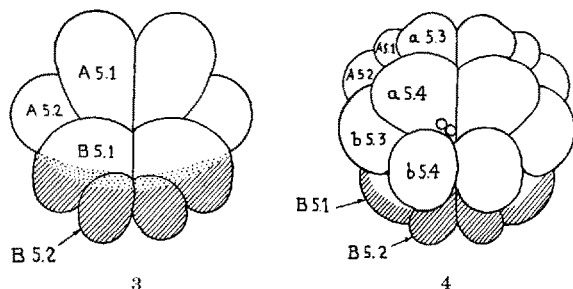


The Presumptive Territory of the Mesoderm in the Ascidian Germ

Recent experimental investigations on Ascidian development have made necessary a revision made by presumptive organ territory map originally made by CONKLIN¹. CONKLIN's map was based on the segregation of pigmented plasms within the egg. I have made such a revision² by marking the blastomeres with granules of coloured chalk: these granules adhere firmly to the surface of particular blastomeres, whose further destiny can thus be followed during the morphogenetic movements and as far as their final differentiation. In my experience the topography of the organ territories, as described by CONKLIN, is acceptable in its fundamental lines; nevertheless in many details it requires correction. One of these corrections concerns the localization of the presumptive territory of mesenchyme and muscle cells.

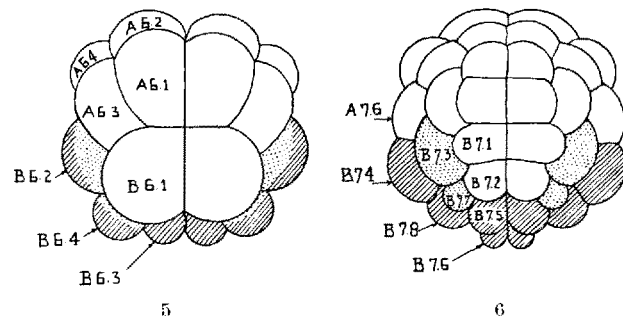


According to CONKLIN, mesenchyme and muscle cells derive from a single primitive mesodermal territory, evident by virtue of its yellow plasm, in the form of a crescent, lying in the posterior vegetative part of the uncleaved egg. At the 8-cell stage the presumptive territory of the mesenchyme is localized, according to CONKLIN, in the extreme posterior part of the two posterior vegetative blastomeres, the remaining part of these blastomeres being formed by the plasms of muscle cells and of endoderm. At the 16-cell stage the mesenchyme territory segregates into the blastomeres B5.1, B5.2; at the 32-cell stage, into the blastomeres B6.2, B6.3, B6.4; and at the 64-cell stage, into the blastomeres A7.6, B7.3, B7.7, B7.5, B7.6. At the same stage the presumptive territory of the muscle cells is localized by CONKLIN in the blastomeres B7.4, B7.8. Thus, at 64-cell stage there are 10 presumptive mesenchyme cells and 4 muscle cells.



I have found this distribution to be not entirely correct. According to my results, at the 8-cell stage the presumptive territory of mesenchyme is not localized in the extreme posterior part of the B4.1 cells: Figure 1, which represents the embryo at the 8-cell stage as seen from the behind, shows that the whole posterior part

of the B4.1 blastomeres is occupied by the presumptive territory of the muscle cells, whereas the mesenchyme territory is localized in small areas on both the right and left sides, as illustrated in Figure 2. At the 16-cell stage the B5.2 cells contain mostly myoplasmic material, and only a small part of mesenchyme material (Fig. 3 and 4).



Cross-hatched part: Presumptive territory of muscle cells.
Dotted part: Presumptive territory of mesenchyme.

Fig. 1.—8-cell stage, from the posterior part, showing the tail muscle territory.

Fig. 2.—8-cell stage, from the left side.

Fig. 3.—16-cell stage, from the dorsal (vegetative) side.

Fig. 4.—16-cell stage, from the ventral (animal) side.

Fig. 5.—32-cell stage, from the dorsal part.

Fig. 6. -64-cell stage, from the dorsal part.

At the 32-cell stage the B6.3 blastomeres contain only myoplasmic material; the B6.4 and B6.2 contain both muscle and mesenchyme materials (Fig. 5) which segregate only in the next cleavage, passing respectively into the B7.8 (muscle), B7.7 (mesenchyme), and the B7.4 (muscle), B7.3 (mesenchyme) (Fig. 6). Thus, at the 64-cell stage there are 8 presumptive muscle cells and 4 mesenchyme cells. The differences between CONKLIN's results and mine are tabulated as follows:

Stage				CONKLIN's cell-lineage	Personal observations
8-	16-	32-	64-cell		
B4.1	B5.1	B6.1	B7.1	endoderm endoderm mesenchyme muscle mesenchyme mesenchyme mesenchyme muscle	endoderm endoderm mesenchyme muscle muscle muscle mesenchyme muscle
			B7.2		
		B6.2	B7.3		
			B7.4		
	B5.2	B6.3	B7.5		
			B7.6		
		B6.4	B7.7		
			B7.8		

As shown in Figure 6, at the 64-cell stage the posterior parts shows an external semicircle of 8 presumptive muscle cells (B7.4, B7.8, B7.5, B7.6, B7.5, B7.8, B7.4) enclosing another incomplete semicircle of presumptive mesenchyme cells (B7.3, B7.7, B7.7, B7.3).

The fate of the A7.6 cells is of interest. These blastomeres derive from the anterior vegetative part and, according to CONKLIN, are presumptive mesenchyme cells. This is improbable, since the yellow crescent does not reach the anterior quadrant. Removal of the posterior vegetative blastomeres¹ results in a complete absence of mesenchyme and muscle cells in the developing larvae.

¹ E. G. CONKLIN, J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 13, 1 (1905).

² G. ORTOLANI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 161 (1954).

¹ L. VON UBISCH, Roux' Arch. 139, 438 (1939). — G. REVERBERI and A. MINGANTI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 20, 199 (1946).

Only in a very few cases did VON UBISCH, as well as REVERBERI and MINGANTI, obtain larvae with some muscle cells: these results may be explained if one supposes that the A7.6 cells occasionally contain myoplasmic material. VON UBISCH, accepting CONKLIN's schemes, had to assume a change of destiny of presumptive mesenchyme material into muscle cells, but such a regulation is not probable. It would appear more probable that in some cases the anterior extremities of the yellow crescent remain within the anterior blastomeres at the 2nd cleavage, and are then segregated into the A7.6 cells. This point needs further investigation.

G. ORTOLANI

Zoological Institute, University of Palermo, Italy,
August 3, 1955.

Riassunto

Col metodo delle marche con granuli di gesso colorato, sono stati modificati gli schemi di CONKLIN riguardanti i territori presuntivi del mesenchima e della muscolatura nel germe di Ascidie.

Umwandlung von radioaktivem Cortexon in Aldosteron durch Nebennieren-Enzyme¹

Vor einiger Zeit konnten wir zeigen, dass sich der Aldosteron Gehalt in Vollhomogenaten von Rinder-Nebennieren durch aerobe Inkubation unter Zusatz geeigneter Aktivatoren wesentlich steigern lässt². Dies deutete darauf hin, dass in den Rinder-Nebennieren Vorstufen enthalten sein müssen, welche sich bei Aktivierung der Enzymsysteme in Aldosteron überführen lassen. Sobald die Konstitution dieses Hormons aufgeklärt war³, wurden daher in weiteren Versuchen² verschiedene Steroide als Modelle einer solchen Vorstufe der Inkubation mit Vollhomogenaten unterzogen, darunter Progesteron, Corticosteron und Cortexon (= 11-Desoxycorticosteron). Im Gegensatz zu den beiden ersten war Cortexon in der Tat fähig, die Aldosteronbildung gegenüber entsprechenden Parallelversuchen um das 2- bis 3fache zu erhöhen, und zwar auf einen maximalen Gehalt von etwa 3 mg Aldosteron je kg Nebennieren. Cortexon schien daher eine der möglichen Vorstufen für Aldosteron darzustellen, besonders nachdem uns der Nachweis einer 18-Hydroxylase in der Nebenniere gelungen war⁴.

Wir haben nun radioaktives 21-C¹⁴-Cortexon durch aerobe Inkubation in Aldosteron übergeführt. Es standen uns 1,3 mg 21-C¹⁴-Cortexon-azetat⁵ zur Verfügung, die auf übliche Weise mit Kaliumhydrogenkarbonat hydrolysiert wurden⁶. Das erhaltene freie 21-C¹⁴-Cortexon reinigten wir papierchromatographisch und ver-

wendeten die Hälfte davon für den folgenden Inkubationsansatz, der unter bisher optimalen Bedingungen für die Aldosteronbildung durchgeführt wurde.

Ein Vollhomogenat aus 220 g schlachtfrischen Kuh-Nebennieren mit den üblichen Zusätzen¹ sowie 1,11 g ATP, 110 mg DPN und 2,2 mg TPN wurde mit 110 mg Cortexon, das eine Totalaktivität von etwa 385 000 cpm² aufwies, 3 h bei pH 7,25 und 35° unter Durchleiten von 3 l O₂/min inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte zunächst in gleicher Weise wie bei früheren Versuchen³.

Für die feinere Auftrennung des Reaktionsgemisches wurden der Äthylchloridextrakt sowie der Petrolätherextrakt, letzterer nach Vorreinigung durch Verteilung zwischen Methanol und Hexan, an Silicagel chromatographiert und dabei jeweils die Chloroform-Azeton (1:1)-Eluate gewonnen. Diese Eluate zerlegte man anschliessend chromatographisch im System Formamid/Benzol-Chloroform (1:1) auf Zelluloseblättern in 5 Fraktionen a₁, b₁, c₁, d₁ und e₁. Gemäss analytischer Kontrolle⁴ mit Hilfe von UV.-Absorption, Reduktionsvermögen, Natronlauge- und Phosphorsäure-Fluoreszenz im UV. enthielt Fraktion a₁ die stark polaren Verbindungen wie Hydrocortison, Cortison und Aldosteron neben weiteren, noch unidentifizierten Substanzen. Durch eine zweite präparative Papierchromatographie in Propylenglykol/Toluol (28 h) wurde a₁ in weitere 5 Fraktionen a₂, b₂, c₂, d₂ und e₂ aufgeteilt, von welchen d₂ zur Hauptsache Aldosteron und Cortison enthielt. Hydrocortison befand sich in b₂. Eine dritte Chromatographie im System C von BUSH lieferte aus Fraktion d₂ nochmals 5 Fraktionen, a₃, b₃, c₃, d₃ und e₃, wobei sich Aldosteron in c₃ und Cortison in d₃ befand. Da c₃ ausserdem noch eine reduzierende Verunreinigung enthielt, wurde diese Fraktion im gleichen System rechromatographiert. Von den dabei anfallenden Fraktionen a₄ bis d₄ enthielt c₄ die reduzierende Verunreinigung und b₄ chromatographisch reines, amorphes Aldosteron. Von letzterem kristallisierte man 0,1 mg aus feuchtem Äther-Acetone. Es schmolz zuerst bei 108 bis 112°, kristallisierte dann teilweise wieder, um schliesslich bei 153–158° zu schmelzen. Im Gemisch mit authentischem Aldosteron zeigte es keine Smp.-Erniedrigung.

Durch UV.-Absorption, Reduktionsvermögen und Natronlauge-Fluoreszenz konnten total 0,87 mg Aldosteron nachgewiesen werden⁵. Die Ausbeute betrug also 0,97 Gew. % bezogen auf das eingesetzte Cortexon oder 3,95 mg je kg Nebennieren. Dieses chromatographisch einheitliche, aber noch amorphe Präparat, das übrigens leicht, aber in dieser Menge nur verlustreich zu radioaktivem Aldosteron kristallisiert werden konnte, zeigte eine Gesamtaktivität von 1340 cpm, was 0,35% der eingesetzten Aktivität entspricht. Daher müssen mindestens 0,42 mg oder 48% des isolierten Aldosterons aus Cortexon entstanden sein. Die restliche Menge, das heisst, höchstens 0,45 mg oder 52% stammen dagegen zum kleineren Teil aus dem vorgebildeten Aldosteron der Nebennieren und zum grösseren aus Aldosteron, das

¹ 134. Mitteilung über Steroide. Auszugsweise vorgetragen am 3. August 1955 anlässlich des 3. Internat. Kongresses für Biochemie in Brüssel. 133. Mitteilung siehe E. VISCHER, CH. MEYSTRE und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 38, 1502 (1955).

² A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT und R. NEHER, *CIBA Found. Colloqu. Endocrinol.* 8, 170 (1955); siehe auch A. WETTSTEIN und G. ANNER, *Exper.* 10, 415 (1954).

³ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, *Exper.* 10, 132 (1954); *Helv. chim. Acta* 37, 1201 (1954).

⁴ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 38, 1237 (1955).

⁵ Dieses Material wurde uns freundlicherweise von Prof. L. T. SAMUELS, Salt Lake City, überlassen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle bestens danken.

⁶ T. REICHSTEIN und J. V. EUW, *Helv. chim. Acta* 21, 1181 (1938).

¹ A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT und R. NEHER, *CIBA Found. Colloqu. Endocrinol.* 8, 170 (1955); siehe auch A. WETTSTEIN und G. ANNER, *Exper.* 10, 415 (1954).

² Für die Durchführung dieser Messungen danken wir Herrn Dr. ROMETSCH bestens.

³ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 38, 1237 (1955).

⁴ F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 38, 1237 (1955).

⁵ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* 37, 1163 (1954). R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Acta endocrinol.* 18, 386 (1955).