

The histochemical evidence indicates differences in amount and distribution of enzyme activity in the 2 types of ova. These could represent genuine alterations in biochemical regulatory mechanisms following ovulation. A structural basis for such changes in mitochondrial enzymes has been observed by ZAMBONI and MASTROIANNI¹³, who showed that in early rabbit oocytes there are few, clustered mitochondria, whilst mature ova contain more numerous evenly distributed mitochondria. In the present work, however, an apparent increase in activity of lactate dehydrogenase was observed in superovulated eggs as compared with spontaneously ovulated eggs. This could be the result of gonadotrophin induced anomalies in the zona pellucida similar to those observed by KATZBERG and HENDRICKX¹⁴ in the baboon and thought to enhance the permeability of the zona.

A structural explanation for the eccentric distribution of activity of some dehydrogenases within the tubal ovum would require an irregular distribution of mitochondria. This is seen in oocytes of human primordial follicles where mitochondria are concentrated in the crescent-shaped Balbiani's vitelline body¹⁵. In the penetrated tubal ovum when the pronucleus is forming, the organelles concentrate in the cytoplasmic area containing the chromosomes¹⁶.

The concentration of ATPase activity at the periphery of the tubal oocyte is probably related to the role of the egg surface during cleavage. MIKI¹⁷ suggests that the ATPase activity of the cortex of the sea urchin egg might be involved in the transformation of the chemical energy

of ATP into the mechanical energy for cleavage. DALCQ¹⁸ has shown that the furrows of cleaving mice eggs give a positive reaction when the eggs are incubated in the presence of nucleotides.

Zusammenfassung. Nachweis, dass in den Eiern im Mäuseeileiter grosse Quantitäten von ATPase, Cytochromoxidase, Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, Mitochondrialdehydrogenasen, saure und alkalische Phosphatasen lokalisiert sind. In den Eiern im Eierstock hingegen wurden ebenfalls ATPase, Phosphatase und Lactat-dehydrogenase festgestellt, obwohl von den Mitochondrial-enzymen nur geringe Mengen gefunden wurden.

ANNETTE SKINNER and R. G. SPECTOR

Paediatric Research Unit and Department of Pharmacology, Guy's Hospital Medical School, London, S.E.1 (England), 25 April 1968.

¹³ L. ZAMBONI and L. MASTROIANNI JR., J. Ultrastruct. Res. 14, 95 (1966).

¹⁴ A. A. KATZBERG and A. G. HENDRICKX, Science 151, 1225 (1966).

¹⁵ A. T. HERTIG and E. C. ADAMS, J. Cell Biol. 34, 647 (1967).

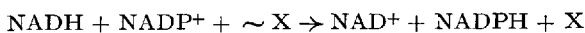
¹⁶ L. ZAMBONI and L. MASTROIANNI JR., J. Ultrastruct. Res. 14, 118 (1966).

¹⁷ T. MIKI, Expl Cell Res. 33, 575 (1964).

¹⁸ A. M. DALCQ, Archs Biol., Liège 73, 405 (1962).

Über die Wirkung von Ethacrynsäure auf die Energieübertragung in Mitochondrien

Ethacrynsäure, ein saluretisch wirksames Phenoxyessigsäurederivat (2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)phenoxyessigsäure), hemmt die Na⁺-, K⁺- und Mg⁺⁺-abhängige sogenannte Membran-ATPase in vivo¹ und in vitro². GAUDEMER und FOUCHER³ konnten zeigen, dass die Substanz in Rattenlebermitochondrien eine energiegekoppelte Reaktion, nämlich die Reduktion von Acetacetat durch Sukzinat hemmt. Dieser Befund dürfte für den Wirkungsmechanismus von Ethacrynsäure von Bedeutung sein. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch Untersuchung anderer energiegekoppelter mitochondrialer Reaktionen diese Wirkung von Ethacrynsäure weiter zu beleuchten, wozu uns die energieabhängige NADP⁺-Reduktion durch NADH (energieabhängige Transhydrogenase-Reaktion) in submitochondrialen Teilchen geeignet erschien. Diese Reaktion



benötigt als Energiequelle ein nicht phosphoryliertes, energiereiches Zwischenprodukt der oxydativen Phosphorylierung (symbolisiert durch $\sim \text{X}$), das entweder durch die Mitochondrienatmung oder durch zugesetztes ATP erzeugt wird⁴.

Methodik. Rattenlebermitochondrien wurden nach der Methode von WEINBACH⁵ gewonnen und aus diesen nach KIELLEY und BRONK⁶ durch Ultraschallbehandlung submitochondriale Teilchen («sonic particles») hergestellt. Für die Messung der energieabhängigen Transhydrogenase-Reaktionen gingen wir im wesentlichen nach der Methode von DANIELSON und ERNSTER⁴ vor, verwendeten aber statt Äthanol und Alkoholdehydrogenase als Wasserstoffdonatorsystem Laktat und Laktatdehydro-

genase. Die Hemmung der Transhydrogenase-Reaktion durch Ethacrynsäure wurde sowohl unter anaeroben Bedingungen mit ATP als Energiequelle («ATP-abhängige Transhydrogenase») als auch unter aeroben Bedingungen

Hemmung energieabhängiger Transhydrogenase-Reaktionen durch Ethacrynsäure

Ethacrynsäure Konzentration (M)	(a) NADH-abhängige Transhydrogenase		(b) Sukzinat-abhängige Transhydrogenase		(c) ATP-abhängige Transhydrogenase	
	spez. Akt.	% Hemmung	spez. Akt.	% Hemmung	spez. Akt.	% Hemmung
—	12,6	—	14,1	—	22,1	—
5×10^{-5}	8,0	35	12,6	11	16,0	28
1×10^{-4}	4,5	64	11,6	18	15,1	32
1×10^{-3}	3,5	72	5,5	61	6,6	70
2×10^{-3}	1,0	92	2,3	84	1,8	92

Reaktionsmedium (Endvolumen: 3,0 ml). (a) NADH als Substrat: 50 mM Tris-Acetat-Puffer (pH 8,0), 6 mM MgCl₂, 250 mM Saccharose, 333 μM NADP⁺, 33,3 μM NAD⁺, 170 mM Laktat, 25 μg Kaninchenmuskel-Laktatdehydrogenase, 0,2 ml «sonic particles»; (b) Sukzinat als Substrat: Reaktionsmischung wie unter (a), ferner: 3 mM Na-Sukzinat und 3,4 μM Rotenon; (c) ATP als Energiequelle: Reaktionsmischung wie unter (a), ferner: 1,3 mM ATP und 3,3 mM KCN, 3,4 μM Rotenon. Messung der Extinktionszunahme bei 340 nm im Beckman DB-Spektralphotometer gegen eine Vergleichsküvette, die entweder kein NADP⁺ (a), oder kein Sukzinat (b) oder kein ATP (c) enthält (Temperatur: 25°C). Spezifische Aktivität ausgedrückt als gebildete μMol NADPH/mg Protein/min.

mit Sukzinat («Sukzinat-abhängige Transhydrogenase») oder NADH («NADH-abhängige Transhydrogenase») als Energiequelle untersucht. Reaktionsmilieu siehe Legende zur Tabelle. Ethacrynsäure (Merck, Sharp und Dohme)⁷ wurde in verdünntem Bikarbonat gelöst und dem Messansatz ohne vorherige Inkubation direkt zugesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Kjeldahl.

Die Tabelle zeigt, dass Ethacrynsäure die untersuchten energiegekoppelten Transhydrogenase-Reaktionen schon bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-5} M$ deutlich hemmt. Somit weisen auch unsere Ergebnisse darauf hin, dass Ethacrynsäure ihre Wirkung bei der Transformierung der Respirationsenergie, d.h. bei einer der Energieübertragungsreaktionen der oxydativen Phosphorylierung entfaltet. Da, wie ERNSTER⁴ gezeigt hat, die energieabhängige Transhydrogenase-Reaktion keines phosphorylierten energiereichen Zwischenproduktes bedarf, und andererseits Ethacrynsäure die endergone Transhydrogenase-Reaktion sowohl dann hemmt, wenn ATP, als auch dann, wenn die Respiration als Energiequelle dient, nehmen wir an, dass Ethacrynsäure mit einem nichtphosphorylierten Zwischenprodukt der mitochondrialen Energieübertragung einen inaktiven Komplex bildet.

Wir halten es durchaus für möglich, dass für die pharmakologische Wirkung der Ethacrynsäure neben der

Hemmung der Membran-ATPase^{1,2}, auch die Beeinflussung der Energieübertragung von Bedeutung sein könnte.

Summary. Ethacrynic acid, a diuretic drug, inhibits the endergonic reduction of NADP⁺ by NADH in sonic particles from liver, the energy being supplied either by adding ATP or by respiration.

R. KRAMAR und E. KAISER

Institut für Medizinische Chemie der Universität, Wien (Österreich), 15. März 1968.

- ¹ J. B. HOOK und H. E. WILLIAMSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **120**, 358 (1965).
- ² D. E. DUGGAN und R. M. NOLL, *Archs Biochem. Biophys.* **109**, 388 (1965).
- ³ Y. GAUDEMER und B. FOUCHER, *Biochim. biophys. Acta* **131**, 255 (1967).
- ⁴ L. DANIELSON und L. ERNSTER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **10**, 91 (1963); *Biochem. Z.* **338**, 188 (1963).
- ⁵ E. C. WEINBACH, *Analyt. Biochem.* **2**, 335 (1961).
- ⁶ W. W. KIELLEY und J. R. BRONK, *J. biol. Chem.* **230**, 521 (1958).
- ⁷ Für die Überlassung von Ethacrynsäure sind wir der Fa. Contex (Wien) zu grossem Dank verpflichtet.

Autoradiographic Studies on Collagen in Plant Nuclei¹

From biochemical analysis on Walker tumour and rat liver cells, STEELE and BUSCH² demonstrated that the residual nuclear protein is rich in collagen. They confirmed the presence of collagen by electron microscopic studies. On the basis of the fact that structure and function of chromosomes are the same in plants and animals, collagen should be present in plant nuclei, if it happens to be an important and integral part of the chromosome. In a previous report, the present workers detected the presence of collagen in plant nuclei³. It was reported that the plant nuclei showed typical collagen staining with picro-ponceau with hematoxylin, Mallory's P.T.A.H. and Verhoeff's elastic stain, only when the nucleic acids were removed by hydrolysis with 5% TCA at 90°C for 15 min followed by digestion with 3 mg/ml solution of pepsin in N/50 HCl at pH 2.3 for 6 h at 37°C and digestion with 1 mg/ml solution of trypsin in phosphate buffer at pH 6.0 for 6 h at 37°C in succession. That this positive staining in onion nuclei is truly due to collagen, was indicated by the fact that collagenase treatment (1 mg/ml solution in distilled water for 18 h at 37°C) effaced the typical collagen staining.

Although labelled hydroxyproline would have been the ideal precursor substance for specific labelling of collagen for autoradiographic studies, unfortunately it is not incorporated in collagen⁴. However, radioactive proline can be used for detection of collagen^{5,6}. In the present experiment, onion root tip nuclei were incorporated with 30 µc/ml (sp. act. 1.15 c/mM) for 8 h. The root tips were fixed in Carnoy's fixative, dehydrated and embedded in paraffin and sectioned at 5 µ. The tissue sections were mounted alternately on 2 different slides so that 2 sections of the same nucleus could be located on 2 different slides. 1 of the slides was treated with TCA to remove nucleic acids, followed by digestion with pepsin and trypsin in succession. The other one was digested with a solution of

collagenase in addition. The concentration, pH and duration of treatment used for each enzyme were the same as that used in stainability studies reported earlier. All the slides were then rinsed in water and then taken up to 50% alcohol. Autoradiographic film was applied to the serial sections. The film was exposed for 15 days and then developed. After air drying the sections were coloured through the emulsion with picro-ponceau to provide a colour image. The autoradiographic grains were counted on 10 µ² of chromatin material with the help of a reticule. Such counts were made on 2 adjacent sections of 40 nuclei, which were treated as stated above. The results are presented in the Table.

It was observed that collagen treated nuclei showed 4.5 silver grains/10 µ² in contrast to 6.2 in control. These results indicate that in the plant nuclei there is a protein which can be labelled by H³-proline and be removed by collagenase.

Thus, an application of 2 valid and established methods: namely specific staining reaction for collagen and auto-

- ¹ This investigation was partially supported by a Ford Foundation Grant to the Department of Agricultural Engineering of this Institute. Thanks are due to Prof. V. N. PRASAD, Director, and Prof. A. C. PANDYA, Head of the Department of Agricultural Engineering of this Institute.
- ² W. J. STEELE and H. BUSCH, *Expl Cell Res.* **33**, 68 (1964).
- ³ D. N. DE and S. N. GHOSH, *Expl Cell Res.* **47**, 637 (1967).
- ⁴ K. JUVA, D. J. PROCKOP, G. W. COOPER and J. W. LASH, *Science* **152**, 92 (1966).
- ⁵ J. CARNEIRO and C. P. LEBLOND, *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 334 (1966).
- ⁶ R. ROSS, in *The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis* (Ed. C. P. LEBLOND and K. R. WARREN; Academic Press, New York 1965), p. 273.