

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 Aldosterongehalt in Vollhomogenaten von Rinder-Nebennieren durch aerobe Inkubation unter Zusatz geeigneter Aktivatoren wesentlich steigern lässt². Dies deutet 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-Desoxy-corticosteron). 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-

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. MEYSTER 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).

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 Äthylenchloridextrakt 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 a_1 , b_1 , c_1 , d_1 und e_1 . Gemäss analytischer Kontrolle⁴ mit Hilfe von UV-Absorption, Reduktionsvermögen, Natronlauge- und Phosphorsäure-Fluoreszenz im UV. enthielt Fraktion a_1 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 a_1 in weitere 5 Fraktionen a_2 , b_2 , c_2 , d_2 und e_2 aufgeteilt, von welchen d_2 zur Hauptsache Aldosteron und Cortison enthielt. Hydrocortison befand sich in b_2 . Eine dritte Chromatographie im System C von BUSH lieferte aus Fraktion d_2 nochmals 5 Fraktionen, a_3 , b_3 , c_3 , d_3 und e_3 , wobei sich Aldosteron in c_3 und Cortison in d_3 befand. Da c_3 ausserdem noch eine reduzierende Verunreinigung enthielt, wurde diese Fraktion im gleichen System rechromatographiert. Von den dabei anfallenden Fraktionen a_4 bis d_4 enthielt c_4 die reduzierende Verunreinigung und b_4 chromatographisch reines, amorphes Aldosteron. Von letzterem kristallisierte man 0,1 mg aus feuchtem Äther-Aceton. 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 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).

sich erst im Laufe der Inkubation aus natürlichen Vorstufen im Nebennierenhomogenat gebildet hat. Damit bestätigt sich unser früherer Befund: Cortexon wird tatsächlich durch Nebennierenenzyme *in vitro* in Aldosteron umgewandelt. Die geringe Umsetzung lässt aber darauf schliessen, dass die natürlichen Aldosteronvorstufen in Rinder-Nebennieren nicht ausschliesslich Cortexon sein können, welches bekanntlich nur in äusserst kleiner Menge in Nebennieren vorkommt.

Durch Perjodsäureabbau des amorphen radioaktiven Aldosterons zu dem bekannten (20→18)-Lakton¹ konnte ersteres einerseits zusätzlich charakterisiert werden. Andererseits bewies die beobachtete Inaktivität des unter Verlust des radioaktiven Kohlenstoffatoms 21 gebildeten Laktons, dass es sich beim radioaktiven Aldosteron, wie erwartet, ausschliesslich um die 21-C¹⁴-Verbindung gehandelt hat. Diese wird also direkt aus dem 21-C¹⁴-Cortexon, das heisst durch Oxygenierung und Dehydrierung, entstanden sein und nicht auf dem Umweg über Cortexonabbauprodukte. Entsprechend erwies sich der bei der Perjodsäureoxydation des radioaktiven Aldosterons entstandene und als Dimedonverbindung isolierte Formaldehyd als deutlich radioaktiv.

Gleichzeitig wurde auch die Bildung von *Corticosteron aus Cortexon* untersucht, obwohl die gewählten Bedingungen für diese Umwandlung nicht optimal waren. Aus Fraktion c_1 erhielten wir 32,3 mg Corticosteron, welches grösstenteils kristallisiert werden konnte und insgesamt 91 900 cpm aufwies. Dies entspricht 23,9% der eingesetzten Aktivität. Somit sind mindestens 27,2 mg oder 84% des Corticosterons aus dem zugesetzten Cortexon entstanden und nur 16% oder 5,1 mg stammten aus den Nebennieren.

Bei der Untersuchung der unter anderem das Hydrocortison enthaltenden Fraktion b_2 wurde überraschend ebenfalls starke Radioaktivität aufgefunden. Diese konnte jedoch bei weiterer chromatographischer Reinigung der Fraktion gänzlich einer noch unidentifizierten Verbindung zugeschrieben werden, während sich das reine, kristallisierte Hydrocortison als inaktiv erwies. Diese Beobachtung bestätigt erneut den von verschiedener Seite erhobenen Befund, dass die Einführung von Hydroxylgruppen, zum Beispiel in Progesteron, bei der Inkubation mit Nebennierengewebe vorwiegend in der Reihenfolge der 17-, 21- und 11-Stellung erfolgt².

F. W. KAHNT, R. NEHER und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 26. August 1955.

Summary

Cortexone labeled in the 21-position with C¹⁴ yielded radioactive Aldosterone through incubation with beef adrenal homogenate. Its activity, due entirely to the 21 carbon atom, showed that about 48% of the Aldosterone had arisen from a direct conversion of cortexone without intermediate degradation. The low yield by weight in this conversion suggests, however, that cortexone is not the only natural precursor for Aldosterone in the adrenal.

The radioactivity of the corticosterone obtained showed that about 84% of it originated from added cortexone. Lack of radioactivity of the hydrocortisone confirmed that it does not essentially result from cortexone.

¹ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. ECW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Exper. 10, 132 (1954); Helv. chim. Acta 37, 1201 (1954).

² Literatur siehe in S. ROBERTS und C. M. SZEGO, Ann. Rev. Biochem. 24, 549 (1955).

Wirkungsverstärkung von Adrenalin und Noradrenalin durch Azetylcholin am isolierten Irisdilatator des Kaninchens

Der isolierte Irisdilatator des Kaninchens wird durch Eserin gegenüber Adrenalin und Noradrenalin sensibilisiert¹. Falls die Empfindlichkeitssteigerung über eine Hemmung der Cholinesterase zustande kommt, müssten außer Eserin auch andere Anticholinesterasen sensibilisieren. Es stellt sich die Frage, ob dabei die sensibilisierende Wirkung lokal gebildetem Azetylcholin zu kommt, welches sich unter dem Einfluss von Anticholinesterasen im Irisgewebe anreichert. Daher soll geprüft werden, ob grundsätzlich Azetylcholin die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin verstärken kann.

Wir untersuchten radiäre Dilatatorsektoren der isolierten Kanincheniris mit der an anderer Stelle beschriebenen Methode². Einem Teil der Tiere wurde zur chronischen Denervierung des Dilatator 4–15 Tage vor dem Versuch das rechtsseitige Ganglion *cervicale superius* (aseptisch) entfernt. Die Dilatatorsektoren hingen in konstant fliessender Tyrodelösung (pH = 7,2; T = 37°C). Registriert wurde die isometrische Kraftentwicklung bei Umströmung des Präparates mit Lösungen verschiedener Wirkstoffkonzentration.

Wie Eserin verstärkt auch Prostigmin in einer Konzentration von 10⁻⁶–10⁻⁵ m die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin. Allein gegeben führt Prostigmin nur zu einer geringfügigen langsamem Tonuszunahme des Dilatator.

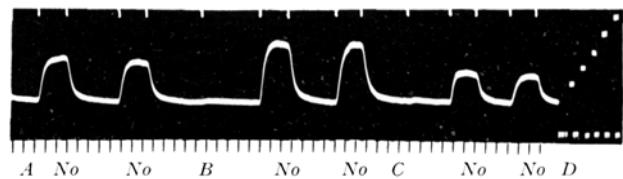


Abb. 1. Kaninchendilatator. Verstärkung der durch Noradrenalin hervorgerufenen Kontraktionen unter Azetylcholin. Jedesmal bei No: L-Noradrenalin 2,5·10⁻⁶ m. Von A–B: ohne A. Ch. Von B–C: unter A. Ch. 5·10⁻⁶ m. Von C–D: Nach Auswaschen des A. Ch. t = Minuten. D: Eichkurve, zeigt Ausschläge des isometrischen Registrierhebels bei Belastung mit 15, 20, 25, 30 und 35 mg.

Azetylcholin verstärkt schon in Konzentrationen von 5·10⁻⁷ m bis 5·10⁻⁶ m die durch Adrenalin und Noradrenalin hervorgerufenen Kontraktionen (Abb. 1). Die Wirkungsverstärkung von Adrenalin ist ungefähr gleich gross wie diejenige von Noradrenalin (Tab. 1). Der Azetylcholineffekt ist leicht auswaschbar und während eines mehrstündigen Versuches beliebig repetierbar. Der gegenüber Adrenalin und Noradrenalin sehr empfindliche chronisch denervierte Dilatator³ erfährt durch Azetylcholin noch eine zusätzliche Sensibilisierung gegenüber Adrenalin und Noradrenalin (Abb. 2). In einer Konzentration von 5·10⁻⁶ m allein gegeben hat Azetylcholin in der Regel keine deutliche Wirkung auf den normalen Dilatator. Die Eigenwirkung des Azetylcholins im Sinne einer Kontraktion (siehe auch⁴) ist jedoch stärker am chronisch sympathikotomierten Präparat. Warum trotz möglichst konstanter Versuchsbedingungen die Dilatatorpräparate von einem Teil der Kaninchen durch Azetylcholin nicht sensibilisiert werden, können wir nicht beurteilen.

¹ J. C. RÜEGG, Helv. Physiol. Acta 13, C 29 (1955).

² J. C. RÜEGG, erscheint in Helv. Physiol. Acta.

³ J. C. RÜEGG, Helv. Physiol. Acta 13, C 29 (1955).

⁴ J. C. RÜEGG und W. R. HESS, Helv. Physiol. Acta 11, 216 (1953).