

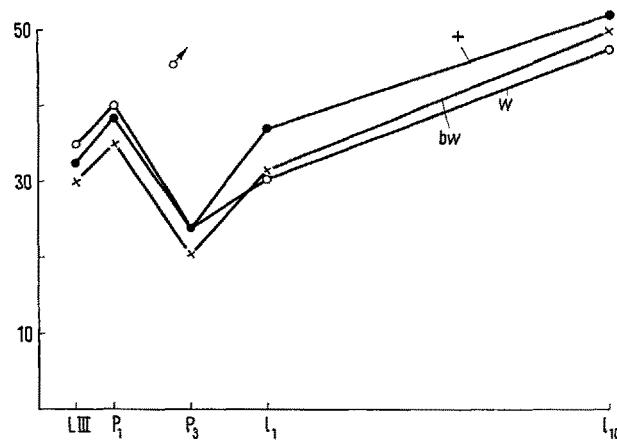
**Xanthinhydrogenase beim Wildtyp
und bei den Mutanten *white* und *brown*
von *Drosophila melanogaster*¹**

Die Augenfarbmutanten *white* (*w*; 1-1,5) und *brown* (*bw*; 2-104,5) akkumulieren wie der Wildtyp während der Metamorphose Isoxanthopterin und Harnsäure. Beim Wildtyp werden die erreichten Konzentrationen dieser Verbindungen im Körper dauernd beibehalten, während sie bei *w* und *bw* rasch abnehmen und 4 d nach dem Schlüpfen im Körper nicht mehr nachzuweisen sind²⁻⁶. Das Fehlen von Harnsäure und Isoxanthopterin in älteren Imagines könnte darauf beruhen, dass das Enzym Xanthinhydrogenase nicht oder in einer inaktiven Form vorhanden ist. Dieses Ferment katalysiert die Oxydation von 2-Amino-6-oxypteridin zu Isoxanthopterin bzw. Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure⁷.

In der vorliegenden Arbeit bestimmten wir die Aktivität dieses Enzyms im Laufe der Entwicklung, wobei wir im wesentlichen die von GLASSMAN und MITCHELL⁸ angegebene Methode verwendeten. 40 mg gleichaltrige, auf Standardfutter aufgezogene *Drosophila*-Männchen (verpuppungsreife Larven (L III), 1 d bzw. 3 d alte Puppen (*P*₁ und *P*₃), 1 d bzw. 10 d alte Imagines (*I*₁ und *I*₁₀)) des Wildstammes *Sevelen* bzw. der Mutanten *white* und *brown* wurden in einem kleinen Glas-Homogenisator in 1 ml eiskaltem Sigma-Tris-Puffer (pH 8,00) homogenisiert und mit 40 mg pulverisierter Kohle (Carbo adsorbens Siegfried) versetzt. Nach 30 min Stehen bei 1°C wurde während 20 min mit 20000 g bei 1°C zentrifugiert. Alle fluoreszierenden Stoffe sind jetzt quantitativ an die Kohle adsorbiert, was durch Chromatographie eines Teiles des Überstehenden kontrolliert wurde. 0,5 ml des Überstehenden wurden sodann mit 0,02 ml 10⁻³ M 2-Amino-6-oxypteridin und 0,02 ml 10⁻³ M Methylenblau 20 min lang bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Eintauchen in siedendes Wasser gestoppt. Vom Reaktionsgemisch wurden 0,05 ml auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 aufgetragen und aufsteigend eindimensional chromatographiert (*n*-Propanol:1% Ammoniak 2:1). Als Mass für die Enzymaktivität verwendeten wir die Menge des entstandenen Isoxanthopterins, dessen Fluoreszenzintensität direkt vom Papier gemessen wurde⁹.

Die Ergebnisse gehen aus der Figur hervor, deren Punkte Mittelwerte aus je zwei Ansätzen darstellen. Auffällig ist zunächst, dass offenbar keine wesentlichen Unterschiede in der Aktivität der Extrakte verschiedener Genotypen bestehen. Allen untersuchten Genotypen ist sodann gemeinsam der Anstieg beim Metamorphosebeginn, der pupale Abfall der Aktivität und der anschliessende Anstieg während des Imaginal-Lebens.

Nach diesen *in vitro* erhobenen Befunden haben also die Mutanten *w* und *bw* zeitlebens die Fähigkeit, 2-Amino-6-oxypteridin in Isoxanthopterin umzuwandeln. Diese Annahme konnte bestätigt werden durch folgenden *in vivo*-Versuch: 0,5 µl einer 5 · 10⁻² M Lösung von 2-Amino-6-oxypteridin in Wasser wurden in 6 d alte *white*-Fliegen injiziert. Die Fliegen wurden anschliessend in den 25°C-Thermostaten zurückgebracht und nach 6 bzw. 12 h *in toto* zusammen mit einem kleinen Tropfen (1-2 µl) Lösungsmittel auf Chromatographiepapier zerrieben. Diese Methode hat gegenüber dem üblichen «trockenen» Auftragen der Fliegen den Vorteil, dass die Fraktionen weniger am Startpunkt liegen bleiben. Zur Kontrolle wurden unbehandelte *white*-Fliegen des gleichen Alters mitchromatographiert. Diese Fliegen enthalten erwartungsgemäss³ keine fluoreszierenden Stoffe, während in den injizierten Tieren Isoxanthopterin in beträchtlichen



Mengen (erheblich mehr, als der Wildtyp normalerweise enthält) gebildet werden ist, und zwar schon nach 6 h «Inkubation» bei Männchen und Weibchen. (Einige für die Chromatographie nicht verwendete injizierte Fliegen starben nach rund 12 h; der Grund dieses Absterbens wurde nicht untersucht.)

Für das Fehlen von Isoxanthopterin und Harnsäure in *w*- und *bw*-Imagines kann somit kaum ein Fehlen von Enzym-Aktivität verantwortlich gemacht werden. Unsere Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen neuerer Untersuchungen unseres Institutes⁴, in denen u. a. durch Fütterungsversuche gezeigt werden konnte, dass 10 d alte *w*- und *bw*-Imagines imstande sind, Isoxanthopterin und Harnsäure zu synthetisieren. Die beiden Verbindungen werden fortwährend mit den Spätxkreten wieder ausgeschieden⁴. Merkwürdigerweise scheiden aber sowohl *w* als auch *bw* nicht mehr Isoxanthopterin und Harnsäure aus als der Wildtyp. Dies gilt sowohl für die Meconien^{10,11} wie auch für Spätxkrete⁴. Der Grund, weshalb adulte *w*- und *bw*-Tiere trotzdem keine Harnsäure enthalten, scheint darauf zu beruhen, dass die Uricase-Aktivität in *w* und *bw* grösser ist als beim Wildtyp; die gebildete Harnsäure wird demnach dauernd abgebaut, oder nicht abgebaute Restmengen können auch sofort ausgeschieden werden. Für das Fehlen von Isoxanthopterin in *w*- und *bw*-Imagines scheint der niedrige Gehalt an der Vorstufe 2-Amino-6-oxypteridin verantwortlich zu sein. Diese Verbindung wird in den Meconien von *w* in grösseren Mengen ausgeschieden als beim Wildtyp^{10,11}. Diesem Befund entspricht auch die Beobachtung von HADORN und MITCHELL², wonach *w*-Abdomina weniger 2-Amino-6-oxypteridin enthalten als der Wildtyp.

¹ Ausgeführt mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Herrn Prof. Dr. E. HADORN danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit.

² E. HADORN und H. K. MITCHELL, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 650 (1951).

³ E. HADORN, Exper. 10, 483 (1954).

⁴ P. AUF DER MAUR, Z. Vererb., im Druck.

⁵ R. DANNEEL und B. ESCHRICH-ZIMMERMANN, Z. Naturforsch. 12b, 730 (1957).

⁶ G. E. GRAF, Genetics 44, 513 (1959).

⁷ H. S. FORREST, E. GLASSMAN und H. K. MITCHELL, Science 124, 725 (1956).

⁸ E. GLASSMAN und H. K. MITCHELL, Genetics 44, 153 (1959).

⁹ E. HADORN und A. KÜHN, Z. Naturforsch. 8b, 582 (1953).

¹⁰ E. HADORN und R. KÜRSTEINER, Archiv Julius Klaus Stiftung 30, 494 (1955).

¹¹ R. KÜRSTEINER, Rev. suisse Zool., im Druck.

¹² Gegenwärtige Adresse: Mergenthaler Laboratory for Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore (Maryland).

Summary. Mature larvae, one day and three days old pupae, one day and ten days old adult *Drosophila melanogaster* males were assayed *in vitro* for the enzyme, xanthinehydrogenase. Very high enzyme activity was found in wildtype and both *w* and *bw* throughout the period investigated. Also 6 days old *white* flies proved to be able to form isoxanthopterin from 2-amino-4-oxy-

pteridine in an *in vivo* assay. The results are discussed with regard to the absence of isoxanthopterin and uric acid in *white* and *brown* imagines.

H. URSPRUNG¹²

Zoologisch vergleichend-anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz), 23. Februar 1961.

Spontaneous Potentials from Explants of Embryo Chick Pons (Myelencephalon) in Culture¹

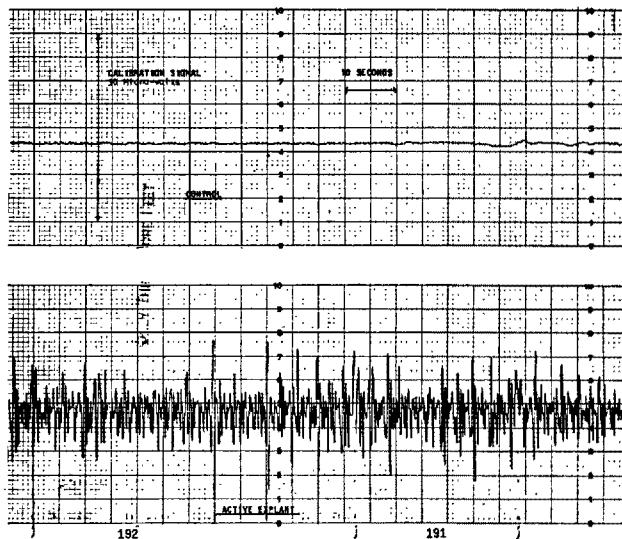


Fig. 1. *Lower Trace:* Record of spontaneous potentials from Pons after 5 h in culture. X axis - Vertical lines 1 sec apart. Y axis - Horizontal lines $1\frac{1}{2}$ μ V apart. *Upper Trace:* Control of dead cerebellar tissue under identical conditions and with identical time and amplitude scales.

Spontaneous potentials have been demonstrated in explants from the pontine flexure of the myelencephalon at the level of the middle cerebellar peduncles and the 5th, 6th, and 7th cranial nerve nuclei of 11 day chick embryos using techniques and supernatant similar to those used to demonstrate spontaneous potentials from explants of chick embryo cerebellum in tissue culture in Kahn tubes². The explants used in this work were 1 mm thick coronal slices of myelencephalic tissue. The control used was dead cerebellar tissue explanted into a Kahn tube in the same manner as the myelencephalic tissue and kept side by side with the tubes containing the living culture material in the same incubator with identical amplification and recording apparatus. The living myelencephalic tissue gave potentials with the same form and magnitude and the control gave no potentials at all in each recording channel where they were tried.

Figure 1 shows the form of the potentials 5 h after the explantation. They consisted of a complex combination of relatively simple signals against a background of a repetitive signal of about 5 μ V coming at intervals of about $1\frac{1}{2}$ sec. Larger potentials of a relatively simple form and a magnitude of about 15 μ V were superimposed on the repetitive lesser signals with a tendency to occur in pairs of which the individual members were about 2 sec apart. These pairs occurred at about 10 sec intervals.

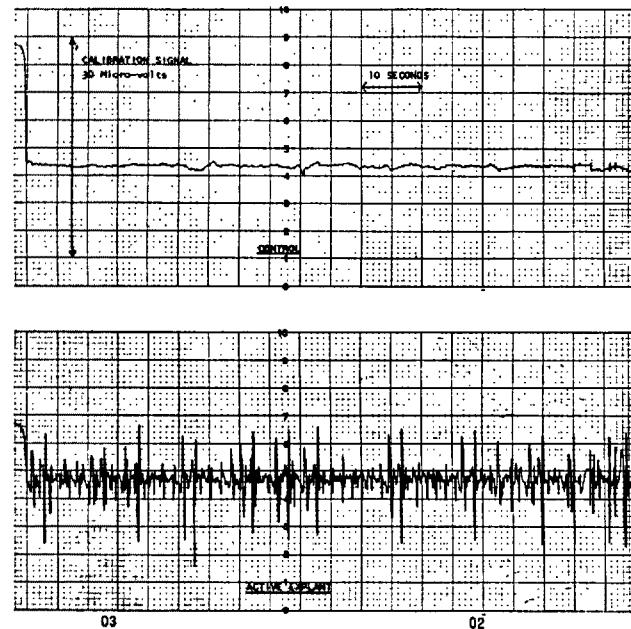


Fig. 2. *Lower Trace:* Record of spontaneous potentials from Pons after 36 h in culture. X axis - Vertical lines 1 sec apart. Y axis - Horizontal lines $1\frac{1}{4}$ μ V apart. *Upper Trace:* Control of dead cerebellar tissue under identical conditions and with identical time and amplitude scales.

Figure 2 shows the form of the potentials 36 h after explantation. The small repetitive signal had now disappeared and the larger signals had become less in amplitude - 4-5 μ V and the tendency to occur in pairs is still present though the members of the pairs are further apart (5-10 sec). The pairs themselves are at intervals of about 20 sec. This activity continued for more than 120 h after explantation.

Zusammenfassung. Vorkommen und Form spontaner Potentialen aus Myelencephalon-Explantaten (Nuclei-Region der Kranialnerven 5-7) 11 Tage alter Hühnchenembryonen in Gewebekultur werden beschrieben. Die Registrierung erfolgte während mehr als 120 h.

A. W. B. CUNNINGHAM

Tissue Dynamics Laboratory, Pathology Department, University of Texas Medical Branch, Galveston (Texas), January 16, 1961.

¹ This work was done under a U.S. Navy Contract, NONR 1598(04).

² A. W. B. CUNNINGHAM, M. DOUGHERTY, and B. J. RYLANDER, Nature 186, 477 (1960).