

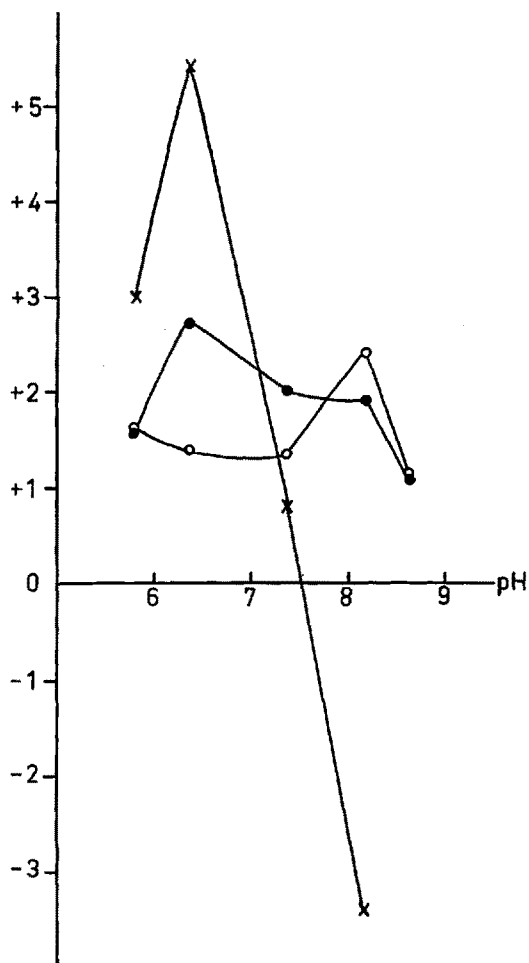
On the Adenosinetriphosphatase Activity of the Particulates of the Egg of the Sea Urchin *Paracentrotus Lividus*

The preparation of the particulates (mitochondria) from homogenates of eggs of *Paracentrotus lividus*, using sucrose concentrations from 0.25 to 0.44 M, results in a yellowish sediment at the bottom of the centrifuge tube overlaid by a red fluffy layer. This sediment can be further purified by resuspending it in 1 M sucrose and centrifuging at high speed (MONROY¹). In this way most of the pigmented fluffy layer floats on the surface of the sucrose and the sediment shows only an orange-yellow colour. The light red particulates of the fluffy layer were considered to be identical with the pigment granules of the egg which had been previously isolated with a similar technique (MONROY and DE NICOLA²). The sedimented granules were considered to be mitochondria and they were found to be endowed with protease (MAGGIO³) and adenosinetriphosphatase (ATPase) (MONROY¹) activities. The study of the ATPase activity in such granules was mainly centered around its changes upon fertilization and was carried out under standard conditions, using veronal buffer at pH 8.0 and Mg^{++} as activator.

It was the intention of the present writer to study in some detail the properties of the latter enzyme in unfertilized and fertilized eggs of *Paracentrotus lividus*. First of all pH-activity curves were run, especially in consideration of the recent findings of MYERS and SLATER⁴ on the presence in rat liver mitochondria of four different ATPases, which can be distinguished from each other by their pH optima, activators and inhibitors. However, when this work was undertaken, irregular results were often obtained and the impression was soon gained that they may somehow depend on the amount of the so-called red contaminant in the mitochondria sediment. It was then decided to investigate this point and a series of experiments has been made with unfertilized eggs using preparations of (a) mixed red + yellow particulates, i.e. unpurified sediment, (b) yellow sediment free as much as possible of the red granules, (c) red particulate only. For the preparation of the particulate fractions, the directions given by MONROY¹ were followed. The experiments were run at pH from 5.8 to 8.6 and for each preparation two separate series of determinations were made, one without activator and one with 4 μM of Mg^{++} as activator. Tris(hydroxymethyl)amino-methane-maleate buffer has been used over the whole range of pH. Preliminary experiments gave evidence that the results may vary to a certain extent when different buffers are employed.

By plotting the difference curves obtained by subtracting the values of the activities without activator from those with Mg^{++} , the results are obtained which are illustrated in the accompanying diagram. They show that the unpurified, i.e. red + yellow particulates, exhibit two maxima of Mg-activation, one at pH 6.4 and the other at pH 8.2. When a good purification is achieved and the yellow sediment is well freed of the red granules, then only the 6.4 maximum is found. It seems, furthermore, that, in these preparations at pH higher

than 7.4, Mg acts as an inhibitor. On the other hand, preparations of the red granules only show the 8.2 activation maximum. It must be added at the point that at pH 8.0 an activation by Mg on the ATPase of the yellow granules has been described by MONROY¹ working in veronal buffer; and it has been confirmed in the course of the present experiments. This point requires elucidation.



Mg-activation of the ATPases of the particulates of unfertilized eggs of *Paracentrotus lividus*. ●—● unpurified, i.e. red + yellow particulates; x—x yellow particulates; ○—○ red particulates. Difference curves obtained as described in the text.

Observations at the electron microscope on smears of these preparations do not allow one to recognize any difference between the red and the yellow granules. Observations by GHIRETTI-MAGALDI and MAGGIO (personal communication) in which the particulates of the sea urchin egg have been fractionated in a density gradient, have shown that the cytochrom system is localized exclusively in the red granules.

These observations show that the particulate system of the sea urchin egg is a heterogeneous population. Furthermore, these observations raise the question of the significance of the carotenoid pigments contained in these granules (DE NICOLA and MONROY-ODDO⁵) both from the physiological and the morphogenetic

¹ A. MONROY, J. cell. comp. Physiol. (in press).

² A. MONROY and M. DE NICOLA, Exper. 8, 29 (1952).

³ R. MAGGIO, J. cell. comp. Physiol. (in press).

⁴ D. K. MYERS and E. C. SLATER, Nature 179, 363 (1957).

⁵ M. DE NICOLA and A. MONROY-ODDO, Exper. 8, 187 (1952).

point of view (see MONROY and DE NICOLA²; GUSTAFSON⁶).

This investigation has been supported by a Grant from Consiglio Nazionale delle Ricerche to the Laboratory of Comparative Anatomy.

C. M. B. RICOTTA

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), July 25, 1957.

Riassunto

I particolari delle uova vergini di riccio di mare possono essere separati, a mezzo della centrifugazione differenziale, in due frazioni, una fortemente ed una scarsamente pigmentata. La prima mostra una attività ATPasica attivata da Mg con un massimo a pH 8.2; il massimo della seconda è invece a pH 6.4. Nelle preparazioni contenenti i due tipi di particolari si ritrovano i due massimi.

⁶ T. GUSTAFSON, Int. Rev. Cytol. 3, 277 (1954).

Produktion von leukozytenemigrationsfördernden Stoffen durch grampositive Keime in vitro

Grampositive und gramnegative Bakterien, mit Leukozyten in Kontakt gebracht, bewirken Emigrationsförderung der Leukozyten¹. Es gelingt, wie wir früher beschrieben haben, aus gramnegativen Bakterien und ihrer Kulturflüssigkeit emigrationsfördernde Lipopolysaccharide zu isolieren. Dieses gelang bisher nicht bei grampositiven auf Bouillon oder synthetischen Nährböden gezüchteten Bakterien, weder isolierte Polysaccharide noch Fraktionen aus Nährflüssigkeit sind wirksam². Andererseits konnte der eine von uns früher zeigen, dass bei Züchtung von Streptokokken auf Plasmanährboden leukozytenemigrationsfördernde sterile Kulturfiltrate gewonnen werden können³. Es erschien uns wichtig, nochmals den Versuch zu machen, aus Kulturen von grampositiven Bakterien leukozytenemigrationsfördernde Stoffe zu gewinnen, da die Bakterien selber eine solche Wirkung besitzen und auch bei Infekt im tierischen Organismus eine chemotaktische Wirkung mit Abszessbildung gerade bei diesen Bakterien von besonderer Wichtigkeit ist. Auf Grund der Befunde mit Züchtung von Bakterien auf Plasmanährböden und in Erwägung der im tierischen Organismus vorliegenden Verhältnisse konnte mit der Möglichkeit gerechnet wer-

¹ R. MEIER, Z. ges. exp. Med. 87, 283 (1933).
² R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953).
³ R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134/E/(1941).

den, dass diese Bakterien nur aus tierischem Material leukozytenemigrationsfördernde Stoffe freisetzen oder bilden können. Wir haben deshalb unsere Versuche unter Zusatz verschiedener steriler Organe wiederholt (Knorpel von Huhn und Kaninchen, Herz von Maus und Leber von Kaninchen) und die leukozytenemigrationsfördernde Wirkung der von diesen Kulturen erhaltenen Filtrate quantitativ festgestellt.

Material. (Beispiel) Die knorpeligen Teile der Brustbeine ausgewachsener Kaninchen wurden herauspräpariert und in kleine Stückchen von etwa 1 mm Kantlänge zerschnitten. Diese wurden in eine Glucosebouillon im Verhältnis von etwa 100 mg Knorpel/1 cm³ Bouillon gebracht. Als Bakterium wurde der *Streptococcus pyogenes haemolyticus* SH (lyophilisiert) verwendet. Das Lyophilisat wurde 24 h in Bouillon bebrütet, die Bouillonverdünnung wurde Mäusen gespritzt. 24 h nach Injektion wurde eine kranke Maus getötet und ihr Herz in Bouillon gebracht. Diese 24 h alte Bouillon wurde zum Versuch verwendet.

Methode. 4 Erlenmeyerkolben wurden mit Bouillon-Glucose beschickt. 1 diente als Bouillonkontrolle, 2 wurde mit je 2 Tropfen Streptokokkenbouillon pro cm³ Bouillon beimpft. 3 wurden die geschnittenen Knorpelstückchen zugegeben im Verhältnis 1:10, 4 enthielt Bouillon, Knorpel (im gleichen Verhältnis wie Röhren 3) und 2 Tropfen/cm³ Streptokokkenbouillon. Brutschrank 37°C unter leichter Bewegung. Nach 4 bzw. 6 Tagen wurden zur Kulturkontrolle Ausstriche gemacht, der Kolbeninhalt wurde darauf 1 h im Wasserbad erhitzt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Tyrode verdünnt den Leukozytenkulturen überschichtet (Leukozytenauswanderung: Methode Arch. exp. Path. Pharm. 224, 104 (1955)). Alle Versuche wurden 6mal wiederholt. Pro Bouillonverdünnung wurden je 5 Leukozytenkulturen verwendet.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

Durch Dialysieren unter sterilen Bedingungen lässt sich die Wirksamkeit der Streptokokken-Knorpel-Kulturbouillon leicht steigern. Eine Wirksamkeit der Kontrollen tritt auch unter diesen Bedingungen nicht auf.

Es ergibt sich somit, dass die Bildung von leukozytenemigrationsfördernden Stoffen durch Streptokokken bei Zusatz von gewissen Organen zur Kulturbouillon erheblich gesteigert werden kann. Auf Grund der vorliegenden Versuche kann somit die Diskrepanz zwischen der Wirksamkeit lebender Bakterien und dem Fehlen der Wirkung bei abgetöteten und in rein synthetischer Nährflüssigkeit gezüchteten dahin aufgeklärt werden, dass grampositive Bakterien nur aus tierischem Material leukozytenemigrationsfördernde Stoffe bilden oder freisetzen. Die wirksamen leukozytenemigrationsfördernden

Wirkung von *Streptococcus-pyogenes-haemolyticus*-Kulturbouillon mit und ohne Zusatz von Knorpelgewebe auf die Leukozytenauswanderung in vitro.

Verdünnung der Bouillon 1 h 100°C	Bouillon	Bouillon + Knorpel	Bouillon + Streptococc.	Bouillon + Streptococc. + Knorpel
1:10	Ø	Ø	(+)	+++
1:100.	Ø	Ø	Ø	++
1:500.	Ø	Ø	Ø	+

Ø = keine Auswanderungsförderung ++ = mässige Auswanderungsförderung
+ = leichte Auswanderungsförderung +++ = starke Auswanderungsförderung