

für das Follikel epithel beschriebene - nach Diastasebehandlung abgeschwächt bestehen bleibt. Nach Abschluss der Vitellogenese bilden die Follikelzellen zur Oocyte hin sägezahnartige Fortsätze (Figur 1) aus^{15,16}. Das Stadium, auf dem diese Umwandlung soeben beginnt, erweist sich in Kurzzeitexperimenten mit 3 min (Figur 2) bis $\frac{1}{2}$ h Inkubationsdauer als die Phase der stärksten Kohlenhydrateinlagerung in die Eizelle. In Präparaten, mit denen vor Herstellung der Autoradiogramme zusätzlich die PAS-Reaktion durchgeführt wurde, sind solche Oocyten deutlich von etwas älteren, voll ausgebildeten Sägezahnstadien (Figur 1) zu unterscheiden; bei diesen hat der Umsatz des Tracers bereits nachgelassen, der färbereichsichtbare Gehalt an Glykogen dagegen zugenommen. Der Glucoseeinbau hält schwächer werdend bis zur beginnenden Auflösung der grossen Eiweissdotter-schollen an, wie nach Inkubationszeiten von 24 bis 80 min festzustellen ist, und hört erst mit der Chorionbildung auf. Danach ist die Deponierung von Reservestoffen überhaupt und damit das Wachstum der Oocyte beendet.

Sehr lange Einbauzeiten (10 bis 48 h) führen zu einer zunehmend gleichförmigen Verteilung der Radioaktivität in den Präparaten. Den relativ stärksten Einbau weisen zwar noch die Sägezahnstadien auf, doch sind mit Ausnahme des Germariums und der jüngsten Follikel alle Abschnitte des Ovars diffus markiert. Da diese Markierung zu einem grossen Teil diastaseresistent ist, rührt sie wahrscheinlich von metabolisch verwerteter H^3 -Glucose her. Die Aktivität kann dabei sowohl in Proteine wie auch in Lipide, woraus sie während der histologischen Bearbeitung allerdings grösstenteils extrahiert wird, gelangt sein.

Die Synthese des Glykogens der Eizellen erfolgt sehr wahrscheinlich direkt in ihrem Reticuloplasma. Dafür spricht dessen völlig gleichmässige Markierung bereits nach 3 min Inkubationszeit in Oocyten fortgeschrittener Stadien von immerhin $200 \mu \varnothing$ (Figur 2). Der Tauchversuch zeigt weiterhin, dass Bienenovarien Glucose als Ausgangsprodukt für ihre Reservekohlenhydrate dienen kann. Es muss angenommen werden, dass *in vivo* der Weg aus der Haemolymphe kommender Zucker ohne Einschaltung von Transportvorgängen *per diffusionem* in die Oocyte führt, da sonst zumindest in Kurzzeitversuchen ein Markierungsgradient sichtbar werden müsste, der nirgends beobachtet werden konnte. Die Glucose dringt ebenso schnell wie andere organische Verbindungen ähnlichen Molekulargewichts (Aminosäuren, Nucleoside^{1,17}) in das Ooplasma ein. Das gebildete Glykogen bleibt vermutlich am Syntheseort liegen.

Die auf mittleren Stadien im Follikel epithel nachweisbaren, relativ geringen Mengen von ihrer Diastaseresistenz wegen zum Teil wohl proteingebundenen Kohlenhydraten

werden vielleicht von den Follikelzellen selbst, die ja erhebliche morphologische Veränderungen durchmachen, energetisch verwertet und aufgebraucht, wie das in ähnlicher Weise auch für die vorübergehend über dem Nähr-fach auftretende Markierung angenommen werden kann.

In der Eizelle folgt das Maximum der Glykogeneinlagerung zeitlich dem Abfall der euplasmatischen Eiweissbildung¹⁵. Daraus kann die zellphysiologisch allgemein wichtige Hypothese abgeleitet werden, dass Protein- und Polysaccharidsynthese Funktionsleistungen des Cytoplasmas sind, die nicht gleichzeitig maximal auftreten und denen sehr wahrscheinlich verschiedene Arbeitsstrukturen im Ultrabereich zugrunde liegen, wie elektronenoptische Befunde an Leberzellen der Vertebraten¹⁸ bereits vermuten lassen. Ein Antagonismus von Protein- und Glykogensynthese würde die oft beobachtete Einlagerung der Reservekohlenhydrate erst gegen Ende der Oogenese physiologisch verständlich machen¹⁹.

Eine ausführliche Darstellung der Untersuchungen²⁰, die weitergeführt werden, erfolgt später anderwärtig²¹.

Summary. The incorporation of tritiated glucose into the ovary of honey bee queens was studied by autoradiography. During the last stages of oogenesis, the synthesis of respectable amounts of glycogen was found in the reticuloplasm of the developing eggs. The follicle epithelium and also the nurse cells only appeared more lightly and transitory labelled at medium stages. An hypothesis was established concerning an antagonism of protein and polysaccharide formation in the cytoplasm corresponding to the rather late occurrence of glycogen in insect oogenesis.

W. ENGELS und W. DRESCHER

Zoologisches Institut der Universität Münster (Deutschland) und Institut für Bienenkunde der Universität Bonn (Deutschland), 23. März 1964.

¹⁶ W. PAULCKE, Zool. Jb. Anat. 14, 177 (1901).

¹⁷ M. ZALOKAR, Exp. Cell Res. 19, 184 (1960).

¹⁸ H. THEMANN, Veröff. morph. Pathol. vol. 66 (Stuttgart 1963).

¹⁹ Während der Drucklegung erschien eine elektronenoptische Untersuchung²¹ über die Glykogenbildung im Trophoblastenstadium der menschlichen Plazenta. Dort kommt es erst in solchen Zellen zur Glykogenanhäufung, an deren endoplasmatischem Reticulum bereits degenerative Veränderungen beobachtet werden können. Diese Befunde stützen unsere oben geäusserte Hypothese über ein zeitliches Nacheinander der Protein- und Polysaccharidsynthese im Entwicklungszyklus von Zellen oder Zellbereichen.

²⁰ Y. YOSHIDA, Exp. Cell Res. 34, 293 (1964).

²¹ Herrn Prof. Dr. K. BIER verdanken wir viele Anregungen und kritische Hinweise.

Presence of 'RNA Immuno-Carrier' in Immune Rabbits' Serum

In 1950 one of us¹ showed the importance of immune nucleoproteins in antibody-globulin production, and advanced the hypothesis that the initial step of the antibody synthesis was localized in the nuclear and mitochondrial nucleic acids². It is commonly assumed that immune response is related to the joint actions of two types of cells³: the R.E.S. cells with high phagocytic and enzymat-

ic activities which analyse the antigenic substances, and the lymphatic system cells which, after having received the information transmitted by R.E.S. cells, produce specific antibodies. In fact, according to morphological studies, it seems unlikely that the antibody-globulin pro-

¹ L. MICHELAZZI, Boll. Ist. sieroter. milan. 29, 28 (1950).

² L. MICHELAZZI, Boll. Ist. sieroter. milan. 30, 105 (1951).

³ B. H. WAKSMAN, Ann. Inst. Past. 105, 465 (1963).

ducing cells come from the antigen phagocytizing cells⁴. We therefore thought that, following upon the introduction of antigen, the R.E.S. cells synthesize a specific permanent model which is able to produce an RNA which performs the antibody-globulin synthesis in the lymphatic system. If this assumption was right, the 'RNA Immuno-Carrier' would have been present in sera from immunized animals. The following preliminary investigations were then undertaken. Female rabbits weighing 1.5–1.8 kg, fed with a standard diet, were immunized by 6–8 intravenous injections of horse serum albumin (HSA) (titres obtained 1:8,000–1:10,000), or of red blood cells (RBC) of rat or guinea-pig (titres obtained 1:1600–1:3200). The γ -globulins were precipitated from the sera with cold ethanol in refrigerated '25' MSE centrifuge according to the method of DEUTSCH⁵. The estimation of RNA content in normal and immune sera (collected 8–10 days after the last injection of antigen) was made in: (i) serum *in toto*, (ii) γ -globulin fraction, (iii) other fractions, by the method of SCHMIDT and THANNHAUSER⁶ modified as described in a previous paper⁷. The isolation of RNA from normal and immune sera *in toto*, from γ -globulin fraction and from other fractions, was made by a slightly modified method of KIRBY⁸. Finally the RNA was suspended in 0.154M NaCl and intravenously injected into normal rabbits in the amount of 1.45 mg/kg body weight. To ascertain the antibody production, small blood samples were collected at various intervals after the RNA injection. The sera were subjected to precipitation tests both with zonal reaction in capillary tubes and with latex particles 0.81 μ (Hyland) coated with HSA, microscopic and macroscopic haemagglutination tests and haemolysis tests, with the

antigen used for immunizing the animals which were the source of the RNA. The behaviour of haemolysis was also estimated in a Beckman DU spectrophotometer at 520 m μ at 37°C for 150 min. The antigen-antibody reaction was also shown by the indirect immunofluorescent technique using rat RBC and HSA coated latex particles.

A significant increase of RNA content in immune sera and chiefly in the γ -globulin fraction was observed (Table I). The RNA from *in toto* immune sera and from immune γ -globulins injected into normal animals is capable of stimulating the production of antibodies against the same antigens used for immunizing the animals from which the RNA Immuno-Carrier (RNA-I-C) was taken; the RNA from the other serum fractions is not able to stimulate the production of antibodies (Table II, Figure 1). The kinetic behaviour of a typical experiment of haemolysis observed spectrophotometrically is shown in Figure 2. Antibody production, 72 h after the RNA-I-C injection, was also revealed by the immunofluorescent technique (Figure 3). The anti-HSA and anti-RBC antibodies began to appear in the serum of RNA-I-C treated rabbits 12 h after the injection and to disappear 6–8 days later (Table II). The RNA from immune sera *in toto*, from γ -globulins and from

⁴ A. H. COONS, E. H. LEDUC, and J. M. CONNOLLY, J. exp. Med. 102, 49 (1955).

⁵ H. F. DEUTSCH, Methods in med. Res. 5, 271 (1952).

⁶ G. SCHMIDT and S. J. THANNHAUSER, J. biol. Chem. 161, 83 (1945).

⁷ G. NANNI, A. CASU, and I. BALDINI, Ital. J. Biochem. 13, 32 (1964).

⁸ S. KIRBY, Biochem. J. 64, 405 (1956).

Table I. RNA content of normal and immune sera

	Normal mg/100 ml	Immune mg/100 ml	% increase	't'	P <
Serum <i>in toto</i>	7.79 $\pm$ 0.48	9.64 $\pm$ 0.57	23.75	7.644	0.01
γ -Globulins	3.07 $\pm$ 0.26	4.60 $\pm$ 0.23	49.83	11.769	0.01
Other fractions	4.62 $\pm$ 0.33	4.95 $\pm$ 0.31	7.14	1.654	0.2
No. of experiments	24	24			

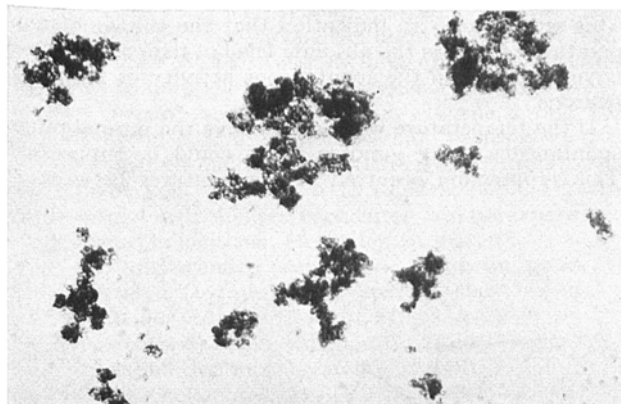
Table II. Immune response of normal rabbits injected with RNA extracted from (A) serum *in toto*, (B) γ -globulins and (C) other fractions of animals immunized with RBC or HSA

h after RNA-I-C injection	Anti-RBC						Anti-HSA		
	Reciprocal of agglutination titres			Reciprocal of haemolysis titres			Reciprocal of precipitation titres		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	neg. ^a	neg.	0	neg.	neg.	0	neg.	neg.	0
12	80	40	0	20	neg.	0	neg.	neg.	0
24	160	80	0	160	40	0	10	neg.	0
48	640	320	0	320	160	0	80	40	0
72	320	160	0	80	80	0	160	80	0
96	40	40	0	20	10	0	20	10	0
144	10	10	0	neg.	neg.	0	neg.	neg.	0
192	neg.	neg.	0	neg.	neg.	0	neg.	neg.	0

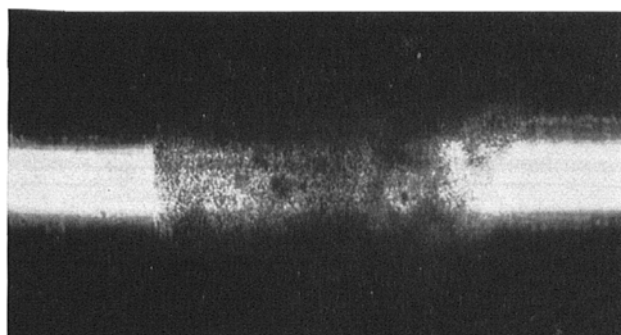
^a Negative is less than 10.

other fractions did not show any precipitating, agglutinating or haemolyzing capacity at the concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$, with or without previous incubation for 30 min at 37°C with normal serum. Check tests of the RNA

preparation were made by spectrophotometric absorption in ultraviolet light and by paper electrophoretic and chromatographic analysis; the protein content determined by biuret method was less than 0.21%. This seems to confirm the hypothesis that there is present in the serum an RNA which increases during the immune response. Since it is able to stimulate the specific production of antibodies in normal animals, it is likely that it is also responsible for antibody production by lymphatic system cells in immunized animals. Further investigations on this problem are in progress.



A



B

Fig. 1. (A) Slide agglutination of rat RBC by serum (1:100) from rabbit treated with anti-rat-RBC RNA-I-C. (B) Zonal reaction in capillary tube between HSA (1:100) and serum from rabbit treated with anti-HSA RNA-I-C.

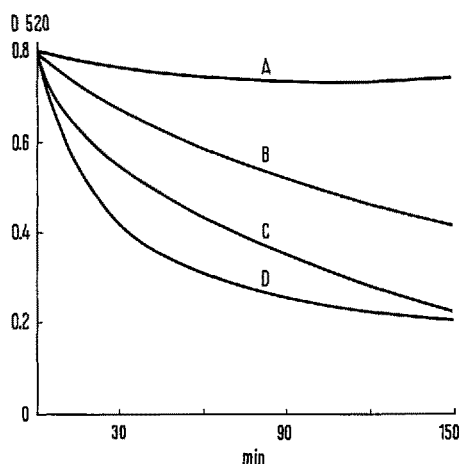
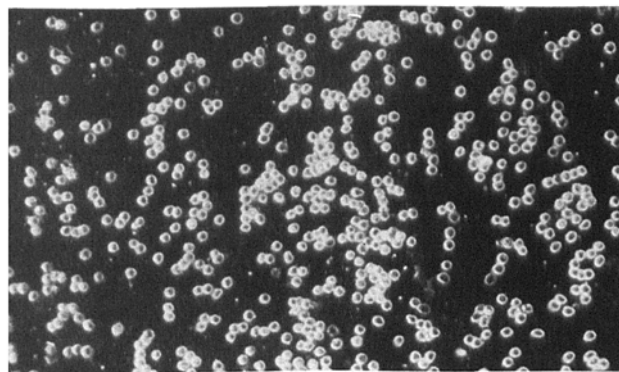
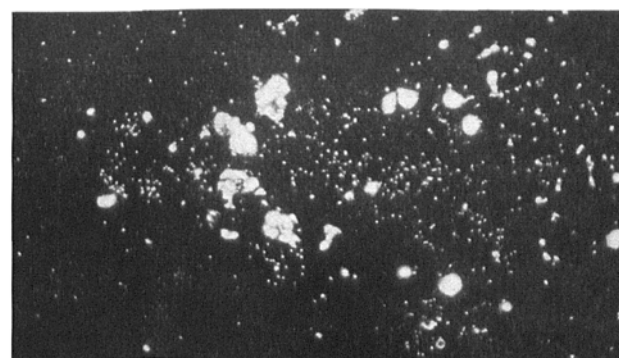


Fig. 2. Spectrophotometric behaviour of rat RBC haemolysis by: (A) normal serum, (B) serum from rabbit 24 h after injection of anti-rat-RBC RNA-I-C, (C) *idem* 48 h after, (D) anti-rat-RBC hyper-immune serum.



A



B

Fig. 3. (A) Immuno-fluorescence test: rat RBC incubated at 37°C with serum (1:10) from a rabbit treated with anti-rat-RBC RNA-I-C and then incubated with fluorescent anti-rabbit globulins. (B) Immuno-fluorescence test: HSA coated latex particles incubated at 37°C with serum (1:10) from a rabbit treated with anti-HSA RNA-I-C and then incubated with fluorescent anti-rabbit globulins.

Résumé. Nous avons observé une augmentation du ARN contenu dans le sérum des animaux immunisés; cette augmentation est liée surtout à la fraction des γ -globulines. Le transfert dans les animaux normaux du ARN extrait par le sérum immunisant détermine la prompt production des anticorps vers les mêmes antigènes utilisés pour l'immunisation.

L. MICHELAZZI, G. NANNI,
I. BALDINI, and A. NOVELLI

Istituto di Patologia Generale, Università di Genova (Italy), May 8, 1964.