

## Normal Larvae Obtained from Dark Fragments of Centrifuged *Ciona* Eggs

The unfertilized Ascidian eggs, if deprived of their surrounding membranes, can be broken, by appropriate centrifugal forces, into two or more fragments<sup>1-3</sup>, which are quite different in their morphological and chemical structure. When two fragments are obtained from the same egg, one is clear and the other pigmented; the clear fragment is smaller than the dark one. Both types of fragments can be fertilized; in previous experiments with *Ciona intestinalis* eggs, only the pigmented fragments were able to develop<sup>1</sup>. In *Ascidia malaca*, however, both kinds of fragments developed<sup>2</sup>, although larvae were never obtained from either type of fragments. These facts were interpreted as resulting from the absence (in *Ciona*) or presence (in *A. malaca*) of certain substances in the clear or in both fragments respectively<sup>2</sup>; no suggestions however were made about the nature of such substances.

In new centrifugation experiments on the virgin eggs of *Ciona*, results were obtained which can be summarized as follows:

(1) The clear fragments, if fertilized, do not develop at all; they are not even able to segment, but show ameboid modifications. This ameboid activity lasts for some hours, then the fragments reassume their original spherical shape and degenerate. They never extrude polar bodies, consequently they do not possess the egg nucleus and must be haploid. As they contain some lipid globules, they correspond to the centripetal part of the egg. As the eggs assume different positions in the centrifuge tube, they may be considered as unoriented fragments.

(2) The dark fragments, on the contrary, if fertilized, develop in a normal way. After the penetration of the sperm, they change their spherical shape, as normal eggs do, extrude two poleocytes, segment typically, gastrulate, and finally give rise to small but completely normal larvae. The larvae have straight tails, which are morphologically normal; they also possess vesicular brains with sensory spots, and palps; they swim rapidly and normally. This result was never reached in the past, and it gives another indication that the unfertilized egg of Ascidian must be considered as a totipotent or regulative system.

(3) By means of some histochemical reactions, the nature of the content of the clear and the dark fragments was investigated. The Nadi reaction and the vital staining with Janus green demonstrate that the mitochondria are absent in the clear fragments and present in the dark ones. The fact that the mitochondria are present only in the pigmented fragments which develop and give rise to normal tadpoles, and are absent in the clear fragments which do not develop at all, suggests the hypothesis that the mitochondria have an important role in Ascidian development and morphogenesis. Such a suggestion fits in with some earlier observations<sup>4-7</sup>. The morphogenetic role of the mitochondria might be related to the enzymes which are present in their structure, and which are implicated mainly in the liberation and utilization of the chemical energy.

(4) If the morphogenetic role of the mitochondria is admitted, one can explain why both fragments in *A. malaca* can develop<sup>2</sup>. In fact URBANI and URBANI-MISTRUZZI<sup>3</sup> showed that in *A. malaca* both fragments resulting from the centrifugation of the egg show a positive Nadi reaction, that is both fragments contain mitochondria.

G. REVERBERI and R. LA SPINA

Zoological Institute, University of Palermo (Italy), November 12, 1958.

### Riassunto

Dei due frammenti, jalino e pigmentato, ottenuti per centrifugazione dall'uovo vergine di *Ciona intestinalis*, solo il frammento scuro è capace di svilupparsi. Da esso può avversi una larva completamente normale. Questo risultato è spiegato attribuendo un valore morfogenetico ai mitocondri che sono presenti esclusivamente nel frammento scuro.

## Über die Wirkung von Elastase auf die Blutgerinnung

Die von BALÓ und BANGA entdeckte Elastase<sup>1</sup> kann unseren heutigen Kenntnissen nach als ein eiweißspaltendes Ferment betrachtet werden, dessen spezifisches Substrat das Elastin, ein Eiweiß der elastischen Fasern, ist. Die Elastase ist kein spezifisches Enzym und baut außer Elastin auch andere Eiweißkörper ab: denaturiertes Hämoglobin, Serum-Albumin, Kasein und gewisse synthetische Substrate<sup>2</sup>. Da diese Substrate auch durch Trypsin abgebaut werden, das die Blutgerinnung durch Aktivierung des Prothrombins fördert<sup>3</sup>, lag es nahe zu prüfen, ob auch die Elastase die Blutgerinnung beeinflusst.

Wir haben frisches Zitrat- oder Oxalatblut, menschliches, Rinder-, Schweine- und Kaninchenblutplasma untersucht. Fibrinogen wurde nach unseren Verfahren<sup>4</sup>, rohes Prothrombin nach MELLANBY<sup>5</sup> hergestellt, Thrombokinase nach CHARGAFF<sup>6,7</sup>. Die Elastase wurde mit unseren Adsorptionsverfahren gewonnen<sup>8,9</sup>. Das in unseren Versuchen gebrauchte hellgelbe, lyophile Endprodukt enthielt – gemessen an BANGA's Elastin<sup>10</sup> mit einer kombinierten Biuret-Folin-Reaktion<sup>11,12,13</sup> – 100 Elastase-Einheiten (E. E.) pro mg. In Kontrollversuchen haben

<sup>1</sup> J. BALÓ und I. BANGA, Schweiz. Z. Pathol. 12, 350 (1949).

<sup>2</sup> N. H. GRANT und K. C. ROBBINS, Arch. biochem. Biophys. 66, 396 (1957).

<sup>3</sup> H. EAGLE und T. N. HARRIS, gen. Physiol. 20, 543 (1937).

<sup>4</sup> D. BAGDY, Hung. Acta physiol. 2, 18 (1949).

<sup>5</sup> J. MELLANBY, Proc. Roy. Soc. London, Series B, 107, 271 (1931).

<sup>6</sup> E. CHARGAFF, D. H. MOORE, und A. BENDICH, J. biol. Chem. 145, 593 (1942).

<sup>7</sup> Die angewandten Thrombinpräparate waren Produkte der Firmen G. Richter und Hoffmann-La Roche.

<sup>8</sup> D. BAGDY und I. BANGA, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 11, 371 (1957).

<sup>9</sup> D. BAGDY und I. BANGA, Exper. 14, 64 (1958).

<sup>10</sup> I. BANGA, Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 3, 317 (1952).

<sup>11</sup> U. J. LEWIS, F. E. WILLIAMS, und N. G. BRINK, J. biol. Chem. 222, 705 (1956).

<sup>12</sup> L. A. SACHAR, K. K. WINTER, N. SICHER und S. FRANKEL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 323 (1955).

<sup>13</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

<sup>1</sup> G. REVERBERI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 18, 129 (1940).

<sup>2</sup> F. ALMAGIÀ, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 20, 179 (1946).

<sup>3</sup> E. URBANI und L. URBANI-MISTRUZZI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 21, 69 (1947).

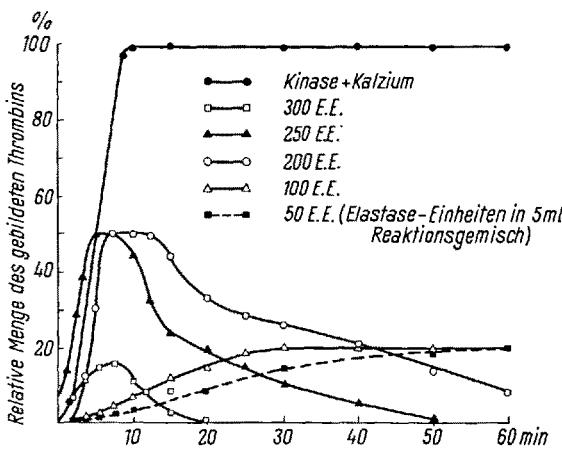
<sup>4</sup> G. REVERBERI, in *The Beginnings of Embryonic Development* (Amer. Ass. Adv. Sci. Publ. No. 48, Washington 1957), p. 319.

<sup>5</sup> G. REVERBERI, Acta embryol. morphol. exper. 1, 12 (1957).

<sup>6</sup> G. ORTOLANI, Acta embryol. morphol. exper. 1, 247 (1958).

<sup>7</sup> R. LA SPINA, Acta embryol. morphol. exper. 2, 66 (1958).

wir das kristallinische, dialysierte und lyophilisierte Trypsinpräparat einer dänischen Firma<sup>14</sup> angewandt.



Die Gerinnungszeit wurde bei Zimmertemperatur auf Grund des Auftretens von Fibrinfäden auf Tüpfelplatten mit Stoppuhren gemessen.

Wir haben bei den Vorversuchen beobachtet, dass die Elastase ähnlich dem Trypsin die Rekalcifikationszeit verschiedener Blutplasmen in beträchtlichem Masse zu verkürzen fähig ist. In folgenden Versuchen haben wir festgestellt, dass das Enzym seinen gerinnungsfördernden Einfluss auf Blutplasma unter bestimmten Konzentrationsgrenzen auch in Abwesenheit von Kalzium besitzt.

Man bekommt die kürzesten Gerinnungszeiten oder die relativ höchsten Thrombinaktivitäten bei einer Elastasekonzentration von 30–35 E. E. je ml Blutplasma. Dagegen ist die Elastase nicht fähig das Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln und hat keinen Einfluss auf die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung, ausserdem löst sie das Reaktionsprodukt auf. Das Enzym lässt das Fibrinogen bei niedrigen Konzentrationen unverändert und zerstört es sofort bei den für die Plasmagerinnung optimalen Konzentrationen. Fibrinogen bildet sich auch bei Zugabe von Thrombin nicht mehr.

Die Elastase wirkt auf den Blutgerinnungsprozess durch Aktivierung des Prothrombins. Gibt man verschiedene Mengen von Elastase bei Zimmertemperatur zu einer rohen Prothrombinlösung und untersucht die gerinnungsfördernde Wirkung der aus dem Reaktionsgemisch ausgenommenen Proben an gereinigtem Fibrinogen, so kann man Folgendes beobachten: Bei niedrigen Elastasekonzentrationen gibt es keine Thrombinbildung. Bei einem Enzymüberschuss bildet sich auch kein Thrombin, weil Prothrombin, wie auch Thrombin, durch Elastase sehr rasch abgebaut werden. In relativ engen Grenzen verursacht eine kleine Steigerung der Enzymkonzentration die unverhältnismässig grosse Zunahme der entstehenden Thrombinmenge. Eine beträchtliche Thrombinmenge bildet sich bei diesen Elastasekonzentrationen sehr schnell. Die Geschwindigkeit der Thrombinbildung durch Elastase (Abb.) entspricht der physiologischen, mit Kinase und Kalzium erzielten Aktivierung, die als Kontrolle durchgeführt wurde. Das durch Elastase erzeugte Thrombin beträgt die Hälfte der mit Kinase und Kalzium gewonnenen Thrombinmenge. Die optimalen Enzymkonzentrationen entsprechen etwa 40–50 E.E. je ml des Reaktionsgemisches bzw. je 25 mg Eiweiss im Prothrombin. Man

muss nämlich darauf hinweisen, dass die Optimalkonzentration von Elastase entscheidend durch die Eiweisskonzentration der Prothrombinlösung bestimmt wird. Bei einem höheren Eiweissgehalt steigt auch die Optimalkonzentration. Bei niedrigeren Enzymkonzentrationen, zum Beispiel 10–20 E.E. je 25 mg Protein, bildet sich zwar durch Elastase gleich viel Thrombin wie aus Prothrombin durch Thrombokinase, die Bildungsgeschwindigkeit ist aber sehr niedrig und die Menge des Thrombins sehr gering. Bei höheren Enzymkonzentrationen dagegen, zum Beispiel 60–70 E.E. je 25 mg Eiweiss, steht der proteolytische Abbau durch Elastase der Thrombinbildung nicht nach und so geht das gebildete Thrombin sehr rasch zugrunde. Zwischen den Mengen des Prothrombins, der Elastase und des gebildeten Thrombins besteht eine lineare Beziehung in der Prothrombin-Elastase-Reaktion. Verwendet man grössere Mengen von Prothrombin, so bildet sich mehr Thrombin und die Reaktion verbraucht mehr Elastase zur Umwandlung.

Die Reaktion zwischen Prothrombin und Elastase ist unabhängig von der Gegenwart von Thrombokinase und Kalziumionen. Einerseits kann die Elastase das Prothrombin in filtriertem Plasma leicht in Thrombin umwandeln. Anderseits gibt man ins Reaktionsgemisch bei Optimalkonzentration der Elastase verschiedene Mengen Thrombokinase bzw. Kalzium, so hat Elastase keinen Einfluss weder auf die Bildungsgeschwindigkeit noch auf die Menge des entstehenden Thrombins.

Die sich zwischen Prothrombin und Elastase abspielende Reaktion hat kein gut definiertes optimales pH. Je höher die Enzymkonzentration ist, desto mehr verschiebt sich das optimale pH gegen die saure Seite. Das kann dadurch erklärt werden, dass der Abbau des Thrombins bei höheren Enzymkonzentration sowie auch bei alkalischer Reaktion schneller ist.

Die ausführliche Veröffentlichung soll in der Zeitschrift Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. erscheinen.

D. BAGDY

Biochemische Abteilung des Forschungsinstituts für pharmazeutische Industrie, Budapest (Ungarn), 6. November 1958.

#### Summary

Purified elastase prepared by adsorption on synthetic zeolite in proper concentrations causes the coagulation of blood. Elastase was found to have no direct coagulative action on purified fibrinogen. Its coagulating action is due to the fact that it reacts with prothrombin to form thrombin. The reaction between prothrombin and elastase is independent of the presence of either platelets, thromboplastin or Ca-ions.

#### PRO EXPERIMENTIS

#### A Simple Method for the Assay of Carbohydrases

Chemical methods for the assay of carbohydrases in general are mainly based on the increase in the reducing value of the substrates on incubation of the reaction mixtures with the enzyme under consideration and can

<sup>14</sup> Novo Industri A/S.