

regularly shaped and tended to fuse with adjacent bands of vesicles (Figure 2), forming patches with a density of about 170 vesicles per  $\mu\text{m}^2$ .

The vesicles have often been termed pinocytotic implying a physiologic function upon which there is no general agreement at the present time. As DEVINE et al.<sup>5</sup> pointed out, one very rarely observes vesicles away from the cell membrane, and the question whether they are involved in any transport process is still open, although the vesicles could disintegrate very rapidly after detachment from the plasma membrane. In recent studies, the possibility was discussed that the invaginations are in some way analogous to the T-system of striated muscle<sup>5, 6, 12</sup>. At present, the significance of the arrangement of membrane areas into bands with and without vesicles is even less understood. PROSSER et al.<sup>2</sup> made a first reference to a striate pattern of vesicles in smooth muscle of the intestinal and urogenital tract, and recently longitudinal rows of membrane invaginations have been reported on smooth muscle cells from mesenteric arteries and vas deferens of guinea-pigs<sup>5</sup> as well as from avian arteries<sup>6</sup>. It has been demonstrated that the dense areas which are likely to represent attachment sites for the myofilaments<sup>1, 6</sup> are only found in the longitudinal surface regions in which no vesicles are present<sup>5-7</sup>. This

finding has prompted DEVINE et al.<sup>5</sup> to regard the vesicle-free areas of the cell membrane as the attachment areas of the myofilaments. Whatever the interpretation, there is increasing evidence that the arrangement of membrane invaginations and areas of membrane devoid of invaginations into bands, is a common feature of smooth muscle cells.

**Zusammenfassung.** Mit Hilfe der Gefrierätzung wurde die Oberfläche glatter Muskelzellen von Kaninchenarterien (*A. ilica*) dargestellt. Die Aufsicht zeigt ein charakteristisches Muster von parallel zur Zellachse verlaufenden Streifen, welche aus einer bis mehreren Reihen einheitlich grosser Membraneinstülpungen (Caveolae intracellulares) bestehen.

R. MUGGLI and H. R. BAUMGARTNER<sup>13</sup>

Department of Experimental Medicine,  
F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd.,  
CH-4002 Basel (Switzerland), 18 April 1972.

<sup>12</sup> G. GABELLA, J. Cell Sci. 8, 601 (1971).

<sup>13</sup> The authors wish to thank Prof. H. MOOR, Department of General Botany, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich (Switzerland), for advice and freeze-etching facilities.

## Zum Schlüpfprozess bei Fischen: II. Gewinnung und Charakterisierung des Schlüpfsekretes bei der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich.)

Das abgelegte Forellenei ist während seiner gesamten Embryonalentwicklung von einer derben Schale (Chorion) umgeben, die vordringlich einen schützenden Charakter hat und nach eigenen Beobachtungen aus drei Schichten aufgebaut ist<sup>1</sup>. Diese Schichten bilden zusammen eine Hülle, die das Forellenei befähigt, einen Druck von 2,5 bis 3,5 kg auszuhalten, womit es den natürlichen Bedingungen bestens angepasst ist<sup>2</sup>. Zum Zeitpunkt des Schlüpfens ist deshalb ein besonderer Prozess zu erwarten, der es dem herangewachsenen Embryo gestattet, diese Hülle zu sprengen, um in das freie Wasser zu gelangen. Im einzelnen setzt sich dieser Vorgang aus den folgenden Teilschritten zusammen: der Bildung eines Schlüpfsekretes, seiner Ausschüttung und seiner Wirkung auf die Eihülle.

Zur Gewinnung des Schlüpfsekretes öffnet man Eier, die unmittelbar vor dem Schlüpfen standen, weil erst zu diesem Zeitpunkt die Gewähr besteht, dass die perivitelline Flüssigkeit auch aktives Schlüpfsekret enthält<sup>1</sup>. Während die perivitelline Flüssigkeit in den frühen und mittleren Entwicklungsstadien dünnflüssig ist, nimmt ihre Viskosität zum Schlüpfen hin immer mehr zu, so dass maximal nur 5  $\mu\text{l}$  gewonnen werden können. Diese Menge ist für biochemische Untersuchungen aber zu gering. Wir entwickelten deshalb eine Methode, die von der Beobachtung ausging, dass Sauerstoffentzug bei kurz vor dem Schlüpfen stehenden Forellen zu einer Beschleunigung des Schlüpfvorganges führt. Die Eier, die am besten wenige Stunden vor dem natürlichen Schlüpfen stehen sollen, wurden zu 100 Stück in eine Petrischale gegeben, auf Eihöhe mit verschiedenen Puffern überschichtet und vorsichtig mit Stickstoff begast. Der günstigste Wirkungsgrad der Begasung liegt im richtigen Verhältnis des noch vorhandenen zum schon verdrängten Sauerstoff, erkennbar an den heftigen Bewegungen der Embryonen, die dabei sehr wahrscheinlich die das Schlüpfsekret enthaltenden Drüsen an der Eischale aufreissen und damit den Schlüpfvorgang einleiten. Das überschüssige Sekret gelang nach dem Aufbrechen der Schalen in den Puffer

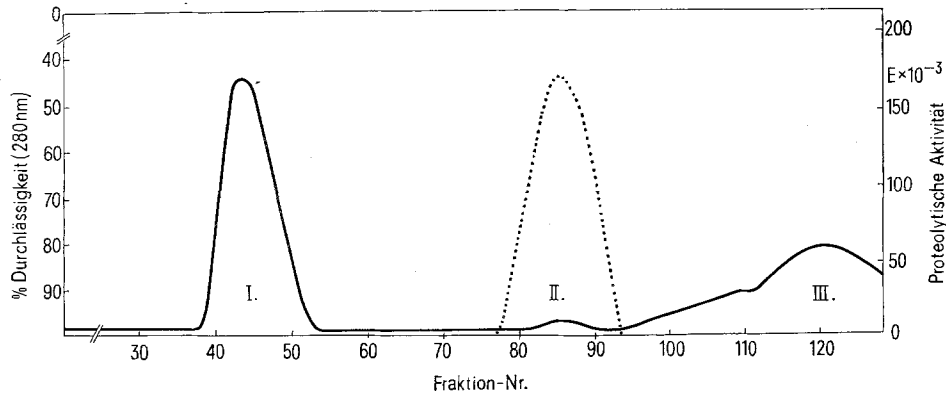
und kann zusammen mit der perivitellinen Flüssigkeit abgetrennt werden (im folgenden als Rohextrakt bezeichnet). Ammoniumcarbonat-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Veronal/HCl-Puffer (0,05 M; pH 8,0) erwiesen sich am günstigsten und ergaben eine Schlüpfquote von wenigstens 95%, während Phosphat-Puffer (0,1 M; pH 8,0) den ungünstigsten Wirkungsgrad erzielte. Die Schlüpfquote betrug hier nur um 35%, weil die übrigen Embryonen ihre Bewegungen vorzeitig einstellten und noch im Ei abstarben. Der so gewonnene Extrakt wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Aktivität des so gewonnenen Schlüpfsekretes konnte durch Verdauungsversuche mit Eierschalen gesichert werden, die im Augenpunktstadium präpariert waren und in dest. Wasser im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Mit Hilfe solcher Eihüllen als natürlichem Substrat konnte für das bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefrorene Sekret eine Mindesthaltbarkeit von einem Jahr festgestellt werden. Dass diesem Sekret ein enzymatischer Charakter zugebilligt werden kann, liess sich durch Erhitzung vor der Zugabe zum Substrat zeigen. Verschiedene Temperaturen zwischen 5 bis  $60^\circ\text{C}$  ergaben eine völlige Inaktivierung ab  $40^\circ\text{C}$ .

Für Untersuchungen zur Zusammensetzung des Schlüpfsekretes kamen elektrophoretische Methoden und enzymatische Tests zur Anwendung. Mit Hilfe von Cellulose-Acetat-Folien gelang es, den Rohextrakt in vier Banden aufzutrennen. Unterzieht man den Extrakt jedoch der besser auflösenden Acrylamid-Gel-Elektrophorese (7%iges Gel, Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3), so ergeben sich bei progressiver Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250<sup>3</sup> sieben Banden, wovon sich in anodischer Laufrichtung betrachtet die erste Bande von den übrigen deutlich absetzt.

<sup>1</sup> H. E. HAGENMAIER und R. WILHELM, Experientia 28, 605 (1972)

<sup>2</sup> A. I. ZOTIN, J. Embryol. exp. Morph. 6, 546 (1958).



Gelfiltration des Schlüpf-Sekretes (s. Text). Sephadex G-75 in 0,1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0. Säule:  $2,8 \times 74$  cm. Jede Fraktion enthält 3 ml, Durchflussrate 15 ml/h. I, III = inaktives Material, II = Schlüpf-Protease. Linke Ordinate —, Durchlässigkeit im Eluat bei 280 nm; rechte Ordinate ·····, proteolytische Aktivität mit Casein als Substrat in O.D. bei 280 nm.

Aufgrund von laufenden Untersuchungen über die Struktur und die chemische Zusammensetzung der Eihülle sollte man bestimmte Enzyme, wahrscheinlich Glycosidasen und Proteasen, im Schlüpfsekret erwarten. Da für entsprechende enzymatische Tests der Rohextrakt herangezogen werden muss, dürfen positive Befunde aber erst dann dem Schlüpfsekret zugerechnet werden, wenn sich eine enge Substratbezogenheit zur Eihülle aufzeigen lässt bzw. wenn die Stoffe in isolierter und gereinigter Form ihre Wirksamkeit auf die Eihülle als natürliches Substrat beweisen. Entsprechende Versuche in dieser Richtung weisen das Vorhandensein einer  $\alpha$ -Amylase auf, die mit Amylose als Substrat (0,02 M Phosphat-Puffer, pH 7,1; 0,008 N Jodlösung, bei 623 nm,  $d = 1$  cm) zu 6 Street-Close-Einheiten/100 ml bzw. 34,2 mU/ml bestimmt werden konnte.

Bei der vorgenommenen Prüfung auf Hexosaminidasen bedienten wir uns der entsprechenden Nitrophenylsubstrate und bestimmten das freigesetzte Nitrophenol im Spektralphotometer bei 430 nm<sup>4</sup>. Nachweisen liessen sich hierbei die acetylierten Formen der  $\beta$ -D-glucosaminidase und der  $\beta$ -D-galactosaminidase.

Da sich die Eihüllen besonders durch einen relativ hohen Proteingehalt auszeichnen, vor allem die Zona radiata, erschien uns das Vorhandensein einer Protease als sehr wahrscheinlich. Tüpfel-Versuche mit dem Rohextrakt auf eine Gelatine-Schicht und deren Transparent-Werden an diesen Stellen erhärteten die Richtigkeit der Vermutung. Bei der Suche nach weiteren Substraten erwiesen sich neben der Gelatine das Casein und die B-Kette des Insulins als positiv. Eine erste Reinigung des

Rohextraktes mittels einer Gelfiltration über Sephadex G-75 in Ammoniumbicarbonat-Puffer (0,1 M; pH 8,0) erbrachte eine einzige proteolytische Fraktion, die Casein und die B-Kette als Substrate spaltete und damit die Einordnung als Endopeptidase erlaubt.

Lässt man nun diese isolierte Proteinase auf Eierschalen einwirken, so erfolgt wie beim natürlichen Schlüpfen eine Auflösung der Hülle, die den Gedanken nahelegt, dass diese Proteinase möglicherweise allein die einzige, wirk-same Komponente des Schlüpfsekretes darstellen könnte. In dem Fall wäre die Bezeichnung «Schlüpfsekret» in «Schlüpfenzym» zu ändern.

**Summary.** A method is described to get the secrete of the hatching glands together with the perivitelline fluid by stimulating the eggs of *Salmo gairdneri* with dissolved gaseous nitrogen in various buffers. Characterizing this fluid by various methods there could be shown some enzymes of those a proteinase alone seems to be the really 'hatching enzyme'.

H. E. HAGENMAIER<sup>5</sup>

Zoologisches Institut der Technischen Hochschule Aachen, Birkenallee, D-51 Aachen (Deutschland), 18. Februar 1972.

<sup>3</sup> A. DATYNER, Biochim. biophys. Acta 71, 377 (1963).

<sup>4</sup> D. PUGH, D. H. LEABACK and P. G. WALKER, Biochem. J. 65, 464 (1957).

<sup>5</sup> Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für finanzielle Unterstützung gedankt.

## Sequential Appearance of $\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ -Crystallins in Embryonic and Metamorphic *Rana pipiens*

The reported times of first appearance of the lens-specific proteins, the crystallins, in vertebrate development have had a controversial history (for reviews see<sup>1,2</sup>). It is currently accepted that in birds<sup>3,4</sup>,  $\delta$  crystallins are the first to appear, while in mammals the first crystallin class to be detectable is  $\alpha$  crystallins<sup>5,6</sup>; however,  $\gamma$  crystallins are predominant in the mammalian embryonic lens<sup>5,7</sup>.

The situation with amphibians is less clear. YAMADA<sup>8</sup> has suggested with reservations that  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallins appear before  $\gamma$ -crystallins in the regenerating newt lens. In the normal developing newt lens, OGAWA<sup>9</sup> found  $\alpha$  and  $\beta$ -crystallins first to appear, although the antisera and

test antigens utilized were not specific (discussed in<sup>10</sup>). Immunofluorescence results obtained with the developing lens of the anuran *Rana pipiens*, the American grass frog<sup>10</sup>, suggested, however, that  $\gamma$ -crystallins are among the first, if not the first crystallins to appear in normal amphibian lens development. To better define the ontogeny of the crystallins in this amphibian, classical direct immunological techniques have been employed in the present study to corroborate and elucidate the immunofluorescence profiles previously obtained<sup>10</sup>.

**Materials and methods.** Adult *R. pipiens* were kept in tap water at 5°C until used. *R. pipiens* eggs were obtained by the method of induced ovulation<sup>11</sup>, artificially