

3,5 mal mehr DNS gefunden wird als im Mittel in nicht-transplantierten Zellen des sekretorischen Teiles der Vorpuppendrüse.

**Summary.** Larval salivary glands of early third instar larvae were implanted into the abdomens of adult females. After a culture of 20 days, the nuclei show at least the normal maximal DNA content which is characteristic of full-grown larvae or prepupae. There are, however,

also nuclei in the implants with a DNA content that exceeds up to 3.5 times the average found in controls.

E. HADORN\*, F. RUCH\*\*  
und M. STAUB\*

*Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich\* und Institut für Allgemeine Botanik, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich\*\* (Schweiz), 21. Juli 1964.*

### Die Rouleau-Bildung der Rindererythrocyten<sup>1</sup>

Die Rouleau(Geldrollen)-Bildung der nativen Pferdererythrocyten ist seit mehr als 100 Jahren bekannt. Es ist auch schon lange bekannt, dass die Pferdererythrocyten in unverdünntem, homologem Serum suspendiert – parallel mit ihrer Rouleau-Bildung – eine sehr rasche Senkung aufweisen. Die Rouleau-Bildung und die beschleunigte Senkung der menschlichen Erythrocyten wurde in viertausend Arbeiten studiert, da diese von der Verschiebung der Plasma- bzw. Serum-Eiweisskörper beeinflusst sind und eine diagnostische Bedeutung besitzen. Demgegenüber konnte mit Rindererythrocyten weder eine Rouleau-Bildung noch eine beschleunigte Senkung beobachtet werden. Als Ursachen des negativen Befundes können die folgenden Umstände vermutet werden: (1) im Rinderserum fehlen die, die Rouleau-Bildung fördernden Eiweisskörper, (2) die nativen Rindererythrocyten sind für die Rouleau-Bildung ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde die zweite Alternative experimentell untersucht. Wir nahmen an, dass die Rindererythrocyten zur Rouleau-Bildung deshalb ungeeignet sind, weil die Oberfläche ihrer Membran mit einer umfangreichen lockeren Proteinschicht bedeckt wird, die auch die Immunagglutination der nativen Rindererythrocyten sterisch hemmt.

In unserem ersten Versuch (Tabelle) wurden Trypsin (Armour) und Bromelin, Ficin, Papain (Mann, New York) verwendet. Die Erythrocyten wurden aus dem frischen, mit Glasperlen defibrinierten Blut gewonnen, mit physiologischer NaCl-Lösung dreimal gewaschen und die gewaschenen Zellen in den proteolytischen Fermenten von verschiedenen Verdünnungen suspendiert. Alle hierbei zur Anwendung gelangenden Fermente wurden in physiologischem NaCl suspendiert. Die Verdauung wurde bei 37°C im Brutschrank (30 min) vorgenommen, wonach die Erythrocyten wiederum dreimal gewaschen wurden. Zur phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung wurden 0,1 ml Erythrocytensediment zu 1,0 ml homologem, frischem Rinderserum und 1,0 ml physiologischem NaCl gegeben. Die Präparate wurden aus den umgeschüttelten Röhrchen sofort hergestellt, sie blieben aber mindestens 10 min in der feuchten Kammer, damit die Rouleaus ihre maximale Länge erreichten. Die Resultate sind der Tabelle zu entnehmen.

Die Resultate, die wir teilweise in der Tabelle zusammengefasst haben, bestätigen unsere Vermutung. Erst nach der Entfernung der lockeren Proteinhülle der Rindererythrocyten konnten diese mit dem homologen Serum typische Rouleaus bilden. Die besten Resultate wurden mit Trypsin erhalten. Zwei andere Trypsin-

präparate verhielten sich ähnlich. Von den pflanzlichen proteolytischen Fermenten war in den weiteren Versuchen das Bromelin etwas besser als das Ficin. Wir können es aber nicht erklären, weshalb eine Rouleau-Bildung mit Rindererythrocyten nicht zustande kam, wenn diese mit Papain vorbehandelt wurden. Ausser Papain Mann, wurden Papainpräparate von Merck, Difco und National Biochemical Corp. mit mehreren Rinderseren untersucht; nie erhielten wir eine deutliche Rouleau-Bildung. Diese gleichen Papainpräparate aktivierten die Rindererythrocyten gut zur Agglutination gegenüber menschlichem Mononukleosserum. Es könnte angenommen werden, dass die Papainpräparate eine Verunreinigung enthalten, die, an der Erythrocytenoberfläche absorbiert, die Rouleau-Bildung hemmt. Deshalb wurden die Rindererythrocyten mit Papain und mit Trypsin doppelt fermentiert, wobei die Reihenfolge der Fermentation (a) Trypsin-Papain, (b) Papain-Trypsin war. In beiden Fällen konnte aber eine Rouleau-Bildung beobachtet werden.

Westergreen-Röhrchenversuche wurden nicht eingestellt, doch konnte ganz deutlich beobachtet werden, dass die papainisierten Rindererythrocyten – ebenso wie die nativen Blutzellen – kaum eine Sedimentation aufweisen, während die mit anderen proteolytischen Fermenten vorbehandelten Erythrocyten eine schnelle Senkung zeigten.

Die Rouleau bildende Fähigkeit der Eiweisskörper war in allen der untersuchten fünf Rinderseren zu beobachten,

#### Rouleau-Bildung der proteolytisch vorbehandelten Rindererythrocyten in homologem Rinderserum

Pflanzliche Fermente, Verdünnung	Bromelin Rouleaus	Ficin Rouleaus	Papain Rouleaus	Trypsin Rouleaus
1:				
200	+ bis ++	+	-	1 000
400	++	++	-	4 000
800	±	±	-	16 000
1600	-	-	-	64 000

+++ Rouleaus mit 10 oder mehr Erythrocyten, ++ Rouleaus mit 5 bis 10 Erythrocyten, + Rouleaus mit 3 bis 5 Erythrocyten. ± Rouleaus nur hier und da mit 2 bis 3 Gliedern.

<sup>1</sup> Diese Arbeit wurde von der H.-Buss-Stiftung (Basel) unterstützt.

jedoch nicht mit der gleichen Intensität. In 1:2 Verdünnung des Rinder-Serums (in physiologischem NaCl) blieb die Rouleau-Bildung noch unverändert; in einer Verdünnung von 1:4 wurde sie bereits merklich abgeschwächt.

Die Zugabe von Rinderalbuminfaktion V (Endkonzentration 5%) zu frischem Serum verstärkte kaum die Rouleau-Bildung. Die Rolle des Albumins in der Rouleau-Bildung konnte jedoch unter den gleichen Bedingungen nachgewiesen werden, wie TOMCSIK und LITSCHEL<sup>2</sup> unlängst mit Pferdeerythrocyten und mit Pferdeserum beobachteten. Die Zugabe von Lyssolecithin Mann (Endkonzentration 1:32000) hat auch die Rindererythrocyten-Rouleaus sofort disintegriert. Es entstanden isolierte, kugelförmige Zellen mit gezacktem Rand. Das Zufügen von Albumin restituierter die Scheibenform der Zellen und die Rouleaus. Die Bildung von Rinder-Rouleaus hört gleich derjenigen der Pferde-Rouleaus auf, wenn das frische Serum auf 37° erwärmt wird. Die Inaktivierung des Pferdeserums vollzieht sich aber dreimal schneller als diejenige des Rinderserums. In beiden Fällen wird die Scheibenform der Erythrocyten und die Rouleau-Bildung nach Zugabe von Rinder-Albumin Fraktion V (Gesamtkonzentration 5%) zurückgestattet. Rouleaus entstanden bei den Rindererythrocyten – im Gegensatz zu Pferde-

erythrocyten – nicht, wenn Albumin allein (ohne homologes Serum) zugegeben wurde.

**Summary.** Not a trace of rouleau formation could be observed with native beef erythrocytes under varying conditions. A typical rouleau formation and a markedly increased sedimentation rate could, however, be elicited when the surface layer of the beef erythrocytes was carefully removed with proteolytic enzymes. This is an additional evidence that the beef erythrocytes are enveloped in a surface sheet, which inhibits their hemagglutination and their rouleau formation. Papain is a proteolytic enzyme, which is inactive regarding rouleau formation. Lyssolecithin disintegrates the rouleaus, albumin restores them.

E. LITSCHEL und J. TOMCSIK

*Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Basel (Schweiz), 14. Juli 1964.*

<sup>2</sup> J. TOMCSIK und E. LITSCHEL, *Pathologia et Microbiologia*, im Druck.

### The Isolation and Characterization of Cholesterol in Portuguese Men-of-War (*Physalia*)

The diversity of sterols, which are present in marine organisms, has been amply demonstrated by BERGMANN<sup>1</sup> and he has shown that a number of coelenterates contain cholesterol. We should like to report the occurrence of cholesterol in Portuguese Men-of-War (*Physalia*).

The sails of Portuguese Men-of-War, collected from the Gulf of Mexico, were homogenized for 2–3 min in chloroform:methanol (2:1). This homogenate was filtered to remove the sails and the solvents were removed to give the lipid extract which was then chromatographed on silica by thin layer chromatography with chloroform:benzene (50:50)<sup>2</sup>.

Relative retention times of sterol extract

Column	Column temperature °C	Free alcohol	TMSi <sup>a</sup>	TFA <sup>b</sup>	Acetate
A	220	2.00 (2.01)	2.43 (2.41)		
B	220	8.53 (8.45)			
C	222	7.29 (7.28)		5.62 (5.60)	
D	222	2.88 (2.90)		2.62 (2.60)	6.88 (7.00)

<sup>a</sup> Trimethyl silyl ether derivatives. <sup>b</sup> Trifluoracetate derivatives.

Retention times are relative to cholestan (figures in brackets are relative retention times for a known sample of cholesterol). Columns were prepared on acid washed Gas Chrom P (100–120 mesh). Columns A, C and D were coated with 1% F60 + 0.5% cyclohexanediol succinate, 1% neopentylglycol succinate, and 2% QF 1 (a fluoralkyl silicone polymer) respectively. Column B was coated with 1% neopentylglycol succinate on Gas Chrom P which had first been coated with polyvinyl pyrrolidone<sup>7</sup>.

The sterol fraction, one of the major fractions of the separated lipids, was shown to have one major sterol by gas liquid chromatography. Derivatives of the sterol were prepared by the method of VAN DEN HEUVEL, SJOVALL and HORNING<sup>3</sup>, trimethyl silyl ethers by the procedure of LUUKKAINEN, VAN DEN HEUVEL, HAAHTI and HORNING<sup>4</sup>.

The gas liquid chromatography data for these derivatives are summarized in the Table and confirm the characterization of the sterol as cholesterol.

Cholesterol has recently been isolated from higher plants, *Solanum tuberosum* and *Dioscorea spiculiflora*<sup>5</sup> and a species of *Penicillium*<sup>6</sup>.

**Résumé.** Les auteurs ont extrait un stérol d'une méduse des eaux portugaises (*Physalia physalis*) et l'ont identifié par chromatographie en phase gazeuse comme étant du cholestérol.

R. J. HAMILTON, W. J. A. VAN DEN HEUVEL, and E. C. HORNING

*Lipid Research Center, Baylor University College of Medicine, Houston (Texas USA), June 11, 1964.*

- 1 W. BERGMANN, in *Comparative Biochemistry* (Ed. M. FLORKIN and H. S. MASON; Academic Press, New York 1962), p. 103.
- 2 E. O. A. HAAHTI and T. NIKKARI, *Acta chem. scand.* 17, 536 (1963).
- 3 W. J. A. VAN DEN HEUVEL, J. SJOVALL, and E. C. HORNING, *Biochim. biophys. Acta* 48, 595 (1961).
- 4 T. LUUKKAINEN, W. J. A. VAN DEN HEUVEL, E. O. A. HAAHTI, and E. C. HORNING, *Biochim. biophys. Acta* 52, 599 (1961).
- 5 D. F. JOHNSTON, R. D. BENNET, and E. HEFTMANN, *Science* 140, 198 (1963).
- 6 Y. S. CHEN and R. H. HASKINS, *Can. J. Chem.* 41, 1647 (1963).
- 7 W. J. A. VAN DEN HEUVEL, W. L. GARDINER, and E. C. HORNING, *Anal. Chem.* 35, 1745 (1963).